JULIE BESTMAN-SMITH

CARACTÉRISATION DES MUTATIONS DU VIRUS HERPÈS SIMPLEX IMPLIQUÉES DANS LA RÉSISTANCE AUX ANTIVIRAUX

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de microbiologie-immunologie
pour l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

FÉVRIER 2004

© Julie Bestman-Smith, 2004

Résumé court

La résistance du virus de l'herpès simplex (VHS) aux antiviraux est un problème courant chez les individus immunosupprimés. Des mutations au sein du gène de la thymidine kinase (TK) virale sont principalement à l'origine de la résistance au traitement de première ligne, i.e. les analogues des nucléosides. La cible ultime de tous les antiviraux anti-herpétique demeure cependant l'ADN polymérase (pol) virale. Ces deux gènes viraux (TK et ADN pol) démontrent un certain degré de polymorphisme génétique et il peut devenir difficile d'identifier avec certitude les mutations responsables de la résistance aux antiviraux. Les travaux présentés dans cette thèse de Doctorat démontrent le développement de nouvelles méthodes afin d'établir un lien entre l'apparition de mutations au niveau de gênes viraux et un phénotype de résistance particulier. Un système d'expression du gène de la TK virale chez le parasite *Leishmania* et un ensemble de cosmides et de plasmides recombinants permettant de générer des virus ADN pol mutants ont été mis au point. Ces nouvelles stratégies nous ont permis de caractériser les mutations virales impliquées dans la résistance aux antiviraux.

Julie Bestman-Smith

Guy Boivin

Résumé long

La résistance du virus de l'herpès simplex (VHS) aux antiviraux entraîne considérablement de morbidité chez les individus immunosupprimés. Des mutations dans le gène de la thymidine kinase (TK) virale sont principalement à l'origine de la résistance aux analogues des nucléosides, alors que des mutations dans le gène de l'ADN polymérase (pol) virale, la cible de tous les agents anti-herpétiques actuellement disponibles, peuvent entraîner un phénotype de multirésistance. La présence d'un certain degré de polymorphisme génétique au sein de ces gènes rend cependant difficile l'identification des mutations impliquées dans la résistance aux antiviraux. **OBJECTIF** : L'objectif principal des travaux présentés dans cette thèse de Doctorat consiste en la caractérisation des gènes de la TK et de l'ADN pol du VHS par le développement de nouveaux systèmes qui permettront d'évaluer de façon plus adéquate le rôle des mutations virales dans la résistance aux antiviraux. **MÉTHODES** : Le premier système comprend un vecteur (pSPαNEOαTK) permettant l'expression du gène de la TK dans le parasite *Leishmania*, normalement dépourvu d'activité TK. La sensibilité des parasites TK-recombinants à l'antiviral peut alors être évaluée par la mesure de la densité optique des cultures en présence de l'antiviral. Un système de cosmides et de plasmides couvrant l'ADN complet du VHS a été mis au point afin d'introduire, par mutagenèse dirigée, des mutations dans le gène de l'ADN pol. Les virus recombinants mutants peuvent être générés par transfection des cellules Véro. **RÉSULTATS** : L'expression de gènes TK provenant de souches cliniques sensibles à l'ACV a entraîné la sensibilité des parasites *Leishmania* à l'antiviral. Inversement, la transfection des TK comprenant des délétions de nucléotides menant à un changement du cadre de lecture ou certaines substitutions de nucléotides a résulté à des niveaux élevés de résistance des parasites. L'ensemble des résultats obtenus avec le système de cosmides et de plasmides recombinants nous a permis d'établir un rôle fonctionnel pour la partie centrale (régions II et VI) des régions conservées du gène de l'ADN pol dans la résistance croisée à l'ACV, au FOS et à l'ADV. D'un autre côté, un rôle plutôt associé à l'activité réplicative de l'ADN pol a été relié aux extrémités (régions δ-C, I, V et VII). **CONCLUSION :** Ces nouveaux systèmes permettent d'évaluer de façon rapide et efficace le rôle des mutations virales dans la résistance du VHS aux antiviraux, ce qui devrait faciliter le traitement des infections résistantes.

Abstract

Drug resistant HSV isolates are responsible form substantial morbidity among immunocompromised subjects. The genetic basis for resistance to nucleoside analogs such as acyclovir (ACV) have been mapped to point mutations in the viral thymidine kinase (TK) gene while mutations within the viral DNA pol gene, the main target for all anti-herpetic drug actually available, could lead to a multidrug resistance phenotype. However, the distinction between viral mutations (TK and DNA pol) involved in antiviral resistance or part of viral polymorphism can be difficult to evaluate with current methodologies. **OBJECTIVE**: The aim of this research project is thus to evaluate the role of particular mutations within the HSV TK and DNA pol gene with regard to drug-resistance patterns and viral fitness, by designing new gene expression systems. **METHODS**: The protozoan parasite *Leishmania* stably transfected with a TK expression vector (pSP72αNEOα) was used as an heterologous system to evaluate the role of several different point mutations within the coding region of the TK gene in conferring resistance to nucleoside analogs. Susceptibility of TK-expressing parasites to nucleoside analogs can thus be tested very easily by a simple measurement of the optic density of cultures grown in the presence or in the absence of the drug. Finally, a set of overlapping viral cosmids and plasmids for the rapid generation of recombinant HSV-1 DNA pol mutants have been developed. **RESULTS**: Expression of the TK gene from ACV-susceptible clinical isolates resulted in *Leishmania* susceptibility to the antiviral, whereas expression of a TK gene with frameshift mutations or nucleotide substitutions from ACV-resistant isolates gave rise to parasites with high levels of antiviral resistance. Twenty HSV-1 recombinants with single or dual mutations within the DNA pol gene were successfully generated with the cosmid/plasmid based approach. Mutations within the central part of the enzyme's catalytic domain (regions II and VI) were associated with resistance to ACV, FOS, and ADV, whereas mutations inserted within extremities (δ-region C, I, V, and VII) were mostly related to the replicative activity of the enzyme. **CONCLUSION**: Such new strategies provide an easy, reliable, and sensitive means of evaluating the functional role of viral mutations which should translate in improved management of drug-resistant HSV infections.

Avant propos

Que dire pour être à la hauteur de l'appui des gens qui m'ont entourée au cours de mes études au doctorat. La première personne que j'aimerais souligner est bien sûr mon directeur de recherche, le Dr Guy Boivin. Son ardeur, sa passion et son ambition pour son travail n'ont pu que m'encourager à entreprendre mon projet de recherche avec sérieux et de toujours aller au delà de mes capacités. Son sens de la perfection et sa grande exigence du travail bien fait m'ont incitée à réclamer le meilleur de moi-même, ce qui me permet aujourd'hui de signer, avec plus de fierté que je ne l'aurais jamais cru, ma thèse de doctorat. Les membres de notre équipe de recherche m'ont également été d'un grand soutien tant au niveau scientifique que sur le plan moral. Leur confiance en mes capacités et leurs encouragements répétés m'ont été d'un support précieux.

Je dois également souligner l'aide financière obtenue tout au long de mes études au doctorat du fond de recherche en santé du Québec (FRSQ) et des instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) .

J'ai certainement un mot particulier pour les membres de ma famille. Leur authenticité, leur grand intellect et leur désir de toujours vouloir performer peuvent qu'inciter quiconque à prendre goût aux études et de vouloir constamment s'enrichir de nouvelles connaissances. J'aimerais particulièrement remercier ma grand-mère Aline et ma mère Gisèle qui ont lu et corrigé ma thèse de doctorat et qui éveillent, chacune de leur façon, ce qu'il y a de plus précieux en moi. Je veux également relever la générosité de ma belle famille qui savent spécialement bien souligner mes accomplissements.

Mon amour Nicolas qui me suit pas à pas depuis le commencement de mes longues études, navigue patiemment dans les tempêtes de ma vie, me fait savourer les temps plus éclaircis et sera toujours la raison des rayons les plus resplendissants.

Aux deux femmes qui inspirent ma vie, ma mère Gisèle et ma grand-mère Aline

Table des matières

RÉSUMÉ COURT ..... **I**

RÉSUMÉ LONG ..... **II**

ABSTRACT ..... **III**

AVANT PROPOS ..... **IV**

TABLE DES MATIÈRES ..... **VI**

LISTE DES TABLEAUX ..... **IX**

LISTE DES TABLES ..... **X**

LISTE DES FIGURES ..... **XI**

LISTE DES ABRÉVIATIONS ..... **XII**

INTRODUCTION **1**

1 CHAPITRE I :INTRODUCTION GÉNÉRALE **3**

1.1 LE VIRUS *HERPES SIMPLEX*-CLASSIFICATION ET GÉNÉRALITÉS 3
1.2 LA STRUCTURE DU VHS 5
1.3 ORGANISATION DU GÉNOME 7
1.4 LA RÉPLICATION DU VHS 8
1.4.1 Attachement et entrée du virus *9*
1.4.2 Expression des gènes *10*
1.4.3 Réplication de l'ADN viral *13*
1.4.4 Assemblage, encapsidation et bourgeonnement *14*
1.4.5 Histopathologie de la cellule infectée *17*
1.5 PATHOGENÈSE : NEUROVIRULENCE ET LA LATENCE 17
1.5.1 La neurovirulence *17*
1.5.2 Établissement, maintien et réactivation de la latence *18*
1.6 LES INFECTIONS SECONDAIRES AU VHS 24
1.6.1 Terminologie *24*
1.6.2 Transmission du VHS *25*
1.6.3 L'infection primaire et récurrente *26*
1.6.4 Épidémiologie *27*
1.7 RÉPONSE IMMUNITAIRE 32
1.8 MANIFESTATIONS CLINIQUES 35
1.8.1 Herpès mucocutané *36*
1.8.1.1 Infection oro-labiale 36
1.8.1.2 Les infections oculaires 37
1.8.1.3 L'herpès génital 38
1.8.1.4 Autres localisations 41
1.8.2 L'herpès néonatal *41*
1.8.3 Infections du SNC *42*
1.9 LES INFECTIONS CHEZ LES PATIENTS IMMUNOSUPPRIMÉS 43
1.9.1 Le VHS et le virus de l'immunodéficience humaine *44*
1.10 DIAGNOSTIC DE L'INFECTION SECONDAIRE AU VHS 48
1.11 LA PRÉVENTION DE L'INFECTION 51
1.11.1 Mesures générales *52*

1.11.2 Les vaccins *53*
1.11.2.1 Les vaccins vivants 55
1.11.2.2 Vaccins non-vivants 57
1.12 LES TRAITEMENTS ANTIVIRAUX 59
1.12.1 Acyclovir et valacyclovir *60*
1.12.2 Penciclovir et famciclovir *66*
1.12.3 Traitement des patients immunosupprimés *67*
1.12.4 Foscarnet *68*
1.12.5 Cidofovir et adéfovir *69*
1.12.6 Nouvelles approches thérapeutiques *71*
1.12.6.1 Inhibiteurs de la ribonucléotide réductase 71
1.12.6.2 Inhibiteurs de l'hélicase virale 72
1.12.6.3 Inhibiteurs de protéases virale 72
1.12.6.4 Inhibiteurs de la glycosylase ADN-Uracil 72
1.12.6.5 Immunomodulateurs 73
1.13 LA RÉSISTANCE DU VHS AUX ANTIVIRAUX 73
1.13.1 Résistance du VHS en clinique (incidence et manifestation) *74*
1.13.2 Résistance phénotypique *77*
1.13.2.1 Méthodes phénotypiques d'évaluation de la résistance 78
1.13.2.2 Réduction des plaques 79
1.13.2.3 Colorimétrique ("dye uptake assay") 80
1.13.2.4 Cytofluorométrie 80
1.13.2.5 Hybridation 80
1.13.2.6 ELVIRA® 81
1.13.3 Résistance génotypique *82*
1.13.3.1 Mutations dans le gène de la TK virale. 83
1.13.3.1.1 Détermination du rôle des mutations dans le gène de la TK virale 89
1.13.3.2 Mutations dans le gène de l'ADN polymérase virale 90
1.13.3.2.1 Mutants sélectionnés *in vitro* 96
1.13.3.2.1.1 Mutations dans la région conservée II 96
1.13.3.2.1.2 Mutations dans la région conservée III 98
1.13.3.2.1.3 Mutations dans les régions conservées IV à VII 98
1.13.3.2.1.4 Mutations dans la région conservée I 99
1.13.3.2.1.5 Mutations dans les motifs exo (région IV et δ-région C) 99
1.13.3.2.1.6 Mutations hors des régions conservées 101
1.13.3.2.2 Mutations sélectionnées in vivo 101
1.13.4 Pathogénicité des virus résistants (capacité réplicative) *104*
1.14 OBJECTIFS DE RECHERCHE 109
1.14.1 Problématique *109*
1.14.2 Caractérisation du gène de la TK *110*
1.14.3 Caractérisation du gène de l'ADN pol *111*

2 CHAPITRE II :ÉVALUATION DE LA RÉSISTANCE D'ISOLATS CLINIQUES DU VIRUS HERPÈS SIMPLEX AUX ANALOGUES DES NUCLÉOSIDES À L'AIDE D'UN NOUVEAU SYSTÈME D'EXPRESSION HÉTÉROLOGUE 112

2.1 RÉSUMÉ 114
2.2 ABSTRACT 115
2.3 INTRODUCTION 116
2.4 MATERIALS AND METHODS 117
2.5 RESULTS 119
2.6 DISCUSSION 121
2.7 ACKNOWLEDGMENTS 124
2.8 REFERENCES 125

3 CHAPITRE III :ISOLATS CLINIQUES DE VIRUS HERPÈS SIMPLEX AYANT UNE SENSIBILITÉ RÉDUITE À L'ADÉFOVIR, SÉLECTIONNÉS SUITE À UNE THÉRAPIE AU FOSCARNET 135

3.1 RÉSUMÉ 137
3.2 ABSTRACT 138
3.3 BRIEF REPORT 139
3.4 ACKNOWLEDGMENTS 143
3.5 REFERENCES 144

4 CHAPITRE IV :PROFIL DE RÉSISTANCE AUX ANTIVIRAUX CHEZ DES VIRUS HERPÈS SIMPLEX GÉNÉRÉS PAR UN SYSTÈME DE COSMIDES ET DE PLASMIDES RECOMBINANTS ET POSSÉDANT DES MUTATIONS AU SEIN DU GÈNE DE L'ADN POLYMÉRASE 148

4.1 RÉSUMÉ 150
4.2 ABSTRACT 151
4.3 INTRODUCTION 152
4.4 MATERIALS AND METHODS 153
4.5 RESULTS 155
4.6 DISCUSSION 158
4.7 ACKNOWLEDGMENTS 163
4.8 REFERENCES 164

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 176

BIBLIOGRAPHIE DE L'INTRODUCTION GÉNÉRALE 191

ANNEXE-I : RESISTANCE OF HERPESVIRUSES TO ANTIVIRAL DRUGS: CLINICAL IMPACTS AND MOLECULAR MECHANISMS 225

Liste des Tableaux

Tableau 1. Virus de la famille des *Herpesviridae* humains 5

Tableau 2. Prévalence du VHS-1 et -2 à travers le monde. 31

Tableau 3.Mécanismes par lesquels les virus peuvent agir en tant que co-facteurs à la stimulation de la réplication du VIH-1. 47

Tableau 4. Mécanismes par lesquels les virus herpétiques stimulent la réplication du VIH-1 47

Tableau 5. Catégories de vaccins contre l'infection au VHS..... 55

Tableau 6. Valeurs des seuils de résistance (CI_{50}) aux antiviraux selon la méthode utilisée. 81

Tableau 7. Facteurs pouvant influencer les mesures de sensibilité du VHS à un antiviral.. 82

Tableau 8. Sommaire des phénotypes et génotypes qui entraînent la résistance du VHS à l'ACV. 88

Tableau 9. Mutations rapportées dans le gène de l'ADN pol du VHS associées à un phénotype de résistance aux antiviraux..... 93

Liste des Tables

Table 2-1. Phenotypic and genotypic analyses of HSV TK genes from 18 clinical isolates 131

Table 2-2. Susceptibility of HSV isolates to ACV and of TK-recombinant Leishmania to GCV 132

Table 2-3. Summary of non-silent TK mutations unrelated to ACV-resistance..... 133

Table 3-1. Phenotypic and genotypic caracterization of clinical herpes simplex viruses to acyclovir, foscarnet, adefovir, and cidofovir 147

Table 4-1.Genotypic and phenotypic caracterization of recombinant HSV-1 to antivirals171

Liste des Figures

Figure 1. Structure du VHS et organisation du génome. 6

Figure 2. Schéma du cycle de réplication du VHS dans une cellule hôte..... 9

Figure 3. Schéma de la réplication de l'ADN du VHS. 16

Figure 4. Représentation schémative des différentes étapes menant à la latence et à la réactivation du VHS. 20

Figure 5. Structure chimique des différents agents ayant une activité anti-herpétique. 60

Figure 6. Mécanisme d'action des agents anti-herpétiques. 62

Figure 7. Représentation schématique du gène de la TK et de l'ADN pol des VHS-1 et –2 ainsi que des mutations associées à la résistance aux différents antiviraux..... 87

Figure 8 : **Figure 1**. Schematic representation of the Leishmania expression vector pSPαNEOαTK. 134

Figure 9 : **Figure 1**. Schematic representation of viral cosmids and plasmids used to generate HSV-1 recombinants. 172

Figure 10 : **Figure 2**. Southern blot analysis of some recombinant HSV-1 wild type (wt) and mutant viruses along with the parental laboratory strain HSV 17 using some of the viral cosmids (cos 24, 51, and 71) as probes..... 173

Figure 11 : **Figure 3**. Plaque morphology of some recombinant HSV-1 wild-type (wt) and mutant viruses in 24-well plates containing Vero cells. 174

Figure 12 : **Figure 4**. Influence of DNA polymerase mutations on HSV replication capacity in single-step growth kinetics..... 175

Liste des abréviations

aa : Acide aminé
ACV : Acyclovir
ADN: Acide déoxyribonucléique
ADN pol : ADN polymérase
ADV : Adéfovir
ANP : Analogue des nucléosides phosphonates
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messager
ATP : Adénosine 5'-triphosphate
BAC : Chromosome artificiel bactérien (*Bacterial artificial chromosome*, en anglais)
CI_{50} : Concentration d'antiviral nécessaire pour inhiber 50% de la croissance virale
CD4 : *Cluster of differenciation number 4*
CDV : Cidofovir
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV : Cytomégalovirus
d : Déoxy
DISC : (*Disabled infection single cycle*, en anglais)
DL_{50} : Dose de virus nécessaire pour tuer 50% des souris
EBV : Virus Epstein-Barr
FCV : Famciclovir
FOS : Foscarnet
g Gramme
gB-gM : Glycoprotéine de l'enveloppe virale B à M
GAU : Glycosylase ADN-Uracil
GCV : Ganciclovir
GFP : Protéine fluorescente verte (Green fluorescent protein)
GNF : Facteur de croissance neuronal (*Growth neuronal factor*, en anglais)
HAART : Triple thérapie (*Highly active antiretroviral therapy*, en anglais)
HPMP : ((S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]
HPMPC : ((S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine (CDV)
Hve : Protéine herpétique de l'entrée virale
ICP : Protéine infectieuse cellulaire
IdC : Iododéoxycytidine
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
INF : Interféron
i.v. : Intraveineux
kb : Kilobase
kbp : Kilobase paire
kD : Kilodalton
kg : Kilogramme
L : Segment long
LAT : Transcrit associé à la latence (*Latency associated transcript*, en anglais)

LCR : Liquide céphalorachidien
LTR : Longue séquence terminale répétée (*Long terminal repeats*, en anglais)
mg : Milligramme
ml : Millilitre
MRP : Méthode de réduction des plaques
MTS : Maladie transmise sexuellement
NHANES : (*National health and nutrition examination survey*, en anglais)
NK : Cellules tueuses (*Natural killer cells*, en anglais)
nm : Nanomètre
mm : Millimètre
nM : Nonomolaire
nt : Nucléotide
Pb : Paire de base
PBMC : Cellules mononucléées du sang périphérique (*Peripheral blood mononuclear cells*, en anglais)
PCV : Penciclovir
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase chain reaction*, en anglais)
PME : 9-(2-phosphonylmethoxyetheyl
PMEA : 9-(2-phosphonylmethoxyetheyl)adénine (adéfovir)
ppi : Pyrophosphate inorganique
RR : Ribonucléotide réductase
S : Segment court
SIDA : Syndrome de l'immunodéficience humaine acquise
SNC : Système nerveux central
SNP : Système nerveux périphérique
SRI : Séquences répétées et inversées
TK : Thymidine kinase
TMP : Thymidylate phosphrylé
TNF : Facteur tumoral nécrosant (*Tumoral necrosant factor*, en anglais)
U : Séquence unique
UFP : Unités formatrices de plaques
µl : Microlitre
µM : Micromolaire
VHS : Virus de l'herpès simplex
VHH : Virus herpétique humain
vhs : (*Viral host shot off protein*, en anglais)
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VP : Protéine du virion
VVZ : Virus Varicella-Zoster

Introduction

Les premiers faits historiques relatant l'existence des manifestations cliniques causées par l'infection au virus de l'herpès simplex ont été retracés dans la Grèce antique où le mot "herpes" est apparu pour la première fois dans des écrits. En effet, Hippocrate utilisa ce terme pour décrire les lésions qui semblaient "ramper" à la surface de la peau des individus infectés. Par la suite, ce fut Hérodote qui associa les ulcères et les vésicules labiales avec de la fièvre. Même certains textes de Shakespeare sous-entendent la présence de l'herpès labial. Ce n'est cependant pas avant le 18ième siècle que l'infection génitale est décrite par Astruc, un physicien du roi Louis XIV. Vidal, en 1893 fut ensuite le premier à reconnaître la transmission de personne à personne de l'infection herpétique.

La plupart des découvertes clés concernant l'infection causée par le virus de l'herpès simplex ainsi que son traitement ont été faites durant le 20ième siècle. Ces découvertes comprennent les mécanismes viraux menant à la latence et à la réactivation, au développement de l'acyclovir qui fut la première molécule démontrée comme ayant une activité inhibitrice sélective contre la réplication du VHS. Cependant, peu après sa découverte, on observe déjà de la résistance virale qui affecte principalement les individus immunosupprimés tels que les patients sidéens, les cancéreux et les individus transplantés. Aujourd'hui, d'autres antiviraux sont également disponibles, mais aucun d'entre eux n'est curatif. Malheureusement, les individus infectés le resteront donc pour le restant de leurs jours.

Dû à sa grande distribution à travers le monde, à ses propriétés biologiques particulières et à sa grande complexité, le virus de l'herpès simplex est probablement, l'un des virus les plus fascinant que l'homme ait connu. Les travaux de recherches présentés dans cette thèse de doctorat ont comme sujet principal la résistance du virus de l'herpès simplex aux antiviraux. Par contre, avant de plonger dans ce sujet passionnant, il convient d'amener convenablement cette problématique en introduisant les principales propriétés de base du virus. L'introduction générale qui suivra a donc pour but de soulever les sujets les plus importants et les plus pertinents à l'étude du virus de l'herpès simplex. Un accent sera évidemment mis sur les traitements contre l'infection virale et plus particulièrement sur la résistance du virus aux antiviraux. La problématique qui a mené aux différents objectifs des

travaux de recherches de même que ceux-ci seront également bien précisés. Les résultats obtenus au cours de ces recherches ont pu être publiés dans des revues scientifiques et les textes intégraux de ces publications sont donc insérés dans les chapitres II à IV et comprennent les sections des matériels et méthodes, des résultats et des discussions des différents sujets traités. La contribution de chacun des auteurs aux travaux présentés dans ces manuscripts est également précisée. Une conclusion générale ainsi que quelques perspectives de recherches termineront enfin le document. Pour les lecteurs passionnés les plus aguerris, un article révisant la littérature sur le sujet de la résistance des virus herpétiques aux antiviraux et publié par notre groupe de recherche dans une revue scientifique est présenté en tant qu'annexe à la thèse de doctorat.

1 Chapitre I :Introduction Générale

1.1 Le virus *Herpes simplex*-classification et généralités

Le virus de l'herpès simplex (VHS) fait partie de la grande famille des *Herpesviridae*. Ces virus sont grandement disséminés dans la nature et plus de 130 membres ont été identifiés jusqu'à maintenant (Roizman & Pellet, 2001). Les virus herpétiques partagent certaines caractéristiques physiologiques telles que leur structure, un large génome d'ADN double brin, des traits généraux de leur cycle de réplication, et notamment, leur capacité à établir la latence. Neuf virus herpès humains (VHH) ont été isolés jusqu'à maintenant (VHH-1 à –8; VHH-6A et -6B) (voir Tableau 1, p.5) et certaines particularités de leurs propriétés biologiques ont mené à leur subdivision en trois sous-familles; les *Alphaherpesvirinae*, les *Betaherpesvirinae*, et les *Gammaherpesvirinae*. Les genres *Simplexvirus* (VHS-1 et –2), et *Varicellovirus* (VHH-3 ou varicella-zoster virus (VZV)) sont compris dans la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*. Ces virus ont été initialement regroupés en raison de la variété de cellules qu'ils peuvent infecter, leur rapidité de propagation en culture cellulaire, leur efficacité à détruire les cellules qu'ils infectent (cycle lytique) et leur capacité à établir la latence, principalement dans les ganglions sensitifs (Roizman & Pellet, 2001). De façon typique, le VHS-1 entraîne des infections orolabiales, alors que le VHS-2 infecte les muqueuses génitales. Le VZV quant à lui, est l'agent étiologique de la varicelle et ses réactivations chez les individus plus âgés ou chez les personnes immunosupprimées sont associées à des épisodes de zona. Les *Betaherpesvirinae* comprennent les genres *Cytomegalovirus* (VHH-5 ou CMV) et *Roseolovirus* (VHH-6A, VHH-6B, et VHH-7) qui sont principalement caractérisés par le nombre restreint de cellules qu'ils peuvent infecter. Leur cycle réplicatif est plus long, et ceux-ci se propagent plus lentement en culture cellulaire. Ces virus et particulièrement le CMV entraînent typiquement un élargissement des cellules infectées (cytomégalie). Les sites de latence de ces virus ne sont pas encore tous connus, mais il semble que celle-ci peut s'établir dans des glandes sécrétrices (salivaires), des cellules lymphoréticulaires, des cellules rénales, et d'autres tissus (Roizman & Pellet, 2001). Le CMV est associé à plusieurs syndromes cliniques, notamment chez les individus immunosupprimés (spécialement les individus transplantés

récipiendaires d'organes ou de moelle osseuse). Encore aucune évidence n'associe le VHH-6A à une maladie spécifique, mais celui-ci est souvent isolé chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Roizman & Whitley, 2001). D'un autre côté, l'éventail de syndromes reliés au VHH-6B est en continuelle expansion, et il est entre autre relié à la roséole chez l'enfant et à des encéphalites chez les transplantés (Yamanishi *et al*., 1988). Le VHH-7 est également un des agents causal de la roséole (Tanaka *et al*., 1994). Finalement, les *Gammaherpesvirinae* incluent deux genres : les *Lymphocryptovirus* (VHH-4, ou virus Epstein-Bar (EBV)) et les *Rhadinovirus* (VHH-8, ou virus associé au sarcome de Kaposi). Ceux-ci se distinguent par leur capacité à se répliquer *in vitro* dans des cellules lymphoblastiques, et certains peuvent mener à une infection lytique dans des cellules de type épithélial et fibroblastique. Les virus de cette sous-famille infectent préférentiellement les lymphocytes B et les sites de latence semblent se situer majoritairement dans les tissus lymphoïdes (Roizman & Pellet, 2001). Ces virus possèdent également un pouvoir de transformation des cellules (oncogénicité). L'infection au EBV peut se manifester par une mononucléose et ce virus est également impliqué dans plusieurs néoplasies telles que le lymphome de Burkitt, le carcinome nasopharyngé, et le syndrome lymphoprolifératif en post-transplantation. Le EBV est également fréquemment isolé chez les patients atteints du SIDA (Cohen, 2000, Roizman & Whitley, 2001). Le VHH-8 est le virus herpétique le plus récemment identifié et il est maintenant reconnu comme étant l'agent étiologique du sarcome de Kaposi. Il a également un rôle à jouer dans le syndrome de Castelman, ainsi que dans certains lymphomes par exemple ceux des cavités corporelles (Cannon & Cesarman, 2000, Roizman & Whitley, 2001, Schulz, 2000).

Tableau 1. Virus de la famille des *Herpesviridae* humains

Désignation	Noms communs	Genre	Sous-famille
Virus herpès humain 1 (VHH-1)	Virus herpès simplex 1 (VHS-1)	Simplexvirus	Alpha (α)
Virus herpès humain 2 (VHH-2)	Virus herpès simplex 2 (VHS-2)	Simplexvirus	Alpha (α)
Virus herpès humain 3 (VHH-3)	Virus Varcella-Zoster (VZV)	Varicellovirus	Alpha (α)
Virus herpès humain 4 (VHH-4)	Virus Epstein-Barr (EBV)	Lymphocryptovirus	Gamma (γ)
Virus herpès humain 5 (VHH-5)	Cytomégalovirus (CMV)	Cytomégalovirus	Bêta (β)
Virus herpès humain 6A et 6B (VHH-6A, VHH-6B)		Roséolovirus	Bêta (β)
Virus herpès humain 7 (VHH-7)		Roséolovirus	Bêta (β)
Virus herpès humain 8 (VHH-8)	Herpès virus associé au Sarcome de Kaposi	Rhadinovirus	Gamma (γ)

1.2 La structure du VHS

Le VHS a été le premier virus herpétique identifié et est l'un des virus les plus étudiés à travers le monde. Le VHS, tout comme les autres membres de la familles des *Herpesviridae*, se caractérise par quatre éléments distincts ; I) un corps dense aux électrons comprenant l'ADN double brin; II) une capside icosapentahédrale; III) un tégument (une couche protéique amorphe entourant la capside) et; IV) une enveloppe (Figure 1, p.6). L'ADN linéaire double brin loge dans la capside et comprend au minimum 152 kbp. La capside est constituée de 162 capsomères, 150 hexons et 12 pentons et mesure environ 100 nm de diamètre. Elle est entourée de façon très étroite avec le tégument qui comprend des protéines impliquées dans l'initiation précoce de la réplication virale (αTIF ou VP16 et vhs (*virion host shutoff protein*)). L'enveloppe entoure à son tour la capside et le tégument, et

consiste en une membrane lipidique trilamellaire variant entre 170 et 200 nm de diamètre. L'enveloppe virale comprend environ 12 types de glycoprotéines de surface différentes (gB à gM) dont plusieurs sont impliquées dans l'attachement et la pénétration du virus dans la cellule hôte. Deux de ces glycoprotéines (gB et gD) sont utilisées pour le développement de vaccins contre l'infection au VHS, et la gG comprend suffisamment de différences en acides aminés (aa) pour servir de marqueur de différentiation pour le sérotypage du VHS (type 1 vs type 2).

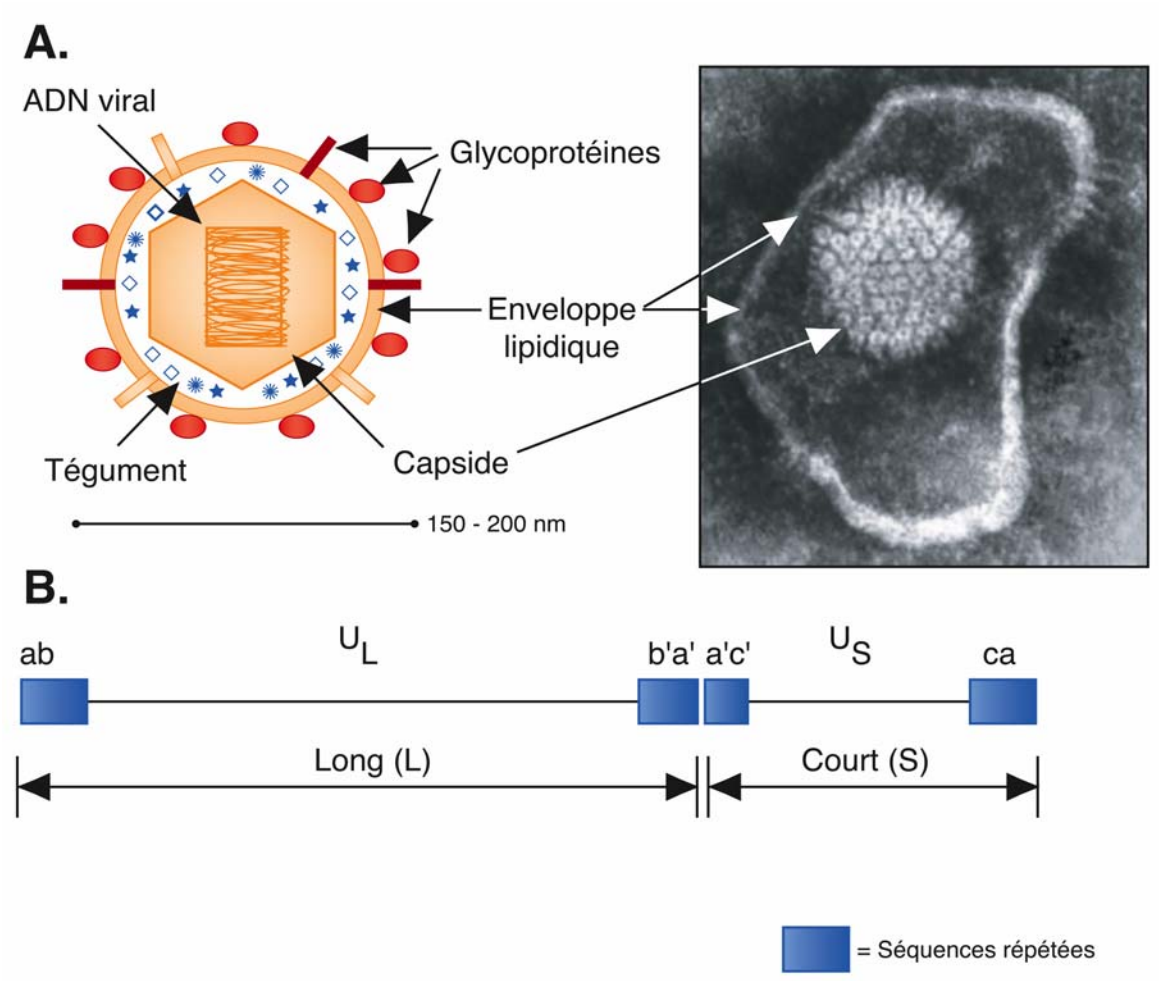

Figure 1. Structure du VHS et organisation du génome.

Le virion du VHS (A) est composé de quatre principaux éléments : I) un corps dense aux électrons comprenant; II) un ADN double brin; III) une capside icosapentahedrale et ; IV) une enveloppe. Ces composantes structurales peuvent également être visualisées en microscopie électronique (à droite). Le génome du VHS (B) est constitué de deux segments désignés L (long) et S (*short* : court), liés de façon covalente et flanqués par de larges séquences répétées.(Modifié de (Taylor *et al*., 2002))

1.3 Organisation du génome

Le génome du VHS est constitué de deux segments désignés L (long) et S (*short* : court), liés de façon covalente (Figure 1, p.6). Chacun de ces segments est composé d'une séquence unique (U_L ou U_S) flanquée par de larges séquences répétées inversées (SRI). Les SRI situées aux extrémités du segment U_L sont désignés ab et b'a', alors que celles du segment U_S sont nommées a'c' et ca. Les deux segments du génome peuvent donc être inversés et combinés de diverses façons de manière à former jusqu'à quatre isomères qui diffèrent uniquement par l'orientation relative de leurs séquences (Roizman & Knipe, 2001). Le génome des souches de VHS varie entre 152 kbp et 155 kbp dépendant des souches. La variabilité de leur taille est principalement due aux variations du nombre de réitérations des SRI (Whitley *et al*., 1998). Le contenu en nucléotides G et C est de 68% pour le VHS-1 et de 69% pour le VHS-2. L'un et l'autre types possèdent un pourcentage G+C plus élevé que celui des autres virus herpétiques humains (Roizman & Pellet, 2001). L'homologie entre le génome complet des virus de type 1 et 2 est d'environ 85%. Les VHS-1 et –2 codent pour au moins 84 polypeptides différents (Ward & Roizman, 1994b).

Les gènes viraux sont généralement nommés selon leur localisation dans chacun des segments U_L et U_S, suivi d'un numéro correspondant à leur position relative de gauche à droite. Les protéines virales sont nommées basées sur leur propriété générale i.e. protéine infectieuse cellulaire (ICP) ou protéine du virion (VP), ou selon leur fonction respective (ex : gène UL23=Thymidine kinase). Dans certains cas, elles peuvent être identifiées par le gène duquel elles sont transcrites. Les gènes compris dans les séquences uniques sont présents en une seule copie, alors que ceux encodés dans les séquences répétées sont présents en deux copies dans le génome. Les séquences répétées "a" sont importantes pour la circularisation de l'ADN suite à l'infection, et dans l'emballage de l'ADN viral dans les capsides préformées. Les séquences *pac*1 et *pac*2 situées dans ces régions, assurent en partie cette fonction en clivant l'ADN concatémère nouvellement formé et en l'emballant dans les virions (Taylor *et al*., 2002). Les séquences "b" codent entre autre pour une protéine (ICP0) impliquée dans la régulation des gènes très précoces. Le segment U_L code pour plus de 60 protéines distinctes qui sont entre autre impliquées dans la réplication de

l'ADN viral et dans la formation de la capside. Les séquences "c" codent pour un activateur (ICP4) essentiel à la transcription des gènes très précoces. Finalement, le segment U_S code pour quatorze protéines dont les glycoprotéines de l'enveloppe virale (Roizman & Knipe, 2001).

Le génome du VHS comprend trois origines de réplication nommées selon leur localisation (oriL ou oriS). OriL est retrouvée en une seule copie dans le segment U_L, alors que oriS, située dans une séquence répétée du segment U_S, est présente en deux copies. Les oriL et oriS sont des séquences palindromiques constituées d'un centre riche en nucléotides A et T, flanquées par des séquences inversées répétées comprenant plusieurs sites de liaisons pour la protéine d'origine UL9. Seulement une de ces oris est nécessaire à l'initiation de la réplication de l'ADN viral (Taylor *et al*., 2002)

1.4 La réplication du VHS

L'infection productive d'une cellule par le VHS requiert plusieurs étapes clés incluant I) l'entrée du virus, II) l'expression des gènes viraux; III) la synthèse de l'ADN viral et; IV) l'assemblage et le bourgeonnement des virions (Roizman & Knipe, 2001) (Figure 2, p. 9).

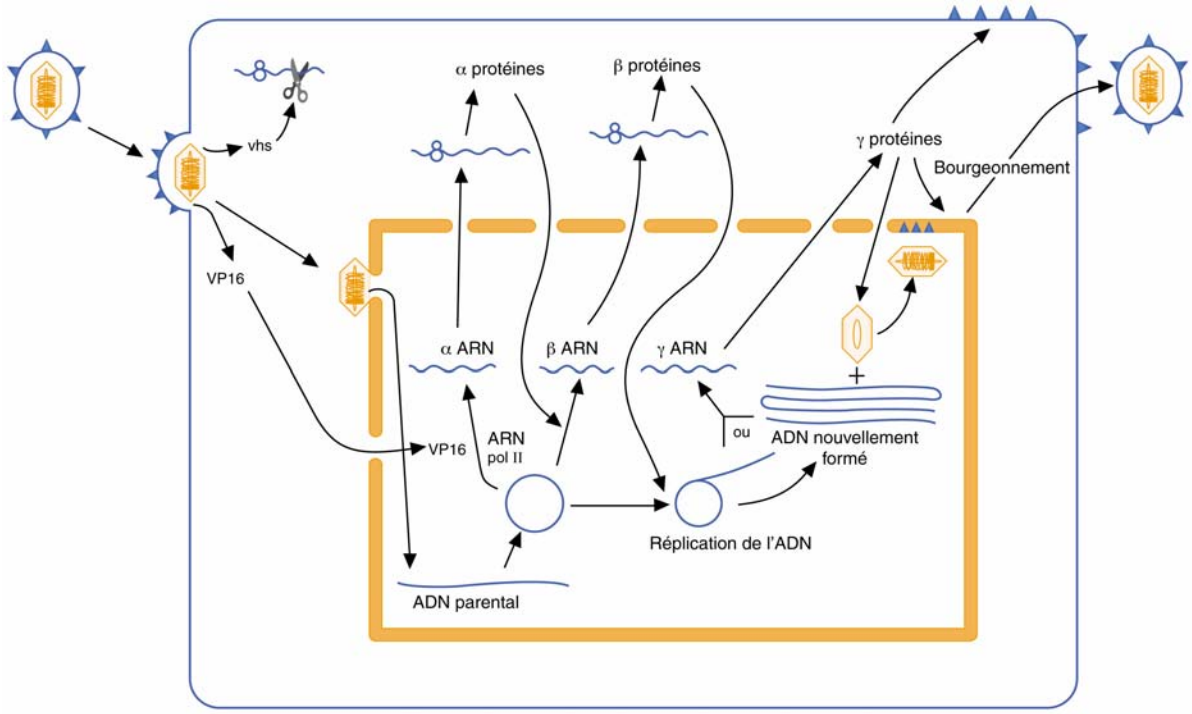

Figure 2. Schéma du cycle de réplication du VHS dans une cellule hôte.
(Modifiée de (Roizman & Knipe, 2001)).

1.4.1 Attachement et entrée du virus

Pour initier l'infection, le VHS doit s'attacher à des récepteurs présents à la surface des cellules et fusionner son enveloppe avec la membrane cellulaire. Les glycoprotéines de l'enveloppe du VHS assurent l'attachement et la pénétration du virus dans les cellules. Il est à noter qu'elles induisent également une réponse immunitaire de l'hôte contre le virus. Des douze glycoprotéines de l'enveloppe du VHS, les gB, gC, gD, gH et gL semblent spécifiquement impliquées dans ce processus. Les gE et gI forment une partie du récepteur Fc, alors que la fonction des autres glycoprotéines n'est pas encore tout à fait connue (Whitley, 2001). L'attachement du virus est initiée par l'interaction de la gC et de la gB avec les glycosaminoglycans du sulfate d'héparane de la surface cellulaire. Malgré le fait que ces interactions intensifient l'efficacité de l'infection, la gC ne semble pas absolument indispensable à cette étape (Herold *et al*., 1991) puisque des cellules n'exprimant pas le sulfate d'héparane demeurent permissives à l'infection par le VHS (Shieh *et al*., 1992,

WuDunn & Spear, 1989). L'attachement viral est stabilisé par l'interaction de la gD et l'un des nombreux co-récepteurs cellulaires nouvellement identifiés (Spear *et al*., 2000). Ces récepteurs appartiennent à trois grandes familles et ceux-ci sont maintenant nommés protéines herpétiques de l'entrée virale (Hve). HveA fait partie de la famille des récepteurs du facteur tumoral nécrosant alpha (TNF-α). HveB, HveC (également connu sous le nom de nectin-1α) et HIgR (nectin-2α) sont inclus dans la superfamille des immunoglobulines. Finalement, une troisième famille de récepteur comptant un seul membre a été identifiée et consiste en un protéoglycan de sulfate d'héparan modifié (3-O-heparane sulfate sulfaté) (Shukla *et al*., 1999). HveC demeure le principal co-récepteur cellulaire nécessaire à l'infection des cellules humaines par le VHS. La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire s'effectue par un mécanisme encore inconnu, mais qui semble nécessiter la gB (Ligas & Johnson, 1988, Sarmiento *et al*., 1979) et l'hétérodimère gH-gL (Forrester *et al*., 1992). La nucléocapside et les protéines du tégument sont alors libérées dans le cytoplasme de la cellule hôte. La nucléocapside et certaines protéines du tégument (VP16, VP1-2) sont transportées dans le noyau via les microtubules, alors que les autres protéines du tégument (vhs, US11) demeurent dans le cytoplasme de la cellule (Roizman & Knipe, 2001).

1.4.2 Expression des gènes

Les virus à ADN se servent de la cellule hôte de manière à exprimer leurs propres protéines nécessaires à leur réplication et à leur prolifération. De façon générale, les virus expriment deux types de protéines; les protéines non-structurales impliquées dans la réplication de l'ADN viral et les protéines de structure qui forment le virion et une partie de l'enveloppe virale (Taylor *et al*., 2002). Tous les virus herpétiques partagent la caractéristique d'une expression séquentielle hautement régulée de leurs gènes (Honess & Roizman, 1974). Les gènes du VHS peuvent donc être classés en trois groupes selon leur apparition dans le temps: I) les gènes très précoces (α); II) les gènes précoces (β) et; III) les gènes tardifs (γ). Les gènes α sont transcrits immédiatement suite à l'infection et assurent la transcription des gènes β qui codent pour des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN viral. Certaines protéines virales α et β entraînent également l'expression des gènes γ, qui codent

majoritairement pour des protéines structurales (Whitley, 2001). Les événements clés de la réplication du VHS, i.e. la transcription de l'ADN, la synthèse, l'assemblage de la capside, l'emballage de l'ADN et l'acquisition de l'enveloppe, prennent place dans le noyau de la cellule infectée (Roizman & Knipe, 2001).

Très tôt suite à l'infection (2 à 4 h), les gènes α sont exprimés. L'ARN polymérase II cellulaire est responsable de la synthèse de tous les ARNm viraux (Alwine *et al*., 1974, Costanzo *et al*., 1977). L'expression des gènes α est indépendante des enzymes virales, étant stimulée par un facteur régulateur de transcription appelé αTIF ou VP16 (Batterson & Roizman, 1983). Ce facteur est encodé par le gène viral UL48 et fait partie des protéines composant le tégument du virus. αTIF se combine à d'autres facteurs régulateurs cellulaires tels que Oct-1 et HCF (Preston, 2000) et active la transcription des gènes α en se liant à une séquence TAATGARAT située en amont de ces gènes. Une autre protéine du tégument, le produit du gène UL41 (vhs), interagit avec une protéine cellulaire et dégrade rapidement l'ARNm suite à l'infection, bloquant ainsi l'induction des gènes cellulaires. Des six protéines α synthétisées, cinq sont impliquées dans le cycle réplicatif du virus (ICP0, ICP4, ICP27, ICP22, US1.5), et par le fait même, modifient plusieurs fonctions clés de la cellule hôte. Une autre protéine (ICP47) bloque la présentation des antigènes à la surface des cellules infectées. Ces protéines sont dites multifonctionnelles et stimulent l'expression subséquente des gènes β et γ. Par exemple, en plus d'être un activateur indispensable à la transcription de tous les gènes précoces et tardifs (Dixon & Schaffer, 1980, Watson & Clements, 1980), ICP4 possède une fonction d'autorégulation en se liant avec des éléments répresseurs sur son propre promoteur (Faber & Wilcox, 1986, Kristie & Roizman, 1984). La diminution des niveaux d'ICP4 mène alors à la réduction de l'expression des gènes précoces et tardifs. La protéine ICP0 n'est pas absolument essentielle à la réplication virale *in vitro*, mais augmente significativement l'activité transcriptionelle de la protéine ICP4. ICP27, pour sa part, est essentielle à la transcription des gènes tardifs (Jean *et al*., 2001). De plus, elle inhibe la maturation des ARN en empêchant leur épissage (Hardy & Sandri-Goldin, 1994). Contrairement aux gènes cellulaires, la plupart des transcrits viraux ne nécessitent pas d'épissage, et l'effet net d'une telle inhibition résulte en une diminution de la synthèse des protéines cellulaires. Les fonctions de ICP22 ne sont pas encore très bien

comprises, mais elles semblent modifier l'ARN polymérase II cellulaire et optimiser l'expression de ICP0 (Carter & Roizman, 1996, Long *et al*., 1999).

La deuxième classe de gènes exprimés sont les gènes β ou précoces. Tel que discuté précédemment, l'expression de ces gènes nécessite absolument la fonction des protéines ICP4 et ICP27, et la synthèse des protéines β atteint un niveau maximum de 5 à 7 h suivant le début de l'infection. Ces dernières sont majoritairement impliquées dans la réplication de l'ADN viral. Sept protéines virales issues de ces gènes sont strictement essentielles à la réplication de l'ADN virale (UL9, UL29, UL5/UL52, UL8, UL30, et UL42) dont on verra les détails dans la section suivante. Les autres, notamment la thymidine kinase virale (UL43), la ribonucléotide réductase (UL39/UL40), la dUTPase (UL50), et l'uracyl ADN glucosylase (UL2), contrôlent le métabolisme des nucléotides. On verra que plusieurs protéines β sont la cible de la thérapie antivirale courante (ADN polymérase : UL30, et thymidine kinase: UL23) et en cours de développement. On peut également subdiviser les protéines β en deux groupes selon l'initiation de leur expression dans le temps. Les gènes β1 sont exprimés très précocement et de façon presque concomitante aux protéines α. Ce groupe de gènes est exemplifié par le gène UL29, codant pour la protéine de liaison à l'ADN simple brin (ICP8), et par le gène UL39, codant pour la grosse sous-unité de la ribonucléotide réductase (ICP6). Les gènes β_2 pour leur part, sont exprimés dans un laps de temps un peu plus long suite à l'expression des protéines α. Le gène UL23 codant pour la thymidine kinase (TK) virale est représentatif de ce groupe de gènes (Roizman & Knipe, 2001).

Finalement, les gènes exprimés plus tardivement, i.e. les gènes γ, sont principalement impliqués dans la formation de la structure du virion. Les protéines synthétisées sont alors assemblées pour former la capside et le tégument du virion. Le niveau d'accumulation de ces protéines atteint son maximum suivant le début de la synthèse de l'ADN viral et l'expression de ces gènes est stimulée par la synthèse de l'ADN. Cependant, les gènes précoces/tardifs ou γ1 (par exemple : ceux codants pour ICP5, gG, gD, et ICP34.5) sont exprimés relativement tôt suite à l'infection et sont stimulés au départ par les gènes très précoces. Leur niveau se voit significativement augmenté par l'initiation de la réplication

de l'ADN viral. D'un autre côté, les gènes γ2 typiques (i.e., UL44 : gC, UL41 :vhs, UL36 : ICP1-2, UL38 :ICP32/VP19C, et US11) sont exprimés plus tardivement dans l'infection et la synthèse de ces protéines est complètement freinée par des inhibiteurs de la réplication de l'ADN viral (Roizman & Knipe, 2001).

Des 84 polypeptides différents codés par le VHS (Ward & Roizman, 1994b), au moins 47 ne sont pas essentiels à la réplication virale en culture cellulaire. Cependant, ils peuvent être nécessaires à la complémentarité des gènes cellulaires non exprimés dans les cellules très différenciées, ou pour altérer le métabolisme cellulaire et ainsi assurer l'efficacité de la réplication virale (Whitley & Roizman, 2001). De plus, plusieurs de ces gènes sont impliqués dans l'inhibition des mécanismes de défense de la cellule hôte. Le rôle de certaines protéines virales impliquées dans ce processus a été mentionné plus haut (vhs, ICP47, ICP27). L'apoptose est également un mécanisme de défense cellulaire important en réponse à l'infection virale, et trois protéines virales (US3, gJ, et gD) ont été identifiées comme ayant une action inhibitrice de l'apoptose (Whitley & Roizman, 2001). De plus, l'accumulation d'ARN viral complémentaire stimule l'activation de la protéine kinase R cellulaire qui phosphoryle un facteur d'initiation de la traduction (eIF-2α) menant à l'arrêt de la synthèse des protéines. Pour contrecarrer cet effet, la protéine virale ICP34.5 ou $\gamma_1$34.5 se lie à une phosphatase cellulaire et désarme ce mécanisme de défense cellulaire (Ward & Roizman, 1994a).

1.4.3 Réplication de l'ADN viral

La réplication de l'ADN viral s'effectue dans des structures spécialisées formées dans le noyau de la cellule infectée, nommées compartiments de réplication (Quinlan *et al*., 1984)). L'ADN linéaire viral nouvellement arrivé dans la cellule hôte se circularise à son entrée dans le noyau (Uprichard & Knipe, 1996) (Figure 2, p.9). La réplication de l'ADN est alors initiée à l'une des trois origines de réplication. Tel que discuté précédemment, la réplication de l'ADN viral nécessite absolument l'apport de sept protéines virales. La protéine de liaison d'origine UL9 se lie à des éléments spécifiques dans une des origines de réplication et a pour effet le dédoublement de l'ADN viral. UL9 recrute alors ICP8 (UL29), qui se lie à l'ADN simple brin. Ces deux protéines attirent les cinq autres protéines impliquées dans la

réplication de l'ADN (UL5/UL52, UL8, UL30, UL42). Le complexe hélicase primase (UL5/UL52/UL8) et l'ADN polymérase (pol) virale (UL30) s'associent et initient des cycles de réplication en mode thêta (Figure 2, p.16). L'ADN pol est une holoenzyme comprenant deux sous-unités. Une majeure partie catalytique (pol) (UL30) de 136 kD et une plus petite (UL42) de 65 kD qui se lie en C terminal et stimule la processivité de l'enzyme (Roizman & Knipe, 2001). L'interaction de ces deux unités est requise pour la réplication de l'ADN viral. L'ADN pol du VHS possède une spécificité pour un vaste éventail de substrats comparativement aux enzymes cellulaires, ce qui en fait une cible de choix pour les antiviraux présentement disponibles pour le traitement du VHS. Le gène de l'ADN pol sera décrit de façon plus détaillée dans une autre section de ce chapitre (1.13.3.2, p.90). La réplication virale transfert ensuite du mode thêta au mode du cercle roulant par un mécanisme encore inconnu. Ce dernier mode de réplication produit des ADN viraux concatémères qui seront ensuite clivés en monomères durant l'empaquetage de l'ADN viral (Roizman & Knipe, 2001, Taylor *et al*., 2002).

1.4.4 Assemblage, encapsidation et bourgeonnement

L'assemblage de la capside virale requiert la synthèse de plusieurs protéines virales tardives. Les quatre principales protéines de la capside (UL19 :VP5, UL38 :VP19c, UL18 :VP23 et UL35 :VP26), la protéine d'échafaudage codée par le gène UL26.5 et la protéase UL26 sont nécessaires à ce processus. D'autres protéines ont également été impliquées dans l'assemblage de la capside, mais ne sont pas indispensables, du moins dans des systèmes *in vitro* (Taylor *et al*., 2002). Les capsides vides sont alors chargées de l'ADN viral par un processus qui implique simultanément le clivage de l'ADN concatémère en de simples unités monomériques et l'empaquetage de l'ADN, pour ainsi former la nucléocapside (Ladin *et al*., 1980, Ladin *et al*., 1982). Ce mécanisme n'est pas encore très bien connu mais il a été observé que les coupures dans l'ADN s'effectuent à des sites spécifiquement déterminés par la distance entre les sites *pac*1 et *pac*2 (Deiss *et al*., 1986, Varmuza & Smiley, 1985). La protéine codée par le gène UL15 en association avec celle du gène UL26, semblent impliquées dans le clivage de l'ADN en cours de réplication. L'empaquetage de l'ADN viral dans les capsides matures requiert plusieurs protéines

virales incluant le produit des gènes UL6, 15, 17, 25, 28, 32, et 33. Le complexe UL15-UL26, semble initier l'entrée de l'ADN viral dans la capside. L'exonucléase codée par le gène UL12 joue également un rôle dans l'empaquetage de l'ADN viral (Roizman & Knipe, 2001).

Les nucléocapsides bourgeonnent ensuite de la membrane nucléaire interne, d'où ils acquièrent une enveloppe et certaines protéines du tégument. La route suivante empruntée par les virions est encore controversée. Une des hypothèses propose que les virus enveloppés fusionnent avec la membrane nucléaire externe, et que les nucléocapsides alors libérées dans le cytoplasme de la cellule sont ré-enveloppées lors du bourgeonnement à partir des compartiments de l'appareil de Golgi (Roizman & Knipe, 2001). Ces virus ré-enveloppés sont alors déplacés à la surface de la cellule par un transport vésiculaire. L'autre mécanisme suggéré impose que les virions enveloppés soient transportés par mouvements vésiculaires de la membrane externe du noyau vers l'appareil de Golgi et sécrétés à l'extérieur de la cellule (Enquist *et al*., 1999). Certaines évidences récentes sont maintenant en faveur du premier modèle de ré-enveloppement (Skepper *et al*., 2001). Comme les glycoprotéines de l'enveloppe virale sont disséminées dans toutes les membranes de la cellule suite à leur synthèse, elles se retrouvent également à la surface de l'enveloppe virale. La réplication virale est approximativement achevée en l'espace de 18 h et ce processus entraîne des dommages cellulaires irréversibles (Roizman & Knipe, 2001).

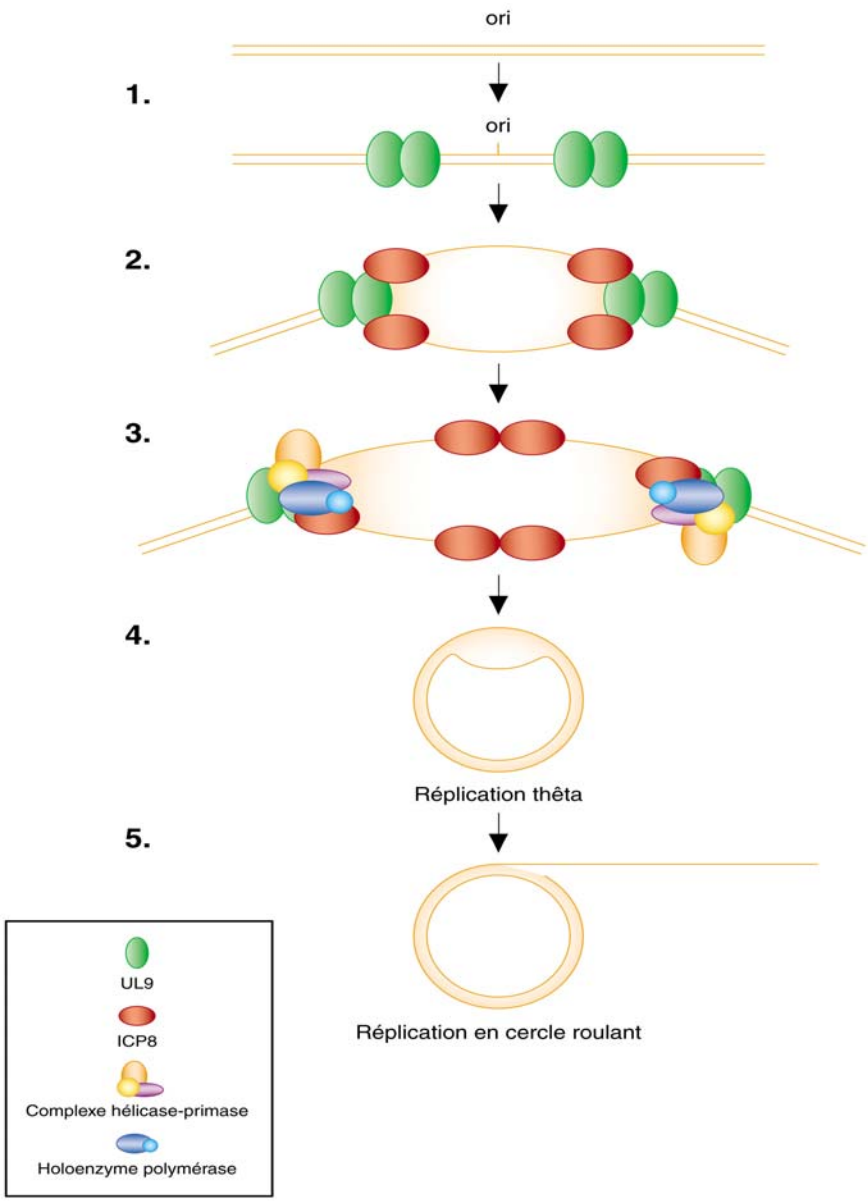

Figure 3. Schéma de la réplication de l'ADN du VHS.

1) La protéine de liaison UL9 se lie à des sites spécifiques sur l'ADN viral (oriL ou oriS) et débute le désenroulement de l'ADN. 2) La seconde protéine de liaison, ICP8 est alors recrutée et se lie à l'ADN simple brin. 3) UL9 et ICP8 recrutent finalement les cinq autres protéines du complexe de réplication et 4) une réplication en mode thêta est alors initiée, pour ensuite passer au mode de réplication du cercle roulant.
(Modifiée de (Roizman & Knipe, 2001, Taylor *et al*., 2002)).

1.4.5 Histopathologie de la cellule infectée

L'histopathologie de l'infection au VHS est le reflet de la mort cellulaire entraînée par l'infection virale et de la réponse inflammatoire associée. La première cellule cible du VHS est la cellule muco-épithéliale sur laquelle les virus se fixent et se multiplient. L'infection virale entraîne le gonflement des cellules qui démontrent alors une chromatine condensée, suivi de la dégénérescence du noyau de celles-ci. Ces cellules perdent leur intégrité membranaire et forment des cellules géantes multinucléées pouvant contenir des inclusions intranucléaires de type Cowdry A. Lors de la lyse cellulaire, un liquide clair (liquide vésiculaire) renfermant une quantité importante de virions est libéré entre l'épiderme et le derme. Ce fluide contient des débris cellulaires, des cellules inflammatoires, et souvent des cellules multinucléées. La lésion caractéristique au niveau de la peau se présente sous la forme d'une vésicule à liquide claire sur un fond érythémateux. Durant le processus de guérison, les vésicules évoluent en pustules, ulcérations et croûtes et ne laissent généralement pas de cicatrice. Sur une muqueuse, l'aspect de la lésion est celui d'une ulcération, du fait de l'érosion du toit de la vésicule (Roizman & Knipe, 2001).

1.5 Pathogenèse : neurovirulence et la latence

Le VHS se caractérise spécialement par deux de ses propriétés biologiques; sa capacité à envahir et à se répliquer dans le système nerveux central (SNC) (i.e. la neurovirulence), et sa capacité à établir une infection latente. Cette dernière propriété est également partagée par les autres membres de la famille des *herpesviridae*, et le lieu de la latence, i.e. les ganglions sensitifs de la moelle épinière, est caractéristique de la sous-famille des *α-herpesvirinae*.

1.5.1 La neurovirulence

La neurovirulence du VHS est habituellement reliée à sa virulence ou pathogénicité et celle-ci peut être évaluée dans des modèles animaux expérimentaux. La souris, le cochon dingue et les lapins sont les animaux les plus utilisés et ceux-ci possèdent des caractéristiques propres aux différents types d'infections étudiées. La souris, en raison de sa

facilité de manipulation, demeure le modèle animal le plus utilisé pour l'étude de la pathogénicité du VHS. Suite à une inoculation intracérébrale ou intranasale du VHS, la réplication virale mène habituellement à une encéphalite et à la mort éventuelle de l'animal. La dose qui entraîne 50% de létalité (DL_{50}) peut donc être mesurée et déterminera la pathogénicité de la souche de VHS. Dans un autre type d'essais, la neurovirulence est évaluée par la capacité de la souche à envahir le SNC et/ou le système nerveux périphérique suite à son inoculation à un site périphérique (cornée, la paume des pattes, oreille). Les titres viraux au niveau de ces sites sont comparés à ceux au niveau du système nerveux. Cette méthode permet également d'évaluer la capacité des virus à entrer en latence dans les ganglions sensitifs de même que le maintien et la réactivation de la latence (discuté à la section 1.5.2, p.18). Malgré le fait que ce dernier modèle d'infection expérimental semble plus réaliste du cours naturel de l'infection chez l'humain, on ne sait pas encore lequel de ces deux modèles prédira le mieux la pathogénicité d'une souche de VHS chez l'humain.

La neurovirulence du VHS semble être une fonction de plusieurs gènes. En effet, la délétion de pratiquement tous les gènes dispensables pour la réplication du VHS *in vitro* mène à une diminution de sa neurovirulence (Roizman & Knipe, 2001). Des mutations affectant la neurovirulence du VHS ont également été identifiées dans les glycoprotéines de l'enveloppe virale (Whitley, 2001). Malgré le fait que des virus mutants portant une délétion du gène $\gamma_1$34.5 se multiplient adéquatement dans plusieurs types de cellules en culture, ces mutants sont parmi les virus les moins virulents identifiés jusqu'à maintenant (Chou *et al*., 1990, Spector *et al*., 1998a, Whitley *et al*., 1993). Le gène de la TK du VHS a également été beaucoup étudié quand à cette propriété du virus et sera discuté de façon plus élaborée dans une prochaine section de ce chapitre (section 1.13.4, p.104).

1.5.2 Établissement, maintien et réactivation de la latence

L'habileté du VHS à entrer en latence et à maintenir cet état durant toute la vie d'un individu infecté est certainement l'une des propriétés les plus remarquables du VHS et dont on ne connaît malheureusement pas encore tous les détails. De façon théorique, la latence peut se définir comme étant une infection durant laquelle le génome viral est présent sous

un état non réplicatif dans une cellule infectée et de laquelle il peut se réactiver de façon intermittente (Miller *et al*., 1998). En période de latence, le génome du VHS est sous une forme circulaire épisomale dans le noyau des cellules nerveuses, et contrairement à l'infection lytique, aucune réplication virale ne peut être détectée. L'intégrité de la cellule hôte n'est pas compromise et les antigènes viraux caractéristiques d'une infection productive ne sont pas exprimés. Seulement quelques transcrits associés à la latence (LAT) peuvent être décelés. Le virus est ainsi à l'abri du système immunitaire de l'hôte infecté qui ne semble pas reconnaître l'infection. Les sites habituels de latence du VHS-1 sont les ganglions sensitifs trigéminés alors que les ganglions sensitifs sacrés sont les sites les plus communs de la latence du VHS-2. De façon périodique, le virus se réactive et est véhiculé par transport axonal vers le site de l'infection initiale. Dépendant de plusieurs facteurs dont entre autre l'état du système immunitaire, cette réactivation entraînera une infection symptomatique ou non. Dans les modèles d'infection animaux, les virus sont inoculés à des sites périphériques où ils se répliquent et la latence s'instaure dans les ganglions à proximité. Cependant, contrairement à l'humain, la réactivation du virus chez l'animal s'effectue rarement de façon spontanée et il devient difficile de rapporter les observations obtenues chez l'animal à l'infection chez l'humain. La latence du VHS peut être divisée en trois phases : I) l'établissement; II) le maintien et; III) la réactivation de la latence.

L'établissement de la latence est précédé par la réplication du VHS à des sites périphériques (muqueuses). Dès lors, des virus pénètrent dans les terminaisons nerveuses des nerfs sensitifs innervant l'épithélium des muqueuses et sont transportés de façon rétrograde par le flot axonal-dépendant des microtubules, jusqu'aux noyaux des cellules nerveuses (Lycke *et al*., 1984) (Figure 4, p.20). Les virus peuvent alors entrer dans un cycle de réplication productif ou lytique. En fait, il a été démontré que la réplication virale s'effectue dans une minorité de neurones et que finalement, après quelques semaines (4 semaines post-infection chez la souris), les virus sont présents dans les ganglions sous une forme passive (Miller *et al*., 1998). D'après les études *in vitro*, il est clair que la réplication virale et les protéines α-TIF, ICP4, et ICP27, essentielles à l'infection lytique, ne sont pas requises pour l'établissement de la latence (Sedarati *et al*., 1993). D'ailleurs, les virus possédant des mutations dans les gènes codant pour ces protéines semblent tous capables

d'entrer en latence, alors que la réactivation et le maintien de celle-ci paraîssent en être affectés.

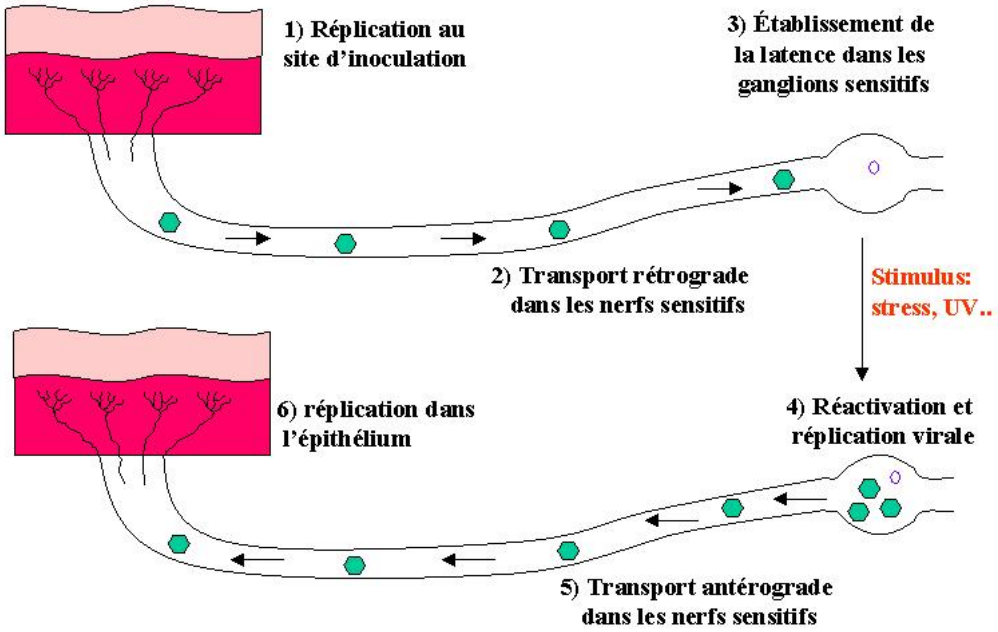

Figure 4. Représentation schémative des différentes étapes menant à la latence et à la réactivation du VHS.

L'hypothèse la plus plausible jusqu'à maintenant concernant l'établissement de la latence est un mécanisme dit par "défaut". L'expression des gènes viraux α semble en effet être réprimée par certains facteurs cellulaires et viraux (Preston, 2000). Les facteurs de transcription cellulaire (c-*jun*, c-*fos*, et Oct-1) nécessaires à l'expression des gènes viraux (Sedarati *et al.*, 1993) sont absents ou présents en faible proportion dans les cellules neurales hautement différenciées, ce qui pourrait restreindre l'expression des gènes α du VHS. D'un autre côté, les cellules neurales expriment d'autres facteurs de transcription

(Oct-2, et N-Oct-3) qui pourraient entrer en compétition avec VP16 pour les sites de liaison au facteur de transcription cellulaire Oct-1 (Kemp *et al*., 1990) et mener à la répression de l'expression des gènes α. Certains investigateurs ont suggéré que les niveaux réduits de VP16 dans les cellules neurales pourraient être en partie occasionnés par la délétion d'une certaine portion des protéines du tégument du VHS en périphérie (Sears *et al*., 1991). L'absence ou la diminution de l'efficacité de VP16 entraînerait une diminution des niveaux d'expression de ICP0 et de ICP4, importantes à l'initiation de l'infection lytique (Miller *et al*., 1998). Les LATs pourraient également être impliqués dans le processus de répression de ces gènes.

Tel que mentionné plus haut, les LATs sont les seuls transcrits viraux détectés dans les neurones durant l'infection latente et, de ce fait, sont considérés comme étant les marqueurs de l'état de latence du VHS (Cohrs *et al*., 2000). Ceux-ci consistent en 4 types d'ARN hautement conservés; un long transcrit instable (8,3 kb) et trois autres transcrits très stables (2,0, 1,5, et 1,45 kb) qui s'accumulent abondamment dans les cellules infectées (Krause *et al*., 1988, Rock *et al*., 1987, Stevens *et al*., 1987). Ces transcrits dérivent de séquences présentes dans les régions répétées "b" du segment U_L du génome du VHS. Le rôle des LATs n'est cependant pas encore bien compris. Ils sont aussi bien détectés durant l'infection latente que durant l'infection lytique, et des virus portant une délétion pour ces séquences sont tout de même capables d'entrer, de maintenir et de se réactiver de la latence (Wagner & Bloom, 1997). Cependant, ces derniers expriment des niveaux beaucoup plus élevés de gènes α (Garber *et al*., 1997) et le rôle des LATs serait donc de réprimer l'expression de ceux-ci. Aucune protéine codée par les LATs n'a été clairement identifiée jusqu'à maintenant, mais ils sembleraient exercer leur fonction de répression par un mécanisme anti-sens. En effet, une portion du LAT de 8,3 kb chevauche partiellement avec les ARNm de ICP0 et de ICP4 (Chen *et al*., 1997). Un autre rôle pour les LATs consisterait en la protection des neurones contre l'apoptose, ce qui permettrait à ces cellules de supporter l'infection latente (Perng *et al*., 2000). D'autres investigations sont cependant nécessaires afin d'élucider plus clairement le rôle de ces transcrits.

Le maintien du génome du VHS dans un état de latence semble passif, i.e. qu'il ne requiert pas l'expression de gènes viraux spécifiques ou d'un produit génétique quelconque. En fait, les facteurs impliqués dans le maintien de la latence virale ne sont pas encore bien compris. Des études récentes ont permis de démontrer que de 43 à 678 copies du génome viral sont présentes par 100 ng d'ADN de ganglions trijumeaux d'individus infectés par le VHS-1 (Cohrs *et al*., 2000). De plus, les LATs sont constamment détectés dans les ganglions comprenant des virus latents et, basé sur leur détection, de 0,1 à 3% des neurones comprennent des génomes de VHS maintenus en latence (Mehta *et al*., 1995, Sawtell, 1997). Cependant, puisque ce ne sont pas toutes les cellules qui expriment des niveaux détectables de LATs, ces valeurs sont certainement très sous-estimées. Jusqu'à maintenant, aucun facteur cellulaire n'a été identifié dans le processus de maintien de la latence du VHS *in vivo*. Toutefois, le facteur de croissance neurale (GNF) semble impliqué à certains égards puisque sa substitution des cultures de ganglions infectés *in vitro* de façon latente entraîne une réactivation instantanée du virus (Block *et al*., 1994, Halford *et al*., 1996, Wilcox & Johnson, 1988). Sa fonction n'a cependant pas encore été déterminée de façon très claire. Aucun gène viral n'a été impliqué de façon définitive dans le maintien de la latence. La TK virale a un rôle soupçonné, mais seulement dû au fait que des virus dépourvus de TK fonctionnelles ont une expression moindre des LATs dans certains modèles d'infection (Tenser *et al*., 1994). Plus récemment, des études ont démontré que des VHS-2 délétés des gènes UL5, et UL29 ont une capacité défective de se maintenir de façon stable dans les ganglions sensitifs trijumeaux (Da Costa *et al*., 1999).

Chez l'humain, la réactivation du virus de son état de latence vers un mode de réplication lytique peut être observée de façon spontanée sans cause évidente ou suite à différents stimuli. Par exemple, un traumatisme local dans les tissus innervés par des neurones infectés de façon latente avec le VHS tel qu'une extraction dentaire, un stimulus systémique tel qu'un stress émotionnel, la fièvre et les menstruations, ou l'exposition aux ultraviolets, sont autant de situations qui peuvent mener à une réactivation du virus de son état de latence (Roizman & Knipe, 2001). Les virus sont alors transportés de façon antérograde le long des axones des nerfs sensitifs infectés, habituellement jusqu'au site périphérique de l'infection initiale ou à des sites voisins (voir Figure 4, p.20). À cet endroit,

les virus se répliquent et entraînent une infection productive associée ou non à des symptômes cliniques. Dans les modèles animaux, l'explantation des ganglions sensitifs, et leur mise en culture avec des cellules permissives entraînent la réactivation des virus latents (Coen *et al*., 1989b, Efstathiou *et al*., 1989, Pelosi *et al*., 1998a). Ce type d'étude a également démontré que la réactivation du VHS-1 se fait seulement à partir de quelques neurones infectés. Par contre, la nature du signal de transduction impliqué dans la réactivation du VHS n'a pas encore été identifiée. Une induction de l'expression de certains facteurs cellulaires (c-*fos*, c-*jun*, c-*myc* et Oct-1), habituellement présents en faible quantité dans les neurones, pourrait être stimulée en raison d'un stress cellulaire quelconque et mener à l'activation de l'expression des gènes viraux (Miller *et al*., 1998). De plus, deux seconds messagers cellulaires (AMPc et protéine kinase C) semblent être impliqués dans le mécanisme de réactivation du VHS *in vitro* et ceux-ci seraient alertés par une variété de stimuli (Slavin *et al*., 1992). En effet, le promoteur des LATs est sensible à l'AMPc et leur présence corrèle avec une réactivation efficace du virus. Les événements de phosphorylation pourraient contribuer à l'activation de facteurs de transcription et de protéines virales (i.e., ICP0 et ICP4) impliquées dans l'expression des gènes viraux (Miller *et al*., 1998).

Contrairement à l'établissement de la latence, divers gènes viraux semblent impliqués dans la réactivation du VHS (Roizman & Sears, 1996). En effet, plusieurs mutants démontrent une incapacité à se réactiver de l'état de latence et parmi ceux-ci, les mutants portant des délétions pour des gènes essentiels à la réplication du virus en culture cellulaire, ainsi que pour les gènes de la TK, ICP0, la ribonucléotide réductase et $\gamma_1$34.5 ont démontré une capacité de réactivation affaiblie ou nulle (Roizman & Knipe, 2001). Certaines mutations spécifiques dans le gène de la TK ont été associées à une capacité du VHS à établir et à maintenir la latence, mais à une incapacité du virus à se réactiver. Le rôle de la TK virale dans ce processus sera discuté de façon plus extensive dans une prochaine section de ce chapitre (section 1.13.4, p.104). De plus, il est probable que l'expression des gènes viraux soit régulée de façon différente dans les cellules neurales. En effet, la séquence d'activation temporelle des gènes α, β et γ dans les cellules supportant l'infection lytique pourrait se voir modifiée dans les neurones (Roizman & Knipe, 2001). Une étude a démontré que les

produits des gènes β (TK, ICP6, et VP5) sont détectables dans les premières heures suite à l'explantation de ganglions infectés (4 h), alors que les transcrits des gènes α sont détectés seulement suite à une période de 8 à 24 h (Tal-Singer *et al*., 1997). Ces observations suggèrent donc que les facteurs neuronaux en cause dans la réactivation du VHS soient probablement moins spécifiques aux gènes α, et que la réplication de l'ADN viral précéderait peut-être l'expression des gènes α (Miller *et al*., 1998). Finalement, le nombre de virus en latence dans une cellule infectée de même que le nombre total de copies du génome du VHS présent dans un ganglion donné semble important dans le mécanisme de réactivation du VHS, en augmentant les probabilités de réactivation des virus (Miller *et al*., 1998, Roizman & Knipe, 2001).

Le destin des neurones suite à la réactivation et à la réplication du VHS est encore un sujet bien débattu. Si ceux-ci succombent à l'infection lytique, comment expliquerait-on que les sujets enclins à plusieurs épisodes d'infections récurrentes ne soient pas affectés par une paralysie au niveau des sites de réactivation. Comme on peut le constater, plusieurs questions concernant le phénomène de la latence du VHS ne sont pas encore résolues et d'autres études sont nécessaires afin d'élucider plus clairement les différents mécanismes impliqués dans la latence du virus. Un nouveau système a été récemment développé par l'équipe de Arthur et ses collaborateurs et consiste en l'utilisation de virus recombinants exprimant un gène rapporteur (β-galactosidase et la protéine fluorescente verte (GFP)) sous le contrôle de promoteurs associés à la latence ou au cycle de réplication lytique du VHS (Arthur *et al*., 2001). Cette nouvelle technologie va certainement permettre de suivre l'infection virale et faciliter l'étude des événements moléculaires impliqués dans l'infection des neurones par le VHS .

1.6 Les infections secondaires au VHS

1.6.1 Terminologie

Il importe tout d'abord de bien définir la terminologie employée pour identifier le type d'infection au VHS qu'un individu peut encourir. Les individus susceptibles à l'infection par le VHS, i.e. qui n'ont jamais été en contact avec le virus et qui ne possèdent donc pas

d'anticorps contre celui-ci, développeront une *infection primaire* suite à une première exposition au VHS-1 ou –2. Ces individus seront maintenant infectés à jamais avec le virus puisqu'on a vu que le VHS a la propriété d'entrer et de maintenir un état de latence. Dans certains cas, le virus peut se réactiver et entraîner une *infection récurrente* symptomatique ou non. Une *infection initiale* consiste en l'infection d'un individu déjà immunisé avec un virus de type 1 ou 2, et qui développe une première infection avec le virus du type opposé. Finalement, quoique très peu commun chez les individus immunocompétents, une *réinfection exogène* peut survenir. L'individu est donc infecté avec plus d'une souche de VHS du même type (Whitley *et al*., 1998).

1.6.2 Transmission du VHS

Chez l'humain, la transmission du VHS dépend de contacts intimes durant lesquels il y a échange de salive, de sperme, de liquide cervical ou de fluide vésiculaire provenant de lésions infectées, entre un individu qui excrète du VHS et une personne susceptible. Le virus doit entrer en contact avec une muqueuse ou de la peau abrasée pour qu'il y ait initiation de l'infection. Aucun vecteur animal n'a été décrit pour l'infection causée par les VHS humains et ces derniers demeurent donc le seul réservoir pour la transmission du virus. Il ne semble pas non plus y avoir de variations saisonnières dans l'incidence de l'infection (Roizman & Knipe, 2001). Puisque l'infection au VHS est rarement fatale, et que le virus demeure à l'état de latence, une personne infectée demeurera une source d'infection constante tout au long de sa vie. Le VHS-1 est habituellement transmis par la salive ou par auto-inoculation (pouce, œil) et est acquis tôt dans l'enfance. Le VHS-2 pour sa part, est généralement transmis par des contacts sexuels et par auto-inoculation avec des lésions génitale ou anorectale. Le VHS-1 peut-être transmis assez fréquemment par contact oro-génital tandis que la transmission du VHS-2 de la sphère génitale à la cavité orale est très rare (Scott *et al*., 1997). De façon intéressante, cependant, les infections génitales causées par le VHS-1 sont habituellement à la fois moins sévères et moins susceptibles d'entraîner des récurrences (Lafferty, 2002, Lafferty *et al*., 1987). Il y a également de plus en plus d'évidences qui suggèrent que la présence d'anticorps contre le VHS-1 protège quelque peu contre l'infection au VHS-2 (Bryson *et al*., 1993, Mertz *et al*., 1992), et

presque totalement contre l'herpès génital causé par le VHS-1 (Lafferty, 2002). Les femmes susceptibles (séronégatives pour le VHS-2) ont un risque plus élevé de contracter une infection génitale (asymptômatique ou symptômatique) d'un partenaire infecté qu'un homme séronégatif par une partenaire infectée (Mertz *et al*., 1992, Wald *et al*., 2001). En effet, les risques qu'une femme susceptible à l'infection contracte le VHS-2 d'un homme infecté est de 80% suivant un seul contact sexuel (Whitley *et al*., 1998), ce qui correspond à un risque qui est environ trois fois plus élevé que celui qu'encourt un homme séronégatif.

Dans le cas de l'herpès néonatal, l'infection du nouveau-né peut se faire par trois voies différentes : intra-utérine, intra-partum et post-natale. Les risques les plus élevés de la transmission du VHS de la mère au fœtus surviennent lors d'une infection primaire ou initiale de la femme enceinte (30 à 50%) (Stanberry *et al*., 2000). Par contre, les risques qu'un nouveau-né acquiert l'infection herpétique suite à une exposition virale durant une infection récurrente asymptomatique sont beaucoup moins grands (moins de 4%) (Stanberry *et al*., 2000). L'exposition du fœtus à des charges virales élevées augmenteraient donc les risques de transmission du VHS, alors que le transfert passif d'anticorps de la mère au fœtus diminuerait ces risques (Stanberry *et al*., 2000). En effet, le statut immunitaire de la mère avant l'accouchement influence à la fois la sévérité de l'infection et les possibilités de transmission du virus au fœtus. Une rupture prolongée des membranes (plus de 6 h) augmente les risques de l'infection du fœtus. De plus, l'utilisation de moniteurs intra-utérins peut également être un site d'inoculation virale (Whitley *et al*., 1998).

1.6.3 L'infection primaire et récurrente

Dès l'infection primaire, des virus pénètrent dans les terminaisons nerveuses et sont transportés dans les ganglions sensitifs où ils demeurent à l'état de latence (Figure 4, p.20). Les ganglions trigéminés, cervicaux et lombaires-sacrés sont les plus communément infectés. La réplication initiale du VHS-1 se fait habituellement dans les muqueuses oropharyngées et la latence dans les ganglions trigéminés et/ou cervicaux. Le VHS-2 se réplique préférentiellement dans la muqueuse génitale et établit la latence dans les ganglions sensitifs sacrés et lombaires. Les infections primaires sont plus souvent qu'autrement asymptomatiques (Whitley *et al*., 1998). Cependant, dans le cas où celles-ci

se manifestent, elles sont habituellement plus sévères que les infections récurrentes et un traitement antiviral adéquat peut dans certains cas limiter la douleur associée, la durée de l'infection ainsi que l'excrétion virale (Amir *et al*., 1997). Occasionnellement, le virus peut se disséminer par la voie sanguine durant l'infection primaire et causer une infection systémique telle qu'une méningite aseptique ou une infection disséminée touchant plusieurs organes.

Lors des réactivations périodiques, les virus sont transportés par voie antérograde le long des neurones sensitifs jusqu'à la peau ou aux muqueuses et entraînent un épisode d'infection récurrente et ce, même en présence d'une immunité humorale et cellulaire intacte. L'excrétion mucocutanée du VHS lors des infections récurrentes peut, elle aussi, être asymptomatique ou se manifester sous plusieurs formes. Dans les deux cas cependant, une transmission virale à un nouvel hôte est possible (Mertz *et al*., 1988a, Wald *et al*., 2000). Le site des infections récurrentes tend à se confiner au dermatome[1] infecté lors de l'infection primaire, mais il peut également y avoir des lésions à des sites plus distants. La fréquence des récurrences peut dépendre du type de VHS et du site anatomique de l'infection (Lafferty *et al*., 1987). Il semble également que la sévérité de l'infection primaire, caractérisée par le nombre, l'étendue, et la dimension des lésions, augmente les probabilités de récurrences futures (Benedetti *et al*., 1994).

1.6.4 Épidémiologie

L'infection au VHS est omniprésente dans la plupart des populations mondiales et elle atteint toutes les classes sociales. Les manifestations cutanées causées par l'infection au VHS sont décrites depuis la Grèce ancienne (Roizman & Whitley, 2001), alors que l'infection génitale au VHS a été considérée comme étant un sujet d'intérêt public seulement vers les années 1970. La manifestation la plus courante de l'infection au VHS est encore la forme orolabiale et le VHS-1 en est habituellement l'agent étiologique. La forme génitale est généralement causée par le VHS-2, mais on dénote une augmentation marquée

[1] Bande de territoire cutanée innervée par les fibres sensitives provenant d'une racine postérieure (Garnier Delamare, dictionnaire des termes de médecine 26ième édition 2000, Maloine, Paris).

de l'incidence des infections génitales causées par le VHS-1 (Cusini & Ghislanzoni, 2001, Kinghorn, 1999). Les données épidémiologiques sont généralement obtenues par la détection spécifique des anticorps contre le VHS-1 ou -2 dans le sang des individus (sérologie). Cependant, les méthodes sérologiques utilisées et particulièrement les cohortes de patients évalués peuvent grandement influencer les résultats des études et il devient parfois difficile de comparer les données de celles-ci. Cependant, certaines tendances sont constantes, et seront principalement discutées dans cette section. Des données plus spécifiques concernant la prévalence de l'infection au VHS par rapport aux différentes régions et groupes d'âge sont également présentées au Tableau 2 (p.31).

La prévalence de l'infection au VHS-1 est très élevée dans pratiquement tous les pays, et ce, particulièrement dans la tranche d'âge des 22 à 40 ans. De façon générale, la prévalence du VHS-1 est toujours plus élevée que celle du VHS-2, probablement dû à leur mode de transmission différent. En effet, il a été estimé que plus de 85% de la population mondiale est séropositive pour le VHS-1 (Spruance *et al*., 1996). L'incidence de l'infection au VHS-1 varie selon la localisation géographique, la classe socio-économique, et l'âge des individus. Dans les pays en voie de développement ainsi que dans les classes sociales économiquement plus défavorisées, les individus acquièrent l'infection au VHS-1 plus tôt dans l'enfance comparativement à ceux des classes moyennes et vivant dans les pays développés. En effet, déjà vers l'âge de 5 ans, plus du tiers des enfants moins favorisés auront séroconverti comparativement à 20% des individus du même âge, mais de statut plus privilégié (Nahmias *et al*., 1990). À l'adolescence, 70 à 80% des individus défavorisés sont séropositifs tandis que ceux des classes moyennes ou élevées deviendront séropositifs dans 40 à 60% des cas durant la 2ième et 3ième décade de leur vie. Dans la plupart des études, la prévalence du VHS-1 augmente de façon constante avec l'âge et atteint un plateau après l'âge de 30 ans. Au delà de la quarantaine, les différences de prévalence du VHS-1 entre les divers pays et classes sociales sont moins évidentes (Whitley *et al*., 1998).

L'herpès génital est l'une des MTS les plus communes et est la première cause d'ulcérations génitales d'origine infectieuse à travers le monde (Fleming *et al*., 1997). La prévalence du VHS-2 est également très variable et dépend de plusieurs facteurs incluant le pays et la région de résidence, les sous-groupes de population, le sexe et l'âge des

individus. Puisque le VHS-2 est habituellement contracté durant des contacts sexuels, il est possible de dire que les anticorps contre celui-ci sont rarement détectés avant l'adolescence. En effet, la prévalence du VHS-2 passe de niveaux négligeables chez les enfants en bas de 12 ans à des taux aussi élevés que 80% chez des adultes à haut risque d'acquisition de l'infection. De façon générale, la prévalence du VHS-2 est plus élevée chez la femme que chez l'homme, probablement dû au fait que, de même que pour les autres MTS, la transmission du VHS-2 semble plus efficace de l'homme à la femme que de la femme à l'homme (Mertz *et al*., 1992).

De façon générale, la prévalence du VHS-2 est constamment plus élevée chez les individus séropositifs pour le VIH, les prostitué(e)s et les individus présentant d'autres MTS (révisé dans (Smith & Robinson, 2002)). Aux États-Unis, des études ont révélé que parmi les individus séropositifs pour le VIH, 68% des homosexuels de sexe masculin (Stamm *et al*., 1988), 63% des hommes hétérosexuels et 78% des femmes présentaient également des anticorps contre le VHS-2 (Hook *et al*., 1992). À Londres, toujours chez les individus VIH-séropositifs, 81% des hétérosexuels (43% femmes et 38% hommes) ont démontré une infection génitale symptomatique au VHS-2 dans une étude menée par Furman et ses collaborateurs en 1984 (Furman *et al*., 1984). En effet, dû à sa nature ulcérative, l'infection génitale au VHS semble faciliter la transmission du VIH (Telzak *et al*., 1993, Wasserheit, 1992). De façon intéressante, les homosexuels de sexe masculin semblent également plus infectés par le VHS-2 que les hétérosexuels du même sexe (Nahmias *et al*., 1990).

La séroprévalence du VHS-2 varie énormément selon la localisation géographique. Certaines régions d'Afrique et d'Amérique comportent les séroprévalences les plus élevées, et la plus élevée au monde a été notée dans la région Sub-Saharienne où plus de 80% des individus testés étaient séropositifs pour le VHS-2 (Smith & Robinson, 2002). En Europe de l'Ouest et du sud, la prévalence du VHS-2 est habituellement moins élevée que celle d'Europe du Nord et de l'Amérique du Nord. Finalement, l'Asie incluant l'Australie, est la région la moins touchée et deux études menées au Japon ont révélé une prévalence aussi faible que moins de 7% dans tous les groupes d'âge observés (Hashido *et al*., 1999, Hashido *et al*., 1998).

Une étude nationale effectuée aux États-Unis (NHANES III) et couvrant les années 1988 à 1994, a permis de relever plusieurs facteurs prédictifs de l'infection au VHS-2 (Fleming *et al*., 1997). Le sexe féminin, la race noire ou Mexicaine-Américaine, un âge élevé, un faible niveau d'éducation, la pauvreté, la consommation de cocaïne, et un nombre élevé de partenaires sexuels au cours d'une vie ont été les principaux facteurs dévoilés. En effet, une différence marquée entre la prévalence de l'infection chez les individus de race noire (45.5%) comparativement à ceux de race blanche (17,6%) a été observée (Fleming *et al*., 1997). 25,6% des femmes comparativement à 17,8% des hommes étaient séropositifs pour le VHS-2 et la séroprévalence des individus en général, augmentait de façon significative avec l'âge pour se stabiliser vers l'âge de 40 ans où 24% à 28% des individus étaient infectés par le virus. Le facteur le plus prédictif de l'acquisition de l'infection au VHS-2 demeure le nombre de partenaires sexuels au cour d'une vie (Fleming *et al*., 1997). Prenons par exemple le cas d'une femme hétérosexuelle vivant aux États-Unis avec un seul partenaire; les probabilités qu'elle contracte une infection au VHS-2 sont de moins de 10%. Avec le nombre de partenaires qui augmente de 2 à 10, de 11 à 50 et de plus de 50, cette probabilité grimpe à 40%, 62% et plus de 80%, respectivement. L'étude nationale a également révélé que la prévalence du VHS-2 a subi une augmentation de 30% depuis les années 1976-1980 (NHANES II) (Fleming *et al*., 1997, Johnson *et al*., 1989). Plusieurs autres régions du monde semblent également suivre cette tendance, mais les données ne sont pas encore complètes (révisé dans (Lafferty, 2002)). De plus, on constate que l'incidence de l'infection génitale causée par le VHS-1 chez la femme est en croissance dans plusieurs régions (Christie *et al*., 1997, Edwards & White, 1994, Langenberg *et al*., 1999, Ross *et al*., 1993), comptant jusqu'à 30-40% des nouveaux cas d'herpès génital. L'amélioration des conditions socio-économiques de ces pays entraînerait possiblement une séroconversion des individus pour le VHS-1 plus tardive, ce qui favoriserait la possibilité d'acquérir une infection génitale par ce type de virus. Les pratiques sexuelles orogénitales aujourd'hui plus fréquentes et mieux acceptées ont également été mises en causes (Lamey & PL, 1999).

Finalement, l'herpès néonatal affecte également la majorité des populations, mais le taux le plus élevé se situe aux États-Unis où l'incidence est de 1 cas par 2500-8800 naissances

(Schomogyi *et al*., 1998). Aux États-Unis, environ 75% des cas sont causés par le VHS-2, et 25% par le VHS-1. De façon contradictoire, au Royaume Uni, le VHS-1 est responsable de 50% des cas d'herpès néonatal (Tookey & Peckham, 1996) et compte pour plus de 60% des cas rapportés au Japon (Kroon *et al*., 1995). Aux États-Unis, 5% des femmes en âge de procréer ont déjà présenté une histoire d'herpès génital (Prober *et al*., 1992), et il est estimé qu'un million des grossesses annuelles se font chez des femmes séropositives pour le VHS-2.

Tableau 2. Prévalence du VHS-1 et -2 à travers le monde.

Région	**Cohorte**	**Âge (ans)**	**Sexe**	**Prévalence (%)**	
				VHS-1	VHS-2
Canada (Colombie Britannique)	Anténatale	15-19	F	52	7
		40-44	F	65	28
États-Unis (nationale)	Aléatoire	12-19	F et H	68	5,6
		40-49	F et H	73	27
		12≥70	F/H		26/18
Amérique centrale et du sud	Contrôles d'une étude sur le cancer cervical	18-29	F		30
		40-49	F		40
Australie (Sydney)	Anténatale	15-19	F		4,3
		30-34	F		14
		15-≥35	F	79	11
Japon (Centre)	Aléatoire	20-49	F/H	60/45	1,2/1,8
		40-49	F/H	81/76	0,0/3,3
Europe de l'Est (Allemagne)	Donneurs de sang, patients hospitalisés	17-19	F et H	60	
		17-19	F/H		5,0/5,0
		40-49	F et H	89	
		40-49	F/H		19/13
Afrique (Bénin, Cotonou)	Aléatoire	15-49	F/H		30/12
		40-44	F/H		57/42
(République Centrale, Bangui)	Centre de reproduction	15-48	F	99	82

(Modifié de (Smith & Robinson, 2002))
Note. F : femme, H : homme

1.7 Réponse immunitaire

Le cours naturel de l'infection au VHS est influencé à la fois par la réponse immunitaire non spécifique (innée) et spécifique (acquise) de l'hôte infecté (Whitley, 2001). L'importance relative des diverses composantes de la réponse immune varie également dépendant du fait que l'infection soit initiale ou récurrente. Suite à une infection initiale, l'apparition de la réponse inflammatoire non spécifique incluant les interférons (INFs), les macrophages activés et les cellules tueuses (NK), parallèle normalement le niveau maximum de la réplication virale. Cette première ligne de défense limite l'extension de l'infection en inhibant significativement la réplication virale (Stanberry *et al*., 2000). D'un autre côté, les anticorps neutralisants, les lymphocytes T spécifiques sécrétant les cytokines antivirales (CD4+) et/ou activées pour tuer les cellules infectées (CD8+) (réponse immunitaire spécifique) prennent plusieurs jours à se développer. Dépendant d'un modèle animal à l'autre, cette réponse peut varier significativement (Whitley *et al*., 1998). Par exemple, chez la souris, les lymphocytes T cytotoxiques et les immunoglobulines (Ig)M et G spécifiques apparaissent de 4 à 6 jours suivant le début de l'infection, alors que chez l'humain, l'immunité spécifique se développe 7 à 10 jours plus tard. De façon classique, les anticorps IgM apparaissent de façon transitoire, suivis des IgG et des IgA qui eux, persisteront sur une plus longue période (Whitley & Roizman, 2001). Les anticorps neutralisants sont dirigés contre les principales glycoprotéines de l'enveloppe (gB, gD, gH/L), alors que les lymphocytes T peuvent être dirigés contre une panoplie de protéines virales (Stanberry *et al*., 2000). Les protéines et leurs épitopes antigéniques sont généralement bien conservés entre le VHS-1 et –2, mais des cellules B dirigées contre des épitopes type-spécifique ont été identifiées pour les glycoprotéines B, D, C, et spécialement pour la gG. Des épitopes viraux spécifiques à ces glycoprotéines ont également été identifiés pour les cellules T CD4+, de même que pour la protéine virale VP16 (Koelle *et al*., 1998a).

Face à un système de défense immunitaire efficace, le VHS réussit tout de même à se réactiver de sa latence et à entraîner une infection récurrente. Ce phénomène demeure toujours aussi énigmatique malgré de nombreuses recherches effectuées sur ce sujet.

Cependant, les infections récurrentes sont généralement moins sévères et plus brèves que les infections initiales. En effet, lors d'infections récurrentes, les mécanismes de l'immunité spécifique sont activés beaucoup plus rapidement (Cunningham & Mikloska, 2001). Dépendant des individus, la sévérité de l'infection et la fréquence des récurrences peuvent être significativement différentes et reflètent peut-être la sélection préférentielle de l'une des composantes de la défense immunitaire. Les études effectuées chez les animaux suggèrent que l'immunité humorale et cellulaire soient toutes deux importantes dans le contrôle de l'infection initiale et des récurrences (Stanberry *et al*., 2000). La réponse humorale semble efficace pour réduire le titre viral au site d'infection et dans les tissus nerveux durant l'infection initiale. En effet, le transfert passif d'anticorps spécifiques au VHS semble protéger l'animal contre une infection disséminée ou une infection du système nerveux (Bravo *et al*., 1996, Mitchell & Stevens, 1996, Morrison & Knipe, 1997, Sanna *et al*., 1996). Chez l'humain, le transfert d'anticorps de la mère au fœtus joue également un rôle important dans la protection contre l'herpès néonatal, mais ne semble pas totalement efficace (Kohl *et al*., 1989, Sullender *et al*., 1987). D'un autre côté, l'immunité humorale est moins efficace dans la protection contre les récurrences de même que l'infection exogène (Whitley *et al*., 1998). Le VHS a développé plusieurs stratégies afin de déjouer cette composante de la réponse immune (Favoreel *et al*., 2000). Par exemple, les glycoprotéines gE et gI de l'enveloppe virale forment un complexe pouvant lier la fraction Fc des immunoglobulines, bloquant ainsi l'activation de la cascade du complément. De plus, la gC lie plusieurs composantes du complément. L'établissement de la latence virale dans les cellules du système nerveux, comprenant très peu de cellules impliquées dans la défense immunitaire, de même que l'expression d'un faible taux de gènes viraux en état de latence demeure l'un des mécanismes d'évasion du système immunitaire les plus efficace.

Plusieurs évidences suggèrent que la réponse à médiation cellulaire joue un rôle central dans le contrôle de la sévérité de l'infection et du nombre de récurrences (Cunningham & Merigan, 1983, Posavad *et al*., 1996, Siegel & McCracken, 1981). En effet, les infections mucocutanées sont beaucoup plus sévères chez les patients ayant une immunité à médiation cellulaire défective (Posavad *et al*., 1996, Siegel & McCracken, 1981) comparativement aux patients agammaglobulinémiques. Plusieurs études effectuées chez l'humain

incriminent les lymphocytes T CD8+ et T CD4+ dans la protection contre l'infection au VHS (Jennings *et al*., 1991, Manickan & Rouse, 1995, Posavad *et al*., 1996). Laquelle de ces deux types de cellules est la plus importante pour contrôler les infections récurrentes demeure un sujet bien débattu surtout lorsqu'on considère le développement d'un vaccin efficace contre l'infection au VHS (Cunningham & Mikloska, 2001). Une étude a rapporté que des individus séropositifs pour le VIH et souffrant d'infections génitales au VHS sévères, présentaient des niveaux de lymphocytes T CD8+ précurseurs plus faibles que chez les patients VIH positifs avec des infections génitales modérées (Posavad *et al*., 1997). De plus, une autre étude a démontré que la présence de lymphocytes T CD8+ locaux est associée à la clairance du VHS des lésions herpétiques cutanées (Koelle *et al*., 1998b). De façon intéressante, un des mécanismes d'évasion du VHS (Favoreel *et al*., 2000) contre les défenses immunitaires de l'hôte est en fait d'inhiber l'efficacité des lymphocytes T CD8+ cytotoxique en réponse à l'infection virale. La protéine virale ICP47 exprimée précocement dans l'infection, se lie à une protéine cellulaire (TAP) et inhibe le transport et la présentation de l'antigène associé au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. D'un autre côté, pour contrecarrer cet effet, les cellules T CD4+ sécrètent de l'INF-γ qui restaure partiellement l'expression du CMH de classe I par une stimulation de la production de la protéine TAP (Koelle *et al*., 1993, Mikloska *et al*., 1998, Posavad *et al*., 1996)

De façon générale, les lymphocytes T CD4+ peuvent sécréter des cytokines de la réponse de type Th1 (spécialement l'IFN-γ ainsi que le TNF-α et l'interleukine (IL)-2 et -12), de type Th2 (IL-4, IL-5, et IL-10) ou encore les deux types de réponse. La réponse de type Th2 mène à la sécrétion d'anticorps neutralisants par les cellules B, alors que la réponse de type Th1 entraîne la production de cytokines antivirales et à l'activation des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. La réponse de type Th1 semble prédominante pour le contrôle de l'infection au VHS, alors que la réponse de type Th2 préviendrait la transmission du virus d'une cellule à l'autre (Cunningham & Mikloska, 2001). Des études comparatives entre des individus ayant ou non des infections récurrentes ont démontré que des altérations dans la production des cytokines de la réponse de type Th1 pourraient corréler avec le développement des infections récurrentes (Manickan & Rouse, 1995, Posavad *et al*., 1998,

Spruance *et al*., 1995a). En effet, l'IFN-γ semble critique pour conférer une protection contre l'infection au VHS. Certains travaux ont permis de démontrer que les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) prélevées de patients subissant des épisodes d'herpès labial fréquents ont une production d'IFN-γ inexistante en culture (Green *et al*., 1985, Kuo & Lin, 1990, Sheridan *et al*., 1987). De plus, ces PBMC produisent des titres élevés d'anticorps contre le VHS. D'un autre côté, les PBMC prélevés de patients séropositifs pour le VHS-1 mais sans histoires d'infections récurrentes, présentent des concentrations plus élevées d'IFN-γ et d'IL-2 et des titres plus faibles d'anticorps contre le VHS (Spruance *et al*., 1995b). Une meilleure compréhension de la réponse immunitaire spécifique à l'infection causée par le VHS permettra de prédire plus efficacement le type de réponse qui devrait être favorisé pour le développement de vaccins efficaces.

1.8 Manifestations cliniques

Les infections causées par les VHS-1 et –2 sont plus souvent qu'autrement bénignes, voire totalement asymptomatiques. Seulement 10 à 25% des individus séropositifs pour le VHS-2 rapportent une histoire d'herpès génital, ce qui suggère que la plupart des sujets infectés aient une symptomatologie non reconnue ou une infection tout simplement asymptomatique (Wald *et al*., 2000). Toutefois, chez les individus présentant des récurrences fréquentes associées à des signes cliniques, particulièrement lorsqu'il s'agit de l'herpès génital, ces infections ont un retentissement important sur leur qualité de vie. Dans certains cas, l'infection au VHS peut être associée à des atteintes sévères du SNC, de l'œil ou à des formes graves chez le nouveau-né. De plus, chez les patients immunosupprimés, les infections au VHS sont habituellement plus sérieuses et peuvent avoir des répercussions importantes sur la santé de ces patients. Il existe en effet plusieurs variantes aux présentations cliniques de l'infection au VHS. Les signes cliniques les plus fréquemment rencontrés seront présentés ici et ce, en suivant les principaux sites d'infection du VHS.

1.8.1 Herpès mucocutané

1.8.1.1 Infection oro-labiale

Les infections orolabiales causées par le VHS-1 peuvent se manifester sous plusieurs aspects. Pour ce qui est de l'infection primaire, telle que mentionné plus haut, elle peut être totalement asymptomatique (deux fois plus fréquente) ou se présenter par une variété de symptômes, allant de vésicules localisées à de la fièvre associée à des malaises généraux. La période d'incubation varie entre 2 à 12 jours avec une période moyenne de 4 jours. Le virus peut ensuite être excrété jusqu'à 23 jours dans la cavité orale (moyenne de 7 à 10 jours). Chez l'enfant, une infection primaire au VHS-1 symptomatique est habituellement caractérisée par une atteinte de la cavité buccale et des gencives (gingivostomatite). Des lésions herpétiques sont rencontrées sur la muqueuse buccale, les gencives, le palais, la langue et le pharynx. Les patients se plaignent d'un mal de gorge, de malaises et peuvent même avoir de la difficulté à avaler et à manger due à la douleur associée aux lésions. Lors de l'infection primaire, les patients peuvent également présenter des adénopathies submandibulaires et cervicales. Les individus qui développent une infection primaire mucocutanée à un âge plus avancé peuvent présenter les mêmes symptômes que ceux décrits plus haut. De plus, une pharyngite et des symptômes similaires à ceux de la mononucléose peuvent également être rencontrés (Whitley, 2001).

La réactivation du VHS-1 des ganglions trigéminés se manifeste habituellement par une infection mucocutanée au niveau des lèvres, plus communément appelée "feu sauvage". L'apparition du feu sauvage est habituellement précédée d'un prodrome associé à un picotement, de la chaleur et de la douleur qui est probablement dû à la réplication précoce du virus dans les terminaisons nerveuses de l'épiderme ou de la muqueuse (Huff *et al*., 1981). Le prodrome dure en moyenne 6 h et est suivi par la formation des vésicules (Spruance *et al*., 1977). Dans certains cas, la présence d'un prodrome permet l'initiation d'un traitement antiviral rapide qui peut résulter en la diminution de l'étendue et de la durée des lésions (Esmann, 2001, Laiskonis *et al*., 2002). Les vésicules sont typiquement rencontrées sur le vermillon de la lèvre et persistent en moyenne durant une période de 48

h. Ces vésicules sont habituellement localisées et sont en moyenne au nombre de trois à cinq. Ces lésions progressent en pustules ou en ulcères qui formeront des croûtes en l'espace de 72 à 96 h. La guérison de ces lésions est habituellement complétée en 8 et 10 jours. Les infections récurrentes symptomatiques semblent affecter 20 à 40% des adultes (Bader *et al*., 1978, Embil *et al*., 1975) et la fréquence de celles-ci est très variable d'un individu à l'autre.

La réactivation du VHS-1 des ganglions géniculés semble également impliquée dans la pathogenèse de la paralysie faciale idiopathique ou paralysie de Bell (Furuta *et al*., 1998). Le VHS peut également compliquer l'eczéma atopique (Bork & Brauninger, 1988) qui affecte fréquemment la région de la tête et du cou. Cette surinfection par le VHS, couramment nommée l'eczéma herpeticum est potentiellement sérieuse et progressive et une thérapie antivirale suppressive est indiquée dans certains cas (Simmons, 2002). Les infections virales incluant le VHS-1 sont également reconnues dans l'exacerbation de certaines conditions cutanées telles que l'érythème multiforme et le syndrome de Stevens-Johnson (Schofield *et al*., 1993).

1.8.1.2 Les infections oculaires

L'infection des yeux par le virus de l'herpès suivant la période néonatale est habituellement associée au VHS-1 (Binder, 1977). Elle est la cause de 5% des consultations en ophtalmologie aux États-Unis et une cause majeure de scarification de la cornée et de perte de vision (Darougar *et al*., 1987). Il est important de noter que la réponse immune à l'infection virale est une composante importante dans la pathogenèse des lésions oculaires (Darougar *et al*., 1987). Les kératoconjonctivites herpétiques peuvent affecter un seul œil ou les deux yeux et les patients peuvent également présenter des adénopathies pré-auriculaires. Les lésions sont typiquement en forme de dendrites, et la photophobie, le larmoiement, l'œdème des paupières et un chemosis (inflammation de la conjonctive) peuvent également accompagner ces lésions. L'infection peut évoluer en ulcère cornéen de type géographique et, dans ce cas, la guérison peut prendre jusqu'à un mois même avec l'initiation d'un traitement antiviral approprié. L'acuité visuelle peut être diminuée avec la présence d'ulcères. La fréquence des récurrences est habituellement similaire aux infections

orolabiales et touche typiquement un seul œil. Les récidives fréquentes peuvent entraîner une détérioration cornéenne nécessitant une greffe de la cornée (Whitley, 2001).

1.8.1.3 L'herpès génital

L'infection génitale primaire est habituellement causée par le VHS-2 et est fréquemment asymptomatique. Par contre, lorsqu'elle se manifeste cliniquement, elle est reliée à des symptômes systémiques ainsi qu'à des lésions vésiculaires caractéristiques qui ont une durée moyenne de 21 jours et durant laquelle l'excrétion virale est prolongée. Les lésions herpétiques typiques se présentent sous la forme de macules et de papules, suivie par des vésicules, des pustules et des ulcères. Durant l'infection primaire, les patients sont fiévreux, peuvent présenter de la dysurie, des adénopathies inguinales, et un malaise général. Les complaintes systémiques sont fréquentes pour les deux sexes (70%), mais l'infection primaire est habituellement plus sévère chez la femme que chez l'homme. L'infection primaire est également plus fréquemment associée à des complications chez les femmes (Bryson *et al*., 1983, Corey *et al*., 1983) et celles-ci consistent en une méningite aseptique, des lésions extragénitales et à de la rétention urinaire (Whitley, 2001). L'infection primaire (en l'absence d'anticorps contre le VHS-1) est habituellement plus sévère et prolongée que l'infection initiale (Cusini & Ghislanzoni, 2001, Whitley, 2001).

Chez la femme, les lésions associées à une infection primaire symptomatique sont localisées sur la vulve et sont habituellement bilatérales. Le col de l'utérus est toujours affecté. Les lésions sont généralement très douloureuses et peuvent également se présenter au niveau du périnée, des fesses et du vagin. Un prurit important et d'abondantes sécrétions muqueuses vaginales y sont associés. Un syndrome de rétention urinaire se manifeste chez 10 à 15% des patientes et 25% des femmes développeront une méningite aseptique. Chez les hommes, les lésions vésiculaires affectent surtout le gland du pénis et le corps de celui-ci. De façon similaire à la femme, des lésions au niveau des fesses, des cuisses et du périnée peuvent être présentes. Une infection primaire au VHS-2 dans la région périanale et anale est également possible et est plus commune chez les homosexuels de sexe masculin. L'infection génitale non primaire, mais initiale (présence d'anticorps contre le VHS-1) est habituellement moins sévère pour les deux sexes et les symptômes tendent à se résorber

plus rapidement (2 semaines) (Langenberg *et al*., 1999, Whitley *et al*., 1998). Le nombre de lésions, la sévérité de la douleur et la possibilité de complication sont également significativement diminués. Le VHS-1 peut également être la cause d'une infection génitale primaire. Tout comme le VHS-2, il peut causer les mêmes symptômes lors de l'infection primaire et établir une latence dans les ganglions sacrés (Sucato *et al*., 1998). La présence d'anticorps contre le VHS-1 suite à une infection orolabiale protège cependant considérablement contre l'infection génitale par ce même type (Lafferty, 2002). Par contre, le VHS-1 est associé à un taux nettement moindre de récurrences que le VHS-2 (Benedetti *et al*., 1994)

Les infections récurrentes symptomatiques sont caractérisées par l'apparition d'un nombre limité de lésions (trois à cinq) sur le corps du pénis ou simplement par une irritation au niveau de la vulve. La durée des symptômes est d'une moyenne de huit à dix jours et l'excrétion virale est d'environ deux à cinq jours (Whitley *et al*., 1998). Les récurrences génitales tout comme celles orolabiales peuvent être précédées d'un prodrome important à reconnaître pour initier un traitement antiviral le plus rapidement possible. La fréquence des récurrences varie également d'un individu à l'autre. Le tiers des personnes infectées présentant des infections récurrentes vont développer de huit à neuf épisodes de récurrences génitales par année alors qu'un autre tiers vont présenter deux à trois épisodes. Le dernier tiers vont développer de quatre à sept infections récurrentes par année (Corey *et al*., 1982). Il est très important de noter que les individus infectés peuvent transmettre le VHS à leurs partenaires sexuels même en l'absence de lésions symptomatiques (Mertz *et al*., 1992). Des études ont même démontré qu'il était possible d'isoler du virus en culture ou le détecter par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) dans le tractus génital ou au niveau périanal entre les périodes de récurrences (Cone *et al*., 1994, Wald *et al*., 2000). En effet, le virus a pu être détecté durant 168 des 5591 jours investigués (3,0% des jours) chez des sujets séropositifs pour le VHS-2 en l'absence de lésions génitales. De plus, chez les patients pour lesquels du virus n'a pu être isolé par les techniques de culture standard, celui-ci a pu être détecté chez 67% de ces sujets par PCR et ceci, durant 3,5% des jours (Wald *et al*., 2000). Finalement, la présence de lésions extragénitales peut tout de même être accompagnée

d'une excrétion virale asymptomatique dans les muqueuses génitales (Corey & Handsfield, 2000, Koelle & Wald, 2000).

Les nerfs sensitifs qui arrivent des segments spinaux sacrés et lombaires innervent tant l'appareil génital qu'une bonne partie du bas du corps (fesses, cuisses et muqueuse périanale). En conséquence, lorsque les ganglions sensitifs lombaires-sacrés sont infectés par le VHS, les lésions peuvent se présenter à des sites très variés. En effet, les lésions au niveau des fesses, des cuisses et de la muqueuse périanale sont des sites communs des récurrences du VHS et ne sont pas toujours reconnus comme étant de l'herpès génital. De plus, certaines lésions peuvent être d'apparences atypiques. Toute histoire de démangeaisons récurrentes associées à une sensation de brûlure, de vésicules ou d'érythème à un site en-dessous de la ceinture devrait donc être suspectée comme étant de l'herpès génital jusqu'à preuve du contraire (Simmons, 2002). De façon intéressante, plusieurs cas d'infection herpétique au niveau des orteils, préalablement reliée à une auto-inoculation, sont maintenant reconnus comme étant une réactivation du VHS via les nerfs sacrés (Egan *et al*., 1998, Feder & Geller, 1992, Mohler, 2000).

Des complications neurologiques ou systémiques, quoique peu communes dans le cas des infections récurrentes, consistent généralement en des paresthésies. Chez la femme enceinte qui présente un épisode de récurrence génitale, l'infection peut rarement se disséminer et affecter les viscères et le SNC. Dans ces cas-ci, le taux de mortalité pour la femme et son fœtus est élevé (50% des cas) (Whitley *et al*., 1998). De plus, la femme enceinte qui présente une infection génitale primaire ou initiale encourt des risques majeurs pour son fœtus et les infections récurrentes sont également risquées. Une infection primaire dans les 20 premières semaines de gestation peut être associée à un avortement spontané (Whitley & Hilliard, 2002) tandis que les infections primaires plus tardives ne sont pas associées à une interruption de la grossesse, mais peuvent entraîner des infections très morbides pour le fœtus (Brown *et al*., 1991) (voir section 1.8.2, p.41).

1.8.1.4 Autres localisations

Le panaris herpétique (infection des doigts) est plus fréquemment rencontré chez le personnel soignant (Klotz, 1990) et peut être causé par le VHS-1 ou –2 (Whitley *et al*., 1998). L'infection primaire et les récurrences peuvent être associées à une névralgie douloureuse du doigt affecté ou de l'avant bras (Simmons, 2002). L'herpès du gladiateur est une infection cutanée disséminée qui se rencontre typiquement chez les individus pratiquant des sports de contacts (rugby, football, lutte, etc.). L'infection peut impliquer un dermatome trigéminé, cervical ou lombosacré et les récurrences peuvent être assez fréquentes (Simmons, 2002). Ces patients peuvent donc bénéficier d'un traitement prophylactique durant la saison sportive (Anderson, 1999).

1.8.2 L'herpès néonatal

L'herpès néonatal est une manifestation très grave, souvent fatale. La transmission de l'infection in utéro est plutôt rare (5% des cas), tandis que l'infection intrapartum au cours du passage du fœtus dans les voies génitales de la mère infectée est la plus fréquente (75 à 78%) (voir section 1.6.2, p.25). Le nouveau-né peut également être infecté par les proches et le personnel soignant présentant de l'herpès orolabial. L'herpès néonatal est habituellement dû au VHS-2 (60 à 70% des cas), mais une infection au VHS-1 entraîne des formes disséminées évolutives plus graves qu'avec le VHS-2 (Thouvenot & Najioullah, 1999). Les risques de transmission du VHS de la mère au fœtus peuvent dépendre de plusieurs facteurs et ont été discutés dans la section 1.6.2 de ce chapitre (p.25).

L'infection herpétique néonatale est presque invariablement symptomatique et fréquemment fatale pour le nouveau-né. Bien que la mortalité ait diminué depuis l'introduction des antiviraux, elle est de 15% si le SNC est atteint et de 57% si l'infection est disséminée (Jacobs, 1998). L'infection congénitale (intra utérine) est caractérisée par une triade de lésions vésiculaires ou scarifiantes de la peau, d'une atteinte oculaire, et d'une microcéphalie ou anencéphalie. Dans le cas où l'infection herpétique est acquise en intrapartum ou post-partum, les manifestations cliniques peuvent se diviser en trois grandes catégories : I) Les infections localisées de la peau, des yeux, et de la cavité buccale; II)

l'encéphalite herpétique avec ou sans atteinte cutanée et; III) les formes disséminées impliquant plusieurs organes tels que le SNC, les poumons, le foie, les glandes surrénales, la peau, les yeux et/ou la bouche (Whitley *et al*., 1981).

L'infection disséminée possède le moins bon pronostic et malgré l'initiation précoce de la thérapie antivirale, environ 23% des enfants présenteront tout de même une telle infection disséminée. La mortalité est de 80% dans les cas non traités et les quelques survivants sont très affectés (Whitley, 2001). L'encéphalite herpétique atteint le tiers des enfants présentant une infection herpétique néonatale. Les enfants sont léthargiques, irritables, se nourrissent mal et ont une température corporelle instable. Le virus peut être cultivé à partir du liquide céphalo-rachidien dans environ 24 à 40% des cas et ce diagnostic devient très important puisque sans traitement antiviral, la mort s'en suit dans 50% des cas, et les survivants présenteront une atteinte neurologique très importante (Whitley *et al*., 1998). L'infection de la peau, des yeux et de la cavité buccale, quoique très morbide, n'entraîne habituellement pas la mort. Par contre, dans approximativement 30% des cas, l'enfant développera des évidences d'une atteinte neurologique (Whitley *et al*., 1998). De façon intéressante, de rares cas d'infection des mamelons par le VHS ont été rapportés chez la femme, et ont été reliés à la transmission du VHS de l'enfant à la mère durant l'allaitement (Mercey & Mindel, 1990).

1.8.3 Infections du SNC

L'encéphalite herpétique chez les enfants plus âgés de même que chez les adultes est habituellement causée par le VHS-1 et constitue, avec l'herpès néonatal, la manifestation la plus dévastatrice des infections causées par le VHS. L'encéphalite herpétique est considérée comme étant la cause la plus commune d'encéphalite sporadique fatale (Whitley & Hilliard, 2002). Les symptômes cliniques sont caractéristiques des régions du cerveau atteints, soit principalement les lobes temporaux. Les présentations incluent l'encéphalite primaire associée à de la fièvre, une altération de l'état de conscience, des comportements bizarres, des désordres mentaux, de la confusion, et divers autres signes neurologiques localisés. L'atteinte neurologique progressive semble résulter d'une accumulation des dommages causés par les réactivations fréquentes du VHS dans le cerveau (Simmons,

2002). Cependant, aucun signe clinique n'est spécifique de l'infection au VHS, et un haut niveau de suspicion doit être présent pour porter le bon diagnostic. D'ailleurs, celui-ci est d'une importance primordiale puisque la mortalité des patients non traités excède les 70% et seulement 25% des survivants présenteront une fonction neurologique normale (Ward & Roizman, 1994b). Les procédures standards de diagnostic (présentées à la section 1.10 de ce chapitre, p.48) qui consiste dans ce cas-ci en la mise en culture du liquide céphalo-rachidien (LCR) ne sont que peu utiles puisque rarement positives (<5%). La détection d'ADN viral dans le LCR demeure donc la technique de détection de premier choix en l'absence de biopsie cérébrale. Le VHS peut également infecter d'autres composantes du système nerveux et causer des maladies telles que la méningite (complication de l'infection primaire au VHS-2), la myélite et la radiculite. Le VHS a également été incriminé en tant qu'agent étiologique de la méningite lymphocytique récurrente (méningite de Mollaret) suite à la détection d'ADN viral par PCR dans le LCR durant des épisodes aiguës de la maladie (Picard *et al*., 1993). Il est également intéressant de noter que certaines études récentes incriminent les virus herpétiques (VHS-1 et VHH-6) dans la sclérose en plaques (Bergstrom, 2000). En effet, on a observé la présence d'ARNm du VHS-1 dans les PBMC de patients infectés, spécifiquement durant les poussées de la maladie, suggérant que le VHS-1 pourrait être impliqué dans le déclenchement de ces épisodes aigus (Ferrante, 2000, Ferrante *et al*., 2000).

1.9 Les infections chez les patients immunosupprimés

Les patients dont le système immunitaire est compromis dû à une immunothérapie (transplantés et cancéreux), à une maladie associée (SIDA, maladie congénitale) ou à la malnutrition sont plus à risque de développer des infections primaires et récurrentes sévères au VHS (Severson & Tyring, 1999, Wasserheit, 1992). Par exemple, les patients séropositifs pour le VIH et ceux qui subissent une thérapie immunosuppressive pour une transplantation, encourent un risque élevé de développer des infections récurrentes fréquentes (Whitley & Hilliard, 2002). L'excrétion virale est généralement plus longue, les vésicules sont plus larges, plus nombreuses et plus nécrotiques et peuvent former des ulcères hyperkératiques aux localisations plutôt atypiques (Tyring *et al*., 1998). Les

infections peuvent également progresser et atteindre le tractus respiratoire, l'œsophage et le tractus gastro-intestinal (Whitley *et al*., 1998). La sévérité de l'infection et la progression de celle-ci semblent directement reliées au degré d'immunosuppression des patients. D'ailleurs, les infections herpétiques sévères et prolongées (d'une durée de >1 mois) sont une des caractéristiques définissant le SIDA (Stewart *et al*., 1995). Chez les patients immunosupprimés, les récurrences sont également plus fréquentes (chroniques) et surviennent à des sites multiples (Safrin *et al*., 1991, Siegal *et al*., 1981). De plus, la guérison des lésions est généralement plus longue (parfois >6 semaines) (Quinnan *et al*., 1984). Un traitement antiviral agressif peut être indiqué dans certains cas, mais la résistance aux antiviraux est beaucoup plus fréquente chez ces patients et peut être associée à des infections progressives (Englund *et al*., 1990, Safrin, 1992, Safrin *et al*., 1990, Safrin *et al*., 1994b). L'excrétion asymptomatique du VHS a également été décrite chez les patients immunosupprimés (Mostad *et al*., 2000, Stewart *et al*., 1995, Tabet *et al*., 1998). En effet, le taux d'excrétion asymptomatique du VHS-2 isolé du tractus anogénital d'homme également infecté avec le VIH a été évalué à 7,3 (Schacker *et al*., 1998b) et à 5,1% (Schacker *et al*., 1998a) des jours lors de deux études différentes. De plus, le taux d'excrétion total du virus (symptomatique et asymptomatique) est plus élevé chez ce groupe de patient comparativement aux hommes homosexuel séronégatifs pour le VIH.

1.9.1 Le VHS et le virus de l'immunodéficience humaine

L'infection au VHS fut l'une des premières infections opportunistes rapportée chez des homosexuels de sexe masculin atteints du SIDA (Siegal *et al*., 1981). Les études séroépidémiologiques révèlent maintenant que le VHS compte parmi les infections virales les plus communes chez les individus infectés par le VIH-1 (Auvert *et al*., 2001, Langeland *et al*., 1998, Wooley & Chandiok, 2000). Leur mode de transmission étroitement lié en est certainement en partie responsable. Il y a maintenant de plus en plus d'évidences épidémiologiques qui suggèrent que l'infection génitale au VHS-2 est un facteur de risque dans l'acquisition du VIH et ce risque est évalué à deux fois plus élevé par rapport aux individus non infectés par le VHS-2 (Wald *et al*., 2002). L'explication la plus plausible de cette transmission favorable est probablement la nature ulcérative et inflammatoire de

l'infection génitale causée par le VHS (Holmberg *et al*., 1988, Stamm *et al*., 1988). En effet, la rupture de la barrière épithéliale engendrée par les ulcérations herpétiques rend la porte d'entrée au VIH plus accessible (Heng *et al*., 1994, Hook *et al*., 1992). De plus, le recrutement précoce de cellules T CD4+ dans les lésions herpétiques lors d'infections récurrentes augmente les cibles susceptibles à l'infection par le VIH (Koelle *et al*., 1994). Par le fait même, la co-infection des individus par ces deux virus pourrait augmenter les risques de transmission du VIH aux partenaires sexuels susceptibles à l'infection (Schacker, 2001). En effet, plusieurs études rapportent la présence de hauts titres du VIH dans les lésions herpétiques (Chen *et al*., 2000a, Kreiss *et al*., 1989, Schacker *et al*., 1998b).

Ces deux virus semblent mutuellement influencer le cours de leur infection. Dans le cas de l'infection au VHS, l'immunodéficience entraînée par l'infection au VIH est principalement à l'origine des changements observés chez les individus co-infectés avec les deux virus. Les manifestations cliniques de l'infection au VHS-2 sont en effet habituellement beaucoup plus graves et persistantes particulièrement lorsque le décompte des lymphocytes T CD4+ se situe en-dessous de $200x10^6$/L. Les lésions ulcératives sont larges et très douloureuses, deviennent nécrotiques et peuvent persister. De plus, les individus séropositifs pour le VIH-1 et le VHS-2 excrètent de 3 à 4 fois plus souvent du VHS que les individus uniquement infectés par le VHS-2 (Schacker *et al*., 1998c), et la fréquence de l'excrétion corrèle positivement avec le déclin des lymphocytes T CD4+ (Schacker *et al*., 1998a, Schacker *et al*., 1998c).

À son tour, plusieurs évidences suggèrent que le VHS stimule la réplication du VIH et ainsi, favorise la progression du SIDA. En effet, certaines études ont démontré un bénéfice de survie des patients VIH-séropositifs traités avec de l'acyclovir (Ioannidis *et al*., 1998), alors que cet antiviral n'a aucun effet sur la réplication du VIH (Collier *et al*., 1998). Le mécanisme par lequel cette diminution de la mortalité a été observée n'est pas encore bien connu, mais est potentiellement attribuable à l'inhibition de la réplication des virus herpétiques et plus particulièrement des virus de la sous-famille des *α-herpesvirinae* (VHS-1, -2, et VZV) (Ioannidis *et al*., 1998). Un certain nombre de travaux fondamentaux effectués *in vitro* mettent en évidence la facilitation de l'expression du VIH en présence du

VHS. En effet, la co-infection des individus avec le VIH et d'autres virus peut affecter le cycle de réplication du VIH et ce, par différents mécanismes (Tableau 3, p.47). Des interactions moléculaires et cellulaires entre d'autres membres de la famille des *herpesviridae* et le VIH ont également été décrites *in vitro* (Tableau 4, p.47) (Griffiths, 1996, Griffiths, 1998). Dans le cas du VHS, le rôle de plusieurs protéines du VHS dans la stimulation de la réplication du VIH ont été mis en évidence. Les protéines virales ICP0, ICP4 et ICP27 du VHS-1 ont un certain pouvoir de transactivation du VIH. L'activation des longues séquences terminales répétées (LTR) du VIH de façon directe ou via la stimulation de certains facteurs de transcription cellulaire tel que le NFκb serait probablement l'un des mécanismes les plus plausibles (Golden *et al*., 1992, Margolis *et al*., 1992, Mosca *et al*., 1987, Ostrove *et al*., 1987, Schafer *et al*., 1996, Vlach & Pitha, 1992, Vlach & Pitha, 1993). D'autres protéines du VHS (ICP27, US11) peuvent également affecter la régulation des événements post-transcriptionnels du VIH (Diaz *et al*., 1996, Mosca *et al*., 1987). L'effet de ces interactions a été démontré par l'augmentation de la réplication du VIH dans des cellules co-infectées par le VIH et le VHS-1 (Kucera *et al*., 1990, Moriuchi *et al*., 2000). La co-infection virale peut également mener à la formation de virus pseudotypés, i.e. des particules virales comportant le génome du VIH-1 enveloppé des glycoprotéines de surfaces dérivées d'autres virus. Ces pseudotypes pourraient donc possiblement infecter des cellules normalement résistantes à l'infection par le VIH. La formation de pseudotypes a été décrite pour le VHS-1 et le VIH (Calistri *et al*., 1999, Heng *et al*., 1994) par l'observation d'ARN du VIH dans des cellules épidermoïdes n'exprimant pas le CD4 (Heng *et al*., 1994).

Tableau 3.Mécanismes par lesquels les virus peuvent agir en tant que co-facteurs à la stimulation de la réplication du VIH-1.

Effets	Co-infection de la même cellule	Infection de cellules avoisinantes
Activation de l'ADN proviral du VIH	Transactivation	Libération de cytokines. Présentation d'antigène.
Altération du tropisme de l'ARN du VIH	Formation de pseudotypes	Stimulation de l'expression des récepteurs (CD4/co-récepteurs). Induction de récepteurs alternatifs.

Modifié de (Griffiths, 1998, Palu *et al*., 2001)

Tableau 4. Mécanismes par lesquels les virus herpétiques stimulent la réplication du VIH-1

Virus	Trans-activation	Libération de cytokines	Récepteurs alternatifs	Stimulation du CD4 ou des co-récepteurs cellulaires	Présenta-tion de l'antigène	Forma-tion de pseudo-types
VHS	oui	non				oui
VZV		non				
EBV	oui	oui				non
CMV	oui	oui	oui	oui	oui	oui
VHH-6	oui	non		oui		
VHH-7						
VHH-8		non				

Modifié de (Griffiths, 1998, Palu *et al*., 2001)
Note : Oui : données supportant une stimulation, non : données à l'encontre d'une stimulation, blanc : aucune donnée raportée.

La preuve que de tels phénomènes surviennent *in vivo* a été démontrée par l'augmentation significative du nombre de particules du VIH dans des kératinocytes co-infectés avec le VHS-1 et le VIH, comparativement à ceux uniquement infectés par le VIH (Heng *et al*., 1994). Des études cliniques ont également révélé une association entre l'excrétion (symptomatique ou non) du VHS et une augmentation des niveaux d'ARN plasmatique du VIH (Mole *et al*., 1997, Schacker *et al*., 2002). De plus, un traitement suppressif journalier

à l'ACV a été associé à une diminution significative (48%) de la charge plasmatique d'ARN viral chez des individus co-infectés par ces deux virus (Schacker *et al*., 2002). Les résultats indiquent que les épisodes de réactivation du VHS (incluant le VHS-1, mais de façon plus prédominante le VHS-2 chez les patients évalués) influencent de façon marquée la virémie engendrée par le VIH. Ces réactivations pourraient même être à l'origine des fluctuations des charges virales du VIH observées chez certains patients (Mellors *et al*., 1996, Palella *et al*., 1998). L'ajout de l'ACV dans le traitement de l'infection secondaire au VIH serait probablement bénéfique, et cette possibilité devrait être évaluée prochainement (Schacker *et al*., 2002). La plupart des études ont cependant été effectuée avant l'instauration de la triple thérapie (HAART) et l'effet de celle-ci sur l'excrétion du VHS n'a pas encore été clairement démontré.

1.10 Diagnostic de l'infection secondaire au VHS

Les méthodes de diagnostic des infections au VHS ont connu un progrès indéniable depuis ces dernières années et sont en constante évolution. Celles-ci reposent généralement sur la détection de la réplication virale, la présence d'antigènes viraux ou d'anticorps dirigés contre ceux-ci, ou sur la détection de l'ADN viral. L'histoire clinique et l'examen physique sont également utiles pour effectuer le diagnostic d'une infection au VHS. Cependant, en raison des présentations atypiques et de l'impact psychologique associé au diagnostic, il est essentiel de confirmer le diagnostic d'une infection herpétique (autre que labiale) au moins une fois chez un individu symptomatique par des méthodes virologiques.

La sensibilité des méthodes utilisées pour le diagnostic d'une infection herpétique peut dépendre considérablement de la qualité du prélèvement et des conditions de transport. Dans le cas d'une éruption vésiculaire, il faut choisir les lésions les plus jeunes et prélever le liquide et les cellules de la base sans faire saigner. Dans le cas de recherche systématique et en l'absence de signes cliniques, les prélèvements sont réalisés par un large écouvillonnage au niveau de la muqueuse concernée (génitale, oropharyngée) (Thouvenot & Najioullah, 1999). L'examen cytologique direct par coloration permet dans certains cas de visualiser les lésions cellulaires, mais cette méthode est très peu spécifique (Cohen, 1994). Puisque les VHS sont fragiles, il est préférable que le prélèvement soit déposé dans

un milieu de transport permettant une bonne survie et que le délai de transport n'excède pas les 2 à 4 h à une température variant entre 4 et 8 ºC.

L'isolement du virus en culture cellulaire est encore la méthode de choix pour la détection directe du VHS dans les prélèvements. De plus, il permet d'évaluer la sensibilité des virus aux antiviraux, mesure particulièrement importante pour le traitement des patients immunosupprimés. Les spécimens sont inoculés dans des cellules permissives telles que des cellules épithéliales (Véro : cellules de rein de singe transformées) et des fibroblastes (MRC-5 : cellules embryonnaires humaines diploïdes de poumon) et l'effet cytopathique, sous la forme de foyers de cellules arrondies, est habituellement observé dans les 24 à 72 h. La sensibilité de cette méthode peut cependant décroître avec l'évolution des lésions, i.e. des vésicules aux croûtes (Thouvenot & Morfin, 2002). Plusieurs autres méthodes ont été rapportées pour détecter plus précocement la réplication du VHS. Par exemple, des lignées cellulaires génétiquement modifiées ont été construites (BHKICP6LacZ-5) (Patel *et al*., 1999, Stabell *et al*., 1993). Ces cellules contiennent le gène rapporteur LacZ, sous le contrôle du promoteur du gène ICP6 du VHS. En cas d'infection par celui-ci, LacZ est exprimé et il y a accumulation intracellulaire de β-galactosidase. Une réaction histochimique révèle la présence de cellules infectées détectables par une mesure de la densité optique. Ces cellules sont maintenant commercialisées et disponibles sur le marché (ELVIS®; Diagnostic Hybrids). Des méthodes similaires, mais utilisant d'autres gènes rapporteurs tels que la luciférase (Olivo, 1994) ou la protéine fluorescente verte (Kung *et al*., 2000) ont également été développées. La détermination du type de virus (VHS-1 ou -2) peut être utile dans certains cas pour attribuer un facteur pronostic puisque tel que discuté, la maladie génitale causée par le type 1 a endance à récidiver moins fréquemment qu'avec le type 2, ce qui est important à transmettre au patient. Le génotypage peut alors être effectué par immunofluorescence à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques, en présence d'un effet cytopathique compatible.

La mise en évidence d'antigènes herpétiques directement dans les spécimens cliniques par des méthodes d'immunofluorescence, d'immunoperoxydase ou par ELISA, a l'avantage d'être réalisable dans des temps plus courts (1 à 4 h) et peut discriminer entre le type

d'infection (VHS-1 ou –2). Des anticorps monoclonaux commercialisés à cet effet et dirigés contre la glycoprotéine G sont disponibles et peuvent être marqués ou non. Les cellules infectées se distinguent alors facilement en microscopie par la présence d'une inclusion nucléaire fluorescente ou par la coloration des cellules infectées. Les méthodes ELISA présentent l'avantage d'être automatisables, mais manquent de sensibilité (Thouvenot & Morfin, 2002). Cependant, ces méthodes de détection antigénique sont fiables que dans les cas d'infections symptomatiques (Verano & Michalski, 1995).

La sérologie non spécifique du VHS a peu d'intérêt en clinique puisqu'elle ne permet pas de distinguer entre les deux types de virus. La sérologie de type spécifique (VHS-1 et –2) a cependant une place prépondérante dans les enquêtes épidémiologiques pour l'évaluation de l'incidence des infections herpétiques dans une population donnée. Elle peut également confirmer l'infection herpétique dans des cas de présentations asymptomatiques ou mal diagnostiquées ou encore en l'absence de culture positive ainsi que pour évaluer le risque chez des couples stables discordants. La sérologie peut également être importante pour le diagnostic de l'herpès génital chez la femme enceinte. En effet, le dépistage d'anticorps contre le VHS chez le conjoint d'une femme enceinte séronégative permettra de prendre les mesures de préventions nécessaires afin d'éviter une infection herpétique primaire en cours de grossesse (Brown, 1998). Plusieurs méthodes ont été utilisées afin de rechercher les anticorps contre le VHS-1 et -2 dont la neutralisation, la fixation du complément, l'immunofluorescence, l'immunobuvardage (Western blot) et l'ELISA. Cette dernière méthode est maintenant la plus utilisée pour la recherche d'anticorps spécifiques au VHS-1 et –2 (anticorps dirigés contre la gG1, gG2) et elle permet également la détection d'IgM associées à des infections actives (Ohana *et al*., 2000). Plusieurs méthodes sont maintenant commercialisées (révisées dans (Thouvenot & Morfin, 2002)) dont le POCkit/VHS2 test rapid® (Diagnology) qui peut être effectué en l'espace de 6 à 10 min. Ce test comporte une sensibilité de 96% et une spécificité de 98% en comparaison avec la méthode Western blot (Ashley *et al*., 2000). Cependant, la séroconversion peut être démontrée seulement deux semaines suivant l'apparition des symptômes de l'infection virale (Ashley, 2001). Finalement, la comparaison de trois trousses de détection par ELISA commercialisées (Diamedix, Wampole Laboratories, Zeus Scientific) dont les antigènes sont constitués de

particules virales inactivées et de la trousse Meridian Diagnostics dont les antigènes sont des glycoprotéines natives purifiées par affinité, montre que seule cette dernière ne donne aucune réaction croisée entre les VHS-1 et –2. Cette dernière trousse possède une sensibilité et une spécificité de 98 et de 96% respectivement, pour le VHS-1, et de 90 et 100% pour le VHS-2 (Martins *et al*., 2001).

Les méthodes de biologie moléculaire ont permis de faire des progrès importants dans le diagnostic des infections herpétiques et ce, particulièrement dû à leur grande sensibilité. L'amplification génique par PCR est actuellement indispensable pour les diagnostics de l'encéphalite herpétique (Mitchell *et al*., 1997) et de l'herpès néonatal (Jacobs, 1998). Des amorces spécifiques à la fois pour le VHS-1 et –2 (gB ou ADN pol) sont habituellement utilisées et l'ADN viral peut être amplifié du LCR. Cette méthode s'avère très spécifique et sensible (>95%) en comparaison avec la culture à partir de biopsie cérébrale (Lakeman & Whitley, 1995). Cependant, il n'y a pas encore de méthode PCR standard pour la détection du VHS et les paramètres utilisés varient d'un laboratoire à l'autre. De plus, certains contaminants du LCR tels que l'hémoglobine ou des inhibiteurs (héparine) peuvent entraîner de faux négatifs, alors que la présence d'amplicons contaminants peut mener à des faux positifs. La méthode d'amplification par PCR pourrait certainement être utilisée pour le diagnostic des infections mucocutanées, mais les coûts/bénéfices ne sont pas encore favorables. En fait, cette méthode a démontré que l'excrétion asymptomatique était très fréquente (Cone *et al*., 1994, Wald *et al*., 2000) et une étude récente a mis en évidence la sensibilité supérieure de cette méthode par rapport à la culture cellulaire et ce, particulièrement durant les mois d'été (Wald *et al*., 2003)

1.11 La prévention de l'infection

Dû à l'augmentation croissante des infections génitales causées par le VHS, à la grande morbidité et mortalité associées à l'herpès néonatal de même qu'à l'encéphalite herpétique et à la relation intime entre l'infection au VHS et l'acquisition du VIH, des efforts constants doivent être déployés afin de prévenir la transmission du VHS.

1.11.1 Mesures générales

La persistance du VHS durant toute la vie des individus infectés et l'excrétion virale en l'absence de symptômes favorisent la transmission du VHS. L'infection au VHS-2 est en fait l'une des MTS les plus prévalentes à travers le monde (Corey, 1994, Nahmias *et al*., 1990). La fréquence de l'excrétion virale est très variable d'un individu à l'autre, allant de 4% à 75% des jours. Malheureusement, il n'y a aucun indicateur qui suggère qu'un individu plutôt qu'un autre, excrète plus ou moins fréquemment du virus (Wald *et al*., 1997). Une étude nationale effectuée aux États-Unis a révélé que 90% des individus séropositifs pour le VHS-2 nient avoir déjà eu une histoire d'herpès génital (Fleming *et al*., 1997), alors que la majorité de ceux-ci excrétaient du virus dans leur tractus génital (Wald *et al*., 2000). En effet, plusieurs individus ne savent pas reconnaître les signes et symptômes associés à l'herpès génital, et suite à leur éducation sur ce sujet, plusieurs rapportent en effet avoir déjà eu de tels symptômes (Frenkel *et al*., 1993, Langenberg *et al*., 1989, Wald *et al*., 2000). Les individus devraient donc être bien renseignés sur les différentes manifestations cliniques de l'herpès génital. Les personnes infectées devraient également être avisées des risques possibles de transmission du virus à leur(s) partenaire(s) sexuel(s) durant des périodes de récurrences asymptomatiques (Koelle *et al*., 1992, Wald *et al*., 1995). En effet, 70% des épisodes de transmission du VHS sont associés à des réactivations asymptomatiques du virus, mais l'efficacité de la transmission est plus élevée lorsqu'il y a présence de lésions (Mertz *et al*., 1992). L'usage du condom réduit les risques de propagation du VHS de l'homme à la femme (Wald *et al*., 2001), et il devrait constamment être utilisé par les individus infectés. Cependant, la présence de lésions extragénitales peut tout de même permettre la transmission du VHS et ce même avec l'usage du condom (Cates & Stone, 1992a, Cates & Stone, 1992b). Il est aussi conseillé d'éviter toutes relations sexuelles durant les périodes de réactivations symptomatiques. Il existe également un risque de transmission du VHS-1 de la sphère oro-labiale au niveau génital, et les patients devraient en être informés (Kinghorn, 1999). Pour éviter l'infection néonatale, il est important de recommander aux femmes enceintes séronégatives d'éviter toutes relations sexuelles non protégées avec un partenaire séropositif surtout durant le dernier trimestre de grossesse. Chez la femme enceinte déjà séropositive ou avec antécédant d'herpès génital et

sur le point d'accoucher, un examen vaginal ainsi qu'une culture virale s'il y a des lésions sont recommandés. En présence de lésions compatibles, une césarienne est suggérée s'il s'est écoulé moins de 6 à 8 h depuis la rupture des membranes. De plus, chez les femmes séropositives, un traitement antiviral suppressif avec l'ACV peut être envisagé vers la fin de la grossesse pour réduire les risques de récurrences et la nécessité de la césarienne (Brocklehurst, 1998, Scott *et al*., 1996). Cependant, cette mesure, comme tout autre traitement médical durant la grossesse, doit être prise avec précaution. De plus, on ne sait pas si cette intervention va diminuer les risques d'herpès néonatal.

Une des questions qui demeure encore très débattue, est de savoir si un traitement antiviral élimine les risques de transmission du VHS. Une thérapie antivirale suppressive réduit en effet significativement la fréquence de l'excrétion virale symptomatique ou non, mais ne l'élimine pas complètement (Wald *et al*., 1997, Wald *et al*., 1996). En effet, un traitement oral suppressif à l'ACV (400 mg, deux fois par jour) permet de réduire l'excrétion virale du tractus génital de femmes immunocompétentes infectées par le VHS-2 de 100% à 80% lorsque mesurée par culture virale ou par PCR, respectivement (Wald *et al*., 1997). D'un autre côté, un virus détecté par PCR pourrait être transmis même en l'absence de cultures positives (Brown *et al*., 1997). De plus, il n'existe encore aucune donnée concernant l'efficacité d'un traitement post-exposition au VHS (Corey, 2002). De récentes données ont démontré que le valacyclovir (500 mg, par voie orale, deux fois par jour) diminuait les risques de transmission de l'infection au VHS de 50% dans les couples stables discordants (information non publiée de L. Corey, 2002).

1.11.2 Les vaccins

La meilleure stratégie afin de prévenir les infections demeure la vaccination. Le vaccin idéal est celui qui induit une immunité stérilisante, i.e. qui prévient totalement l'infection. Dans le cas du VHS, un vaccin prophylactique n'a pas encore été démontré comme étant efficace et n'est peut-être même pas envisageable. En effet, un des problèmes majeurs concernant l'immunisation contre le VHS est le fait que le virus réussisse à se réactiver de sa latence, et à se répliquer efficacement même en face de l'immunité naturelle de l'hôte. De plus, dans la majorité des cas, les individus immunisés contre le VHS-1 succombent

tout de même à l'infection initiale par le VHS-2, malgré la présence d'une immunité croisée. Le VHS a en effet développé plusieurs stratégies afin de s'évader du système immunitaire de l'hôte et celles-ci doivent jouer un rôle important dans l'inefficacité des mécanismes de défense de l'hôte infecté (Favoreel *et al*., 2000). L'obtention d'un vaccin thérapeutique est donc plus réaliste dans le cas de l'infection au VHS et avec celui-ci on tente ; I) de prévenir ou de diminuer les manifestations cliniques de l'infection primaire en prévenant ou diminuant la réplication virale au site d'infection; II) de prévenir ou de diminuer la colonisation des ganglions sensitifs et; III) de réduire la fréquence ou la sévérité des récurrences. En visant les individus déjà infectés par le VHS, un vaccin thérapeutique aurait donc pour but principal la réduction de l'excrétion virale chez les individus symptomatiques ou non (Whitley & Hilliard, 2002).

Plusieurs types de vaccins contre l'infection au VHS ont été développés et sont encore à l'étude. Ceux-ci peuvent être divisés en deux grandes catégories : les vaccins vivants et les vaccins non-vivants. Les vaccins vivants sont habituellement plus efficaces pour stimuler une réponse immunitaire étendue, alors que les vaccins non-vivants sont habituellement moins immunogènes, mais ils entraînent moins d'inquiétude concernant certains problèmes de sécurité pouvant être reliés à l'administration des vaccins (Tableau 5, p.55). La majorité des vaccins ont été développés dans le but de prévenir l'infection génitale au VHS-2, mais on assume qu'ils auraient tout de même un certain potentiel dans la prévention des autres types d'infection (Stanberry *et al*., 2000).

Tableau 5. Catégories de vaccins contre l'infection au VHS

Catégories de vaccins	Avantage(s)	Désavantage(s)
Vivants		
Atténué	Immunité étendue et durable.	Problèmes de stabilité et de sécurité.
Réplication limitée	Même que pour les virus atténués, mais moins d'inquiétude concernant les problèmes de sécurité.	– Immunogénicité plus limitée que les virus vivants atténués. – Tout de même certaines inquiétudes concernant leur sécurité.
Vecteur	Mêmes que pour les virus atténués, mais beaucoup plus sécuritaire.	Expression limitée des gènes du VHS et donc moins immunogène que les virus vivants-atténués.
Non-vivants		
Inactivé	– Facile à préparer. – Incapable de causer la maladie.	Moins immunogène que les vaccins vivants, doit donc être combiné à un adjuvant.
Sous-unitaire	– Très sécuritaire. – Assure une production constante.	– Moins bonne immunité due au nombre limité d'épitopes utilisés. – Doit être utilisés en combinaison avec des adjuvants afin d'induire une réponse à médiation cellulaire.
ADN	Induit à la fois une réponse à médiation cellulaire et humorale.	– Moins bonne immunité due au nombre limité d'épitopes exprimables. – Les problèmes de sécurité ne sont pas encore bien connus.

1.11.2.1 Les vaccins vivants

Les vaccins vivants ont été les premiers types de vaccins étudiés et certains ont démontré une grande efficacité pour le contrôle de plusieurs maladies infantiles (rougeole, rubéole, oreillons). Ceux-ci ont en effet l'avantage de conserver, en grande partie, l'intégrité des virus qui sont habituellement encore capables de se répliquer efficacement. Ce type de vaccin peut donc induire une réponse immunitaire étendue et durable. Traditionnellement,

les virus étaient atténués par le passage sérié d'une souche sauvage en culture cellulaire. Cette technique n'a cependant pas été conservée pour le VHS puisqu'on craint pour la stabilité des virus (possibilité de réversion) ainsi obtenus (Bernstein & Stanberry, 1999). Plus récemment, des approches moléculaires ont été tentées pour modifier des gènes impliqués dans la virulence du VHS et ainsi produire un virus inapte à entraîner la maladie. Plus spécifiquement, on vise à produire des virus capables de se répliquer en périphérie, mais non transportés dans le SNC ou dans les ganglions sensitifs. Certains gènes connus comme étant impliqués dans la neurovirulence du VHS sont excisés (TK virale ou γ34.5 (Meignier *et al*., 1988, Meignier *et al*., 1990, Spector *et al*., 1998a)) et dans certains cas, ils sont remplacés par d'autres gènes d'intérêts (glycoprotéines de surface) (Whitley & Roizman, 2002). Chez les animaux, de telles constructions ont mené à l'induction d'une immunité protectrice tout en étant considérablement atténuées dans leur pathogénicité et leur capacité à établir la latence. Chez l'humain cependant, de telles approches se sont avérées décevantes (Bernstein & Stanberry, 1999, Whitley & Roizman, 2002). Une autre alternative intéressante consiste en la construction de virus capables de se répliquer, mais de façon très limitée (Boursnell *et al*., 1997, Da Costa *et al*., 1997, Farrell *et al*., 1994). On surnomme ce type de vaccin DISC (*disabled infection single cycle*) et un des premiers prototypes est basé sur la délétion de la glycoprotéine H, ce qui permet seulement un cycle de réplication virale (Boursnell *et al*., 1997). D'autres gènes (UL54 :ICP27, UL29 :ICP8) ont également été délétés à cet effet (Da Costa *et al*., 1999, de Bruyn Kops *et al*., 1998). Malgré le fait que ces virus soient incapables de se disséminer, ils devraient entraîner une vaste réponse immunitaire. En effet, chez l'animal, ce type de vaccin prévient la maladie en induisant une immunité humorale et cellulaire spécifique (Boursnell *et al*., 1997, Da Costa *et al*., 1997). Ce type de vaccin a également été étudié dans un but thérapeutique (Da Costa *et al*., 1997, Farrell *et al*., 1994). Cependant, certaines craintes concernant leur potentiel de recombinaison avec des virus sauvages et d'oncogénicité sont présentes.

Une autre approche qui retient encore les avantages des vaccins vivants, mais qui entraîne moins d'inquiétude concernant les problèmes de sécurité, consiste en l'expression de gènes du VHS, mais dans un autre vecteur viral ou bactérien vivant. Une réponse à médiation humorale et cellulaire contre les protéines exprimées par ces organismes est donc possible

suite à une immunisation (Bernstein & Stanberry, 1999). Plusieurs vecteurs ont été proposés dont le virus de la vaccine, les adénovirus, le VZV et la *Salmonelle*. Les études ont démontré que l'immunité spécifique induite par ces vecteurs protège en effet les animaux contre le développement de la maladie (Chabalgoity *et al*., 1996, Gallichan *et al*., 1993, Karem *et al*., 1997). Ces approches n'ont cependant pas encore été tentées chez les humains.

1.11.2.2 Vaccins non-vivants

L'immunisation avec des virus inactivés a l'avantage d'éliminer en grande partie les inquiétudes concernant la sécurité des vaccins. Une telle stratégie thérapeutique ou prophylactique contre l'infection au VHS a été évaluée dès les années 1920 et jusqu'alors, plusieurs techniques ont été utilisées afin d'inactiver efficacement les virus (traitement chimique, chaleur, UV, etc.). Suite à une immunisation chez l'humain ou l'animal, les virus non-vivants, dans certain cas, se sont avérés efficaces pour la production d'anticorps neutralisants contre le VHS et pour conférer une certaine immunité contre l'infection (Whitley & Hilliard, 2002). Cependant, plusieurs de ces études étaient mal contrôlées et n'ont pas pu prouver de façon convaincante l'efficacité d'une telle approche. D'ailleurs, aucune grande compagnie n'investit présentement dans cette stratégie de vaccination (Stanberry *et al*., 2000).

L'essor connu dans le domaine de la biologie moléculaire a rendu possible le développement de vaccins sous-unitaires. Avec ceux-ci, tout problème de sécurité et de production en grande quantité est éliminé. Cependant, avec une telle approche, seulement une fraction des antigènes du VHS peuvent servir à l'immunisation, ce qui limite l'étendue de la réponse immune et, de ce fait, l'efficacité de celle-ci. De plus, les antigènes viraux seuls ne stimulent pas efficacement la réponse immunitaire à médiation cellulaire, particulièrement celle qui implique les cellules cytotoxiques associées au CMH de classe I, essentielle à la défense contre l'infection au VHS. Des adjuvants doivent donc être administrés en combinaison, ce qui augmente les risques de réactogénicité du vaccin (Burke, 1992). La course à la détermination du meilleur antigène pour la vaccination a mené à l'identification des glycoprotéines D et B de l'enveloppe virale en tant que cibles

clés pour le développement d'anticorps neutralisants (Burke, 1992) et de lymphocytes T CD4+ spécifiques (Mikloska *et al*., 1998). Quatre préparations de vaccins sous-unitaires différant selon les combinaisons d'épitopes utilisés et les adjuvants employés ont été évaluées lors d'études cliniques (Stanberry *et al*., 2000). Un de ces vaccins, manufacturé par Chiron Corporation, inclut de grandes concentrations de gD et de gB avec l'adjuvant MF59. L'immunisation avec ce vaccin a entraîné la production de hauts titres d'anticorps neutralisants, mais n'a cependant pas mené à la prévention de l'infection génitale causée par le VHS-2 (Coen & Schaffer, 1980). En effet, l'adjuvant MF59 induit une réponse immune de type Th2 par la sécrétion de l'IL-4 plutôt qu'une réponse via l'INF-γ (réponse de type Th1) (Singh *et al*., 1998). Le candidat le plus prometteur concerne le vaccin développé par GlaxoSmithKline qui utilise la gD-2 en tant que protéine stimulatrice et le monophosphoryl lipid A (MPL) et l'alum en tant qu'adjuvants. Les résultats récents d'une étude clinique ont démontré que les femmes séronégatives pour le VHS-1 et –2 immunisées avec ce vaccin, ont été protégées contre le développement de la maladie (73% d'efficacité), mais à un moindre niveau contre l'acquisition de l'infection (43% d'efficacité) (Stanberry *et al*., 2002). De façon surprenante, aucun bénéfice significatif n'a été observé chez les individus séropositifs pour le VHS-1 et chez les individus de sexe masculin. D'autres études sont nécessaires afin d'expliquer ces dernières observations.

Finalement, une innovation intéressante dans le domaine de la vaccination est l'immunisation directement à partir d'ADN plasmidique administré de façon intramusculaire. Avec cette approche, les antigènes viraux peuvent être présentés avec les CMH de classe I et II, ce qui permet de développer une réponse immunitaire à médiation cellulaire (Bernstein & Stanberry, 1999, Whitley & Roizman, 2002). Dans le cas du VHS, les gènes d'intérêts pour une telle application sont ceux codant pour la ICP27 et les glycoprotéines de l'enveloppe virale. L'immunisation d'animaux avec des plasmides codant pour les gD et gB a mené à une réponse humorale et cellulaire spécifique au VHS et à la protection contre l'infection expérimentale (Manickan *et al*., 1995, McClements *et al*., 1996, McClements *et al*., 1997, Strasser *et al*., 2000). De façon intéressante, Jeong et ses collaborateurs ont utilisé de l'ADN plasmidique codant pour certaines chimiokines afin de diriger la réponse immunitaire vers une réponse de type Th1 dominante, et les animaux

immunisés ont en effet démontré une protection contre une infection au VHS-2 létale (Sin *et al*., 2000). Cette approche pourrait donc être utilisée en tant qu'adjuvant à l'immunisation avec l'ADN viral. D'un autre côté, malgré le fait que l'ADN ne se réplique pas dans les cellules hôtes, des inquiétudes vis-à-vis la possible intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire sont présentes. Des vaccins à ADN sont actuellement en phase clinique chez l'humain (Bernstein & Stanberry, 1999).

1.12 Les traitements antiviraux

Un traitement antiviral idéal vise à cibler et inhiber le plus spécifiquement possible un événement de la réplication virale, sans pour autant influencer celle de la cellule hôte. L'attachement viral, l'entrée, la décapsidation, la synthèse protéique, la réplication de l'ADN, l'assemblage, et le bourgeonnement sont les points majeurs de la réplication du VHS (voir Figure 2, p.9) et sont donc autant de cibles potentielles pour les antiviraux. Jusqu'à maintenant, cependant, les seuls antiviraux ayant démontré une efficacité contre le VHS et ayant une toxicité minimale et une présentation adéquate pour l'humain, ont tous pour cible ultime l'ADN pol viral. Dépendant de leur mécanisme d'interaction avec celle-ci, on peut classer les antiviraux présentement disponibles pour le traitement de l'infection au VHS en deux classes distinctes : I) les analogues des nucléosides, comprenant l'acyclovir (ACV) et le penciclovir (PCV) et leur prodrogue respectif, le valacyclovir et le famciclovir, constituent les traitements de premiers choix contre les infections au VHS. Les analogues de nucléosides phosphonates (ANP) qui incluent le cidofovir (CDV) et l'adéfovir (ADV) peuvent également être inclus dans cette classe. Cependant, ces derniers antiviraux ne sont pas encore approuvés pour le traitement de l'infection au VHS, mais ont tout de même démontré une efficacité dans l'inhibition de la réplication du VHS. Finalement, II) les analogues des pyrophosphates inorganiques (ppi) constituent la deuxième classe d'antiviraux, et comprend le foscarnet (FOS), qui est le traitement de seconde ligne dans le cas d'infections résistantes aux analogues des nucléosides. La structure chimique de ces différents antiviraux est présentée à la Figure 5 (p.60) et leur mécanisme d'action est représenté de façon schématique à la Figure 6 (p.62). Des molécules inhibant d'autres

événements de la réplication du VHS sont également en développement et quelques-unes seront présentées dans les sections suivantes.

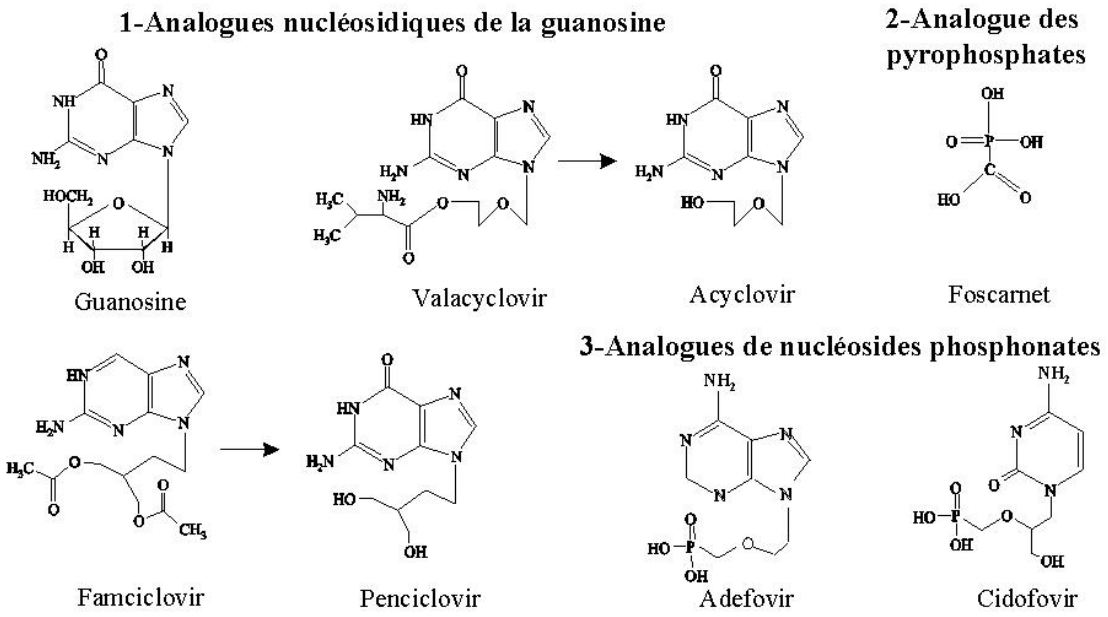

Figure 5. Structure chimique des différents agents ayant une activité anti-herpétique.

1.12.1 Acyclovir et valacyclovir

L'ACV [9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine], Zovirax®, (GlaxoSmithKline) est un analogue de la 2'-déoxyguanosine. Sa découverte a été la plaque tournante du traitement des infections herpétiques, et depuis plusieurs années, l'ACV et ses dérivés sont considérés comme le traitement de choix des infections au VHS-1, -2 et au VZV. En effet, on a estimé que l'ACV et le valacyclovir (son prodrogue) ont été administrés à plus de 80 millions d'individus jusqu'à maintenant (Tyring *et al.*, 2002). Contrairement à ses prédécesseurs (i.e. la vidarabine, la trifluridine et l'iodoxuridine), l'ACV démontre une efficacité remarquable et est très peu toxique. L'ACV possède une activité antivirale (par ordre

décroissant) pour les virus herpétiques suivants : VHS-1 et-2 >>VZV>EBV>CMV>HHV-6. Les indications de l'ACV comprennent le traitement des infections mucocutanées, du SNC et des manifestations systémiques causées par le VHS et le VZV.

L'ACV doit être sous sa forme triphosphorylée pour être actif (voir Figure 6, p.62). Le premier groupement phosphate est préférentiellement conféré par la TK virale ce qui détermine la sélectivité de l'ACV envers le VHS et le VZV. Contrairement à la TK codée par le EBV et le VHH-8, la TK des *α-herpesvirinae* possède une plus grande variété de substrats utilisables. De plus, la concentration de l'ACV-triphosphate est de 40 à 100 fois plus élevée dans les cellules infectées par le VHS que dans les cellules non-infectées (Whitley & Gnann, 1992). La conversion en ACV di- et triphosphate est par contre catalysée par les kinases cellulaires. Sous sa forme active, l'ACV-triphosphate entre en compétition avec le 2'-déoxyguanosine triphosphate en tant que substrat pour l'ADN pol virale. Suite à son insertion dans l'ADN en cours de réplication, la synthèse de l'ADN prend fin. En effet, l'ACV ne possède pas le groupement 3'-hydroxyl nécessaire à la formation du lien 3'-5'-phosphodiester et est donc un terminateur de chaîne. De plus, l'incorporation de l'ACV monophosphate dans l'ADN est irréversible puisque l'activité 3'-5'-exonucléase associée à l'ADN pol virale ne peut l'exciser. L'ACV triphosphate inhibe de 30 à 50 fois plus efficacement l'ADN pol virale que l'ADN pol cellulaire de type α (Furman *et al.*, 1984) ce qui contribue certainement à sa faible toxicité.

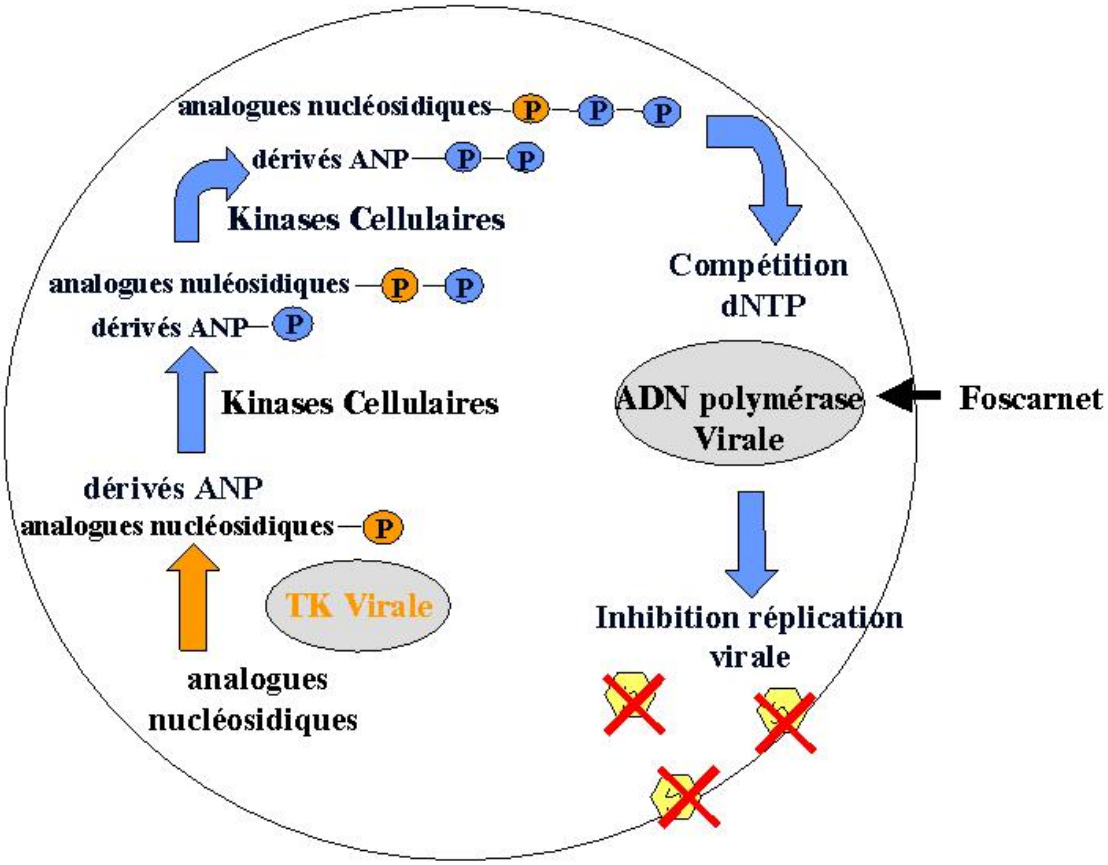

Figure 6. Mécanisme d'action des agents anti-herpétiques.

Plusieurs formulations d'ACV sont maintenant disponibles (orale, intraveineuse, topique et ophtalmique), et dans certains pays, l'ACV sous forme de crème contenant 5% d'ACV est offert en vente libre pour le traitement de l'herpès labial. Sous sa forme orale, des comprimés de 200 mg et de 800 mg, ainsi que des suspensions liquides d'ACV (200 mg dans 5 ml de diluent) sont disponibles. Par contre, suite à une administration orale, l'ACV est absorbé lentement et sa biodisponibilité est assez faible (10 à 20%) (de Miranda & Blum, 1983). D'un autre côté, suite à l'administration d'un comprimé de 200 mg, les

concentrations plasmatiques d'ACV (0,6 μM) excèdent grandement la concentration qui inhibe 50% de la réplication virale (CI_{50}) des VHS-1 et -2 en culture cellulaire (moyenne des CI_{50} : 0,1 μM et 0,4 μM, respectivement) (Balfour, 1988). La demi-vie plasmatique relativement courte de l'ACV (2 à 3 h) et de l'ACV triphosphate intracellulaire (1 à 2 h) nécessite des administrations fréquentes (3 à 5 fois par jour), ce qui a mené au développement du valacyclovir.

De façon générale, la formulation orale de l'ACV est indiquée pour le traitement des infections génitales primaires (200 mg, 5 fois par jour ou 400 mg, 3 fois par jour, durant 10 jours), récurrentes (*idem* mais durant 5 jours) ou en tant que thérapie suppressive (400 mg, 2 fois par jour ou 200 mg 3 fois par jour). Le traitement oral diminue substantiellement les symptômes associés à l'infection primaire (Bryson *et al*., 1983, Mertz *et al*., 1984), mais n'affecte pas le cours normal de l'infection au VHS et les patients traités vont tout de même présenter des infections récurrentes. Une étude récente a démontré que l'ACV administré oralement à raison de 800 mg 3 fois par jour durant 2 jours réduit de façon significative la durée des lésions récurrentes et de l'excrétion virale (Wald & Ashley-Morrow, 2002). Le traitement suppressif avec l'ACV diminue significativement la fréquence des récurrences (Kaplowitz *et al*., 1991) et réduit l'excrétion virale asymptomatique (Wald *et al*., 1996), sans sélectionner davantage les virus résistants chez les individus immunocompétents (Fife *et al*., 1994). Dans le cas des récurrences d'herpès labial, habituellement de courte durée chez les patients immunocompétents, le rapport coût/bénéfice peut ne pas être intéressant. Certaines études ont cependant démontré un léger avantage du traitement oral ou topique par rapport au placebo (Fiddian *et al*., 1983, Spruance & Freeman, 1990, Spruance *et al*., 1990). Des travaux ont également rapporté que l'ACV sous formulation orale permettait de diminuer significativement le taux de réactivation de l'herpès labial chez des skieurs ayant débuté une thérapie suppressive avant une exposition solaire (Spruance *et al*., 1988). Chez les patients immunosupprimés, cependant, les infections mucocutanées sont habituellement beaucoup plus graves et un traitement antiviral systémique (i.v. ou oral) est indiqué. Les encéphalites herpétiques et les autres affections systémiques doivent être traitées par une administration intraveineuse d'ACV (10 mg/kg aux 8 h durant 14 jours).

De façon générale, l'ACV est très bien toléré et les effets secondaires sont habituellement non spécifiques (Tyring *et al*., 2002). Des patients traités quotidiennement avec l'ACV sous forme orale (400 mg deux fois par jour) ont été suivis durant 10 ans sans effets secondaires significatifs (révisé dans (Tyring *et al*., 2002)). Chez les adultes sains, 85% de l'ACV est excrété inchangé dans l'urine. Chez les insuffisants rénaux, des doses moins élevées d'ACV devraient donc être administrées. Une néphropathie transitoire et une élévation de la créatinine résultant de la cristallisation de la molécule dans les tubules rénaux ont été rapportées. Ce problème est cependant minimisé par une hydratation adéquate et une infusion intraveineuse plus lente. Des atteintes du SNC ont également été observées en de rares occasions suite à une administration intraveineuse (Cohen *et al*., 1984, Wade & Meyers, 1983). Le traitement à l'ACV de la femme enceinte, même durant le premier trimestre, ne semble pas avoir de répercussions néfastes pour le fœtus (Reiff-Eldridge *et al*., 2000). Cependant, il doit être administré qu'en cas de nécessité et avec un bon suivi médical.

Le valacyclovir (2-[2-amino-1,6-dihydro-6-oxo-9H-purine-9-yl-méthothy]éthyl-L-valinate hydrochloride), Valtrex® (GlaxoSmithKline), a été développé pour améliorer la faible biodisponibilité de l'ACV. Le nombre de doses administrées est maintenant plus convenable (1 à 3 fois par jour selon les indications, comparativement à de 3 à 5 fois par jour pour l'ACV) et il est probable que le valacyclovir remplace presque complètement l'ACV pour le traitement des infections à VHS et à VZV chez les individus immunocompétents (Naesens & De Clercq, 2001). Le valacyclovir est le L-valyl ester de l'ACV, et est seulement disponible sous formulation orale. Suite à son ingestion, le valacyclovir est rapidement converti en ACV par l'enzyme valacyclovir hydrolase dans le tractus gastro-intestinal et dans le foie (Soul-Lawton *et al*., 1995). La biodisponibilité de l'ACV suite à l'ingestion du valacyclovir est alors augmentée de trois à cinq fois pour atteindre 55% (Soul-Lawton *et al*., 1995). Le L-valyl ester de l'ACV sert seulement à améliorer sa biodisponibilité et n'altère pas le mécanisme d'action de l'ACV. Le valacyclovir a démontré une efficacité similaire à l'ACV pour le traitement d'infections génitales primaires (1 g, 2 fois par jour durant 10 jours) (Fife *et al*., 1997) et pour le traitement des récurrences (500 mg, 2 fois par jour durant 3 à 5 jours) (Leone *et al*., 2002,

Tyring *et al*., 1998). Le valacyclovir semble plus efficace que le placebo pour diminuer le temps de guérison des lésions (4,1 vs 6,0 jours) et de la douleur associée (Spruance *et al*., 1996, Tyring *et al*., 1998). Le valacyclovir (500 mg, 1 fois par jour) a également démontré une efficacité en tant que traitement suppressif (Patel *et al*., 1997, Reitano *et al*., 1998). En fait, pour les patients ayant moins de 10 récurrences par année, des doses de 500 mg par jour sont recommandées pour la suppression des récurrences d'herpès génital chez les immunocompétents, alors que 1000 mg une fois par jour ou 250 mg deux fois par jours constituent les doses de valacyclovir à administrer pour ceux ayant plus de 10 récurrences par année. Une étude récente menée par Laiskonis et ses collaborateurs a évalué l'efficacité d'un traitement de 1000 mg deux fois par jour durant une journée ou de 500 mg deux fois par jour durant trois jour, pour le traitement de l'herpès labial récurrent. Les résultats de l'étude n'ont pas permis de démontrer une équivalence significative ou moindre entre ces deux traitements, mais ont démontré une efficacité supérieure de l'un ou de l'autre de ces deux traitements dans la prévention de l'apparition des lésions herpétiques, comparativement aux études précédentes utilisant les autres formes de traitement (Laiskonis *et al*., 2002). Finalement, un traitement d'une journée à haute dose de valacyclovir (deux doses de 2 g) a démontré une efficacité significative dans la réduction de la durée moyenne des épisodes d'herpès labial (diminution de 1.1 journée) comparativement au groupe placebo (Spruance *et al*., 2003). Le valacyclovir est bien toléré et les effets secondaires semblent non spécifiques. Des études ont également relevé le potentiel de l'utilisation du valacyclovir à haute dose (2 g, 4 fois par jour) en tant que traitement prophylactique contre l'infection à CMV chez les transplantés et les patients atteints du SIDA (Emery *et al*., 1999, Lowance *et al*., 1999). Le valacyclovir est maintenant approuvé pour le traitement des infections génitales primaires et récurrentes chez les patients immunocompétents. Par contre, l'ACV administré de façon intraveineuse demeure le traitement de choix dans le cas d'infections sévères telles que l'herpès néonatal, l'encéphalite et l'herpès disséminé.

1.12.2 Penciclovir et famciclovir

Le penciclovir ([9-(4-hydroxy-3-hydroxy-3-hydroxyméthylbut-1-yl)guanine]), est un analogue acyclique de la guanosine. Le penciclovir possède une structure semblable au ganciclovir (GCV) et son mécanisme d'action est similaire à celui décrit pour l'ACV, excepté qu'il n'est pas un terminateur de chaîne obligatoire. Par contre, le penciclovir diffère de l'ACV en terme de taux de phosphorylation, de sa concentration cellulaire et de sa stabilité intracellulaire sous forme triphosphorylée (Earnshaw *et al*., 1992). Des concentrations 100 fois plus élevées que celles de l'ACV triphosphate sont nécessaires afin d'inhiber l'ADN pol virale, mais les concentrations plus élevées de penciclovir-triphosphate et sa longue demi-vie intracellulaire (15 à 20 h vs 0,7 à 1 h pour l'ACV) viennent contrecarrer ce désavantage (Weinberg *et al*., 1992). La biodisponibilité du penciclovir est très faible et il est seulement approuvé sous une formulation topique Denavir® (Novartis) (crème 1% de penciclovir) pour le traitement de l'herpès labial. Une étude comparative entre le penciclovir et l'ACV sous forme de crème (1% et 3%, respectivement) pour le traitement de l'herpès génital a révélé que le penciclovir entraîne une diminution significative du temps de formation des croûtes (Chen *et al*., 2000b).

Le famciclovir ([9-(4-hydroxy-3-hydroxyméthylbut-1-yl)guanine]), Famvir® (Novartis) est l'analogue diacétyl-6-déoxy du penciclovir. Sa biodisponibilité est de 77% et il est bien absorbé suite à une administration orale. Le famciclovir est rapidement métabolisé en penciclovir suite à une déacétylation dans le tractus gastro-intestinal, dans le sang, et dans le foie (Hammer & Inouye, 1997). Suite à une dose orale de 500 mg de famciclovir, des concentrations plasmatiques de 3,3 µg/ml sont atteintes en 1 h et la demi-vie plasmatique est de 2 h (Filer *et al*., 1994, Pue *et al*., 1994). Le famciclovir est présentement approuvé pour le traitement de l'herpès zoster et pour le traitement des infections génitales récurrentes causées par le VHS chez les patients immunocompétents. Des études ont démontré une efficacité comparable entre l'ACV (200 mg, 5 fois par jour) et le penciclovir (250 mg, 3 fois par jour), dans le traitement de l'infection génitale primaire (Loveless *et al*., 1995). Dans le cas des récurrences, le famciclovir à des doses de 125 mg, deux fois par jour, semble diminuer le temps de guérison des lésions comparativement au placebo (3,8

jours vs 4,8 jours), la durée de l'excrétion virale (1,75 jours vs 3,3 jours), et la durée des symptômes (3,2 jours vs 3,7 jours) (Sacks *et al*., 1996). Le famciclovir est également bien toléré lorsqu'il est administré en prophylaxie (250 mg 2 fois par jour) et permet de diminuer significativement la fréquence des récurrences (moyenne du temps d'apparition de la première récurrence >120 jours vs 82 jours avec le placebo) (Diaz-Mitoma *et al*., 1996, Mertz *et al*., 1997). De façon intéressante, une étude effectuée chez la souris a démontré que le famciclovir interfère avec l'établissement de la latence du VHS-1 dans les ganglions périphériques (Thackray & Field, 2000). Jusqu'à maintenant, il n'y a aucune évidence que l'ACV, le valacyclovir ou le famciclovir possède une activité supérieure l'un par rapport à l'autre dans le traitement de l'herpès génital, et le choix du traitement antiviral revient au clinicien et au patient.

1.12.3 Traitement des patients immunosupprimés

Tel que discuté préalablement (section 1.9, p.43), les patients immunosupprimés (VIH-positifs, cancéreux, greffés) sont plus à risque de développer des infections herpétiques sévères. Les infections mucocutanées sont souvent plus graves et les récurrences beaucoup plus fréquentes. L'ACV administré par voie intraveineuse est considéré comme étant le traitement de choix des individus immunosupprimés. Le penciclovir administré de façon intraveineuse semble également posséder un potentiel équivalent (Balfour, 1999) mais n'est pas commercialisé à l'heure actuelle. La combinaison d'un traitement à l'ACV intraveineux suivi d'une thérapie orale chez des patients ayant reçu une transplantation, semble diminuer les infections symptomatiques (Earnshaw *et al*., 1992). Chez les patients ne requérant pas d'hospitalisation, une administration orale de valacyclovir, famciclovir ou d'ACV est acceptable pour le traitement et la suppression des récurrences, mais un suivi serré doit être effectué. Les patients infectés par le VIH bénéficient également d'un traitement suppressif avec l'ACV. Le valacyclovir et le famciclovir ont également démontré une efficacité chez ces patients (Schacker *et al*., 1998a). Cependant, un traitement à hautes doses de valacyclovir (8 g par jour) a été associé avec un syndrome hémolytique urémique et de purpura thrombocytopénique thrombotique chez des individus immunosupprimés (Bell *et al*., 1997, Feinberg *et al*., 1998). Les mécanismes sous-tendant cette association n'ont

cependant pas été élucidés. Quelques observations suggèrent que la thérapie antivirale répond cependant moins rapidement chez les individus atteints du SIDA, et que des doses plus élevées sont requises afin de les traiter efficacement (Maier *et al*., 1986). D'un autre côté, les virus résistant à l'ACV sont plus fréquemment isolés chez les individus immunosupprimés traités à l'ACV (Christophers *et al*., 1998, Englund *et al*., 1990, Erlich *et al*., 1989b), et ceux-ci démontrent également une résistance croisée au penciclovir (Safrin & Phan, 1993, Sarisky *et al*., 2001). Des mutations dans le gène de la TK virale sont en effet le plus souvent à l'origine de la résistance du VHS à l'ACV et l'utilisation d'un antiviral possédant un mécanisme d'action sensiblement différent est souvent nécessaire, dans les cas suspectés ou confirmés de résistance, afin d'éradiquer l'infection virale.

1.12.4 Foscarnet

Le foscarnet (trisodium phosphonoformate, Foscavir®, Astra-Zeneca) est un analogue des ppi et diffère considérablement des analogues nucléosidiques décrits préalablement. Le FOS ne requiert pas d'activation préalable par la TK virale ou par les TK cellulaires ce qui explique son efficacité contre des mutants VHS et VZV résistant à l'ACV dus à des mutations dans le gène de la TK (Cohen *et al*., 1999, Erlich *et al*., 1989a, Safrin *et al*., 1990). Il est un inhibiteur non compétitif de l'ADN pol virale et n'est pas incorporé dans le brin d'ADN en cours d'élongation. Le foscarnet (FOS) bloque le site de liaison des ppi sur l'ADN pol et de ce fait, empêche le clivage des nucléosides triphosphates et le transfert des ppi sur l'ADN pol virale (Balfour, 1999). Le FOS démontre un large spectre d'activité et est efficace *in vitro* contre le VHS-1 et –2, le VZV, le CMV, l'EBV, le VHH-6, le VIH et le virus de l'hépatite B (Crumpacker, 1992). Les différentes valeurs de CI_{50} nécessaires afin d'inhiber ces virus dépendent probablement du transport de cette molécule hautement chargée à travers les différentes membranes cellulaires. Le FOS est uniquement disponible sous formulation intraveineuse et est indiqué pour le traitement des infections causées par des VHS et des VZV résistant à l'ACV, de même qu'en tant que traitement alternatif contre les infections secondaires au CMV résistant au GCV. En effet, une étude effectuée chez des patients atteints du SIDA et infectés par des souches de VHS résistant à l'ACV a permis de démontrer que le FOS est efficace dans 81% des cas (Safrin *et al*., 1990). Cependant, sa

toxicité systémique et la non-disponibilité d'une formulation orale limitent son utilisation. La néphrotoxicité et des perturbations métaboliques telles que l'hypo- et l'hyperphosphatémie, l'hypo- et l'hypercalcémie, l'hypomagnésémie et l'hypokaliémie sont les effets secondaires les plus fréquemment rencontrés. Quelques études ont démontré l'efficacité d'une formulation topique pour le traitement de lésions causées par des VHS résistant à l'ACV (Javaly *et al*., 1999, Smith *et al*., 1997b). La résistance du VHS au FOS a également été rapportée en clinique et ces isolats sont habituellement sélectionnés suite à un traitement prolongé (Safrin *et al*., 1994b, Schmit & Boivin, 1999). Des mutations dans le gène de l'ADN pol du VHS sont habituellement à l'origine de la résistance du VHS au FOS et des virus résistant à l'ACV et au FOS ont déjà été isolés (Collins *et al*., 1989, Hwang *et al*., 1992, Sacks *et al*., 1989, Safrin *et al*., 1994b, Schmit & Boivin, 1999).

1.12.5 Cidofovir et adéfovir

Le cidofovir ((S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine), HPMPC, Vistide®, (Gilead Sciences) est un analogue des nucléosides phosphonates (ANP) qui appartient à la famille des dérivés phosphonylméthoxyalkyl des purines et des pyrimidines. Puisque sa structure primaire comprend déjà un groupement phosphate (Figure 5, p.60), il n'a pas besoin d'être phosphorylé par le produit d'un gène viral pour être activé. Les kinases cellulaires le convertissent en sa forme diphosphate qui est alors un inhibiteur compétitif de l'ADN pol viral. Le cidofovir (CDV) est donc efficace contre des VHS résistant à l'ACV dû à des mutations dans le gène de la TK virale (Mendel *et al*., 1995, Schmit & Boivin, 1999). Il a également démontré une certaine efficacité contre des virus résistant au FOS (Andrei *et al*., 2000, Bestman-Smith & Boivin, 2002, Schmit & Boivin, 1999). Des souches de CMV résistant au GCV et/ou au FOS ont également été rapportées comme étant susceptibles au CDV (révisé dans (Gilbert *et al*., 2002)). En fait, le CDV a initialement été développé pour le traitement du CMV. Il a rapidement été démontré que le CDV possédait un large spectre d'activité antivirale, inhibant *in vitro* tous les virus herpétiques ainsi que les papovavirus, les adénovirus, les hepadnavirus et les poxvirus (Naesens *et al*., 1997). Le CDV diphosphate a une affinité très supérieure pour les ADN pol viraux comparativement aux ADN pol cellulaires et inhibe celle du VHS à des

concentrations de 50 à 600 fois moins élevées (Biron *et al*., 1985, Ho *et al*., 1992a). Cet antiviral est également caractérisé par sa grande demi-vie intracellulaire (>24 h) qui nécessite des administrations peu fréquentes (Aduma *et al*., 1995, Ho *et al*., 1992b). Cependant, sa faible biodisponibilité orale nécessite une administration intraveineuse mais à raison de seulement une fois par semaine ou aux deux semaines. Le CDV est présentement approuvé pour le traitement des rétinites à CMV chez les patients atteints du SIDA, et plusieurs études non contrôlées ont démontré son efficacité pour le traitement des infections à VHS résistant à l'ACV et au FOS (Kopp *et al*., 2002, Lalezari *et al*., 1997, Lalezari *et al*., 1995, Lalezari *et al*., 1994, LoPresti *et al*., 1998, Snoeck *et al*., 1993, Snoeck *et al*., 1994). L'administration du CDV est cependant associée à de la néphrotoxicité et à de l'hypotonie oculaire. Une formulation topique (0,3%, ou 1,0%) a démontré une certaine efficacité contre des lésions résistant à l'ACV et au FOS chez les patients atteints du SIDA (Lalezari *et al*., 1997, Snoeck *et al*., 1994). Le CDV n'est cependant pas commercialisé sous cette forme. Des isolats cliniques de CMV résistant au CDV ont toutefois déjà été isolés (Jabs *et al*., 1998).

L'adéfovir (9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adénine (PMEA) est un analogue nucléotidique de l'adénine et fait également partie de la famille des ANP (Figure 5, p.60). De façon similaire au CDV, l'adéfovir (ADV) est phosphorylé par les kinases cellulaires et ne requiert pas d'activation par le produit d'un gène viral. Sous sa forme diphosphorylée, l'ADV inhibe de façon compétitive l'ADN pol virale et, contrairement au CDV, l'ADV est un terminateur de chaîne obligatoire (révisé dans (Naesens *et al*., 1997)). L'ADV est donc efficace contre des mutants VHS résistant à l'ACV dus à des mutations au sein de la TK (Andrei *et al*., 1995, Andrei *et al*., 1997, Bestman-Smith & Boivin, 2002), mais ne semble pas efficace contre des VHS et CMV résistant au FOS (Andrei *et al*., 1995, Andrei *et al*., 1997, Bestman-Smith & Boivin, 2002, Cihlar *et al*., 1998a, Foster *et al*., 1991). L'ADV ne possède pas d'activité contre les adénovirus, les poxvirus et les papillomavirus. Il inhibe cependant les virus herpès, le virus de l'hépatite B, et son activité antivirale contre certains rétrovirus dont le VIH est un avantage considérable pour le traitement des patients atteints du SIDA (Naesens *et al*., 1997) souvent co-infectés par d'autres virus. L'ADV dipivoxil est une prodrogue estérifiée de l'ADV avec une biodisponibilité de 32 à 45% suite à une

administration orale (Noble & Goa, 1999). La demi-vie intracellulaire relativement longue (5 à 17 h) de l'ADV (Aduma *et al*., 1995, Balzarini *et al*., 1991) permet l'administration d'une seule dose par jour. L'ADV dipivoxil vient tout récemment d'être approuvé pour le traitement des infections chroniques secondaires au virus de l'hépatite B (Kearny *et al*., 2001).

1.12.6 Nouvelles approches thérapeutiques

Avec l'augmentation constante du nombre des patients immunosupprimés et des infections herpétiques, l'émergence de la résistance aux antiviraux devrait demeurer un problème important. Puisque tous les antiviraux présentement disponibles pour le traitement des infections à VHS ont pour cible ultime l'ADN pol virale, l'identification de nouvelles molécules ayant d'autres cibles s'avère un domaine de recherche important.

1.12.6.1 Inhibiteurs de la ribonucléotide réductase

Le VHS code pour sa propre ribonucléotide réductase (RR) (UL39/UL40) nécessaire à la catalysation des nucléotides en déoxynucléotides. Les inhibiteurs de la RR virale en développement sont des peptidomimétiques de la partie C-terminale de la petite sous-unité R2 (UL40). Ces inhibiteurs préviennent la liaison de cette sous-unité à la grosse sous-unité (ICP6); combinaison essentielle à la fonction de l'enzyme (Duan *et al*., 1998). Une des molécules les plus prometteuse dans cette famille est le BILD1633SE (Duan *et al*., 1998) qui a démontré une efficacité dans l'inhibition de virus TK- et ADN pol-mutants. Les inhibiteurs de la RR du VHS semblent même potentialiser l'effet inhibiteur de l'ACV, probablement par la diminution du niveau de déoxyguanosine triphosphate, ce qui facilite ainsi la liaison de l'ACV à l'ADN pol. De façon similaire, les molécules qui ciblent et inhibent la RR cellulaire (i.e. l'hydroxyurée) potentialisent l'activité antivirale des analogues des nucléosides (Neyts & De Clercq, 1999). De plus, les virus résistants aux RR sont plus sensibles à l'ACV, sans doute dû à une diminution de la fonction de la RR (Bonneau *et al*., 1996). L'utilisation de l'ACV en combinaison aux inhibiteurs de la RR pourrait donc être astucieuse. Par contre, ces inhibiteurs ne sont pas très bien absorbés dans

la circulation systémique et semblent toxiques. Des formulations topiques sont cependant envisageables (Duan *et al*., 1998).

1.12.6.2 Inhibiteurs de l'hélicase virale

L'activité hélicase 5'-3' du VHS semble être effectuée par un complexe hétérodimérique de protéines comprenant une activité hélicase, primase, et ATPase. Cette activité est nécessaire au désenroulement du génome, essentiel à l'attachement de l'ADN et de l'ARN pol. Les molécules qui inhibent cette activité (amino thiazole) semblent à la fois peu toxiques et sont actives contre des VHS résistant à l'ACV (Kleymann *et al*., 2002, Spector *et al*., 1998b). De plus, ces inhibiteurs ont démontré une activité antivirale plus efficace que l'ACV dans des modèles animaux (Kleymann *et al*., 2002).

1.12.6.3 Inhibiteurs de protéases virale

Les protéases herpétiques appartiennent à une classe unique de protéases de type sérine qui diffèrent suffisamment des protéases humaines pour permettre le développement d'antiviraux très spécifiques. Des molécules peptidomimétiques similaires aux inhibiteurs de protéases de première génération utilisés contre le VIH, les benzoxazinones et les lactames, ont été considérées pour leur efficacité contre la réplication du VHS. Certains de ces antiviraux semblent prometteurs (révisé dans (Villarreal, 2001)).

1.12.6.4 Inhibiteurs de la glycosylase ADN-Uracil

La glycosylase ADN-Uracil (GAU) virale est impliquée dans la réparation de l'ADN en excisant les résidus uracils de l'ADN. Certaines évidences suggèrent que la GAU du VHS est requise pour la réactivation de la latence et la réplication du virus dans le système nerveux. Les molécules qui semblent les plus efficaces sont les 6-anilinouraciles et sont très spécifiques à la GAU du VHS-1 (Focher *et al*., 1993).

1.12.6.5 Immunomodulateurs

Une autre alternative intéressante au traitement antiviral est l'utilisation de modulateurs du système immunitaire en faveur de l'élimination de l'infection virale. Les immunomodulateurs ont déjà un rôle important en tant qu'adjuvants pour le développement de vaccins, mais également en tant que thérapie antivirale et ce, particulièrement chez les patients avec des désordres immunologiques ou infectés par des virus résistants aux antiviraux (Tomai *et al*., 1995). Le Resiquimod (R-848) fait partie de la famille des immunomodulateurs de type imidazoquinoline et est présentement en phase clinique III sous la formulation d'un gel topique pour le traitement de l'herpès génital (Yeung-Yue *et al*., 2002). Lorsque appliqué directement sur les lésions, le gel induit l'expression de cytokines telles que l'INF-α, le TNF-α, l'IL-6, et l'IL-12 (Ahonen *et al*., 1999, Spruance *et al*., 2001). En fait, la stimulation d'une réponse de type Th1 couplée à la présence d'antigènes du VHS, reproduit l'effet d'un vaccin thérapeutique (Spruance *et al*., 2001). Une étude pilote a démontré que le resiquimod peut réduire la fréquence des épisodes d'herpès génital chez les patients qui présentent des épisodes fréquents (Spruance *et al*., 2001).

1.13 La résistance du VHS aux antiviraux

Les antiviraux utilisés pour le traitement des infections herpétiques sont parmi les meilleurs exemples de thérapie antivirale efficace et sélective. Les premiers cas de résistance clinique du VHS à l'ACV ont malgré tout été rapportés durant l'année de son approbation en tant que traitement de première ligne aux USA (Crumpacker *et al*., 1982, Sibrack *et al*., 1982). Par contre, si on compare à d'autres virus tels que le VIH, l'hépatite B et l'influenza, la résistance clinique du VHS demeure considérablement rare. La résistance d'un virus à un agent antiviral peut être définie comme étant la perte de l'efficacité inhibitrice d'un antiviral envers le virus, caractérisée par un changement acquis de celui-ci et transmissible génétiquement. Cette modification est le résultat d'une ou de plusieurs mutations au sein du génome viral causant des changements dans une des cibles de l'antiviral ou de ses métabolites (Field, 2001). Cette définition comporte donc deux volets : Un volet

phénotypique (résistance du virus à l'antiviral) et un volet génotypique (changement dans le génome viral) que l'on doit distinguer. De plus, il est également important de considérer si ces changements entraînent des répercussions sur l'infection virale *in vivo*, i.e. s'ils induisent un échec au traitement clinique.

1.13.1 Résistance du VHS en clinique (incidence et manifestation)

La résistance du VHS en clinique peut se traduire par la persistance de lésions herpétiques malgré un traitement antiviral adéquat ou la dissémination cutanée ou viscérale de ces lésions. Plus précisément, l'infection résistante doit être soupçonnée lorsque les lésions herpétiques persistent pour une période de plus d'une semaine sans diminution appréciable de la largeur des lésions. Également, lorsque celles-ci sont d'apparence atypique, ou quand des lésions satellites se développent trois à quatre jours après l'instauration du traitement antiviral (Bacon *et al*., 2003). L'incidence de la résistance en clinique du VHS à l'ACV est difficile à déterminer et ce, pour plusieurs raisons. Premièrement, l'ACV est énormément prescrit pour le traitement du VHS et des formulations topiques sont disponibles en vente libre dans plusieurs pays. L'apparition temporelle de la résistance du VHS suite au traitement antiviral est donc d'autant plus difficile à déterminer. De plus, il est difficile de comparer les données obtenues entre les quelques études qui ont été effectuées puisqu'il n'y a pas encore de consensus en ce qui a trait à la définition de la résistance *in vitro* menant à un échec de traitement. Certains facteurs tels que la biodisponibilité, la pénétration de l'antiviral au site d'infection, la compliance du patient au traitement, son statut immunitaire, et l'interaction de l'ACV avec d'autres médicaments peuvent entraîner une diminution de l'efficacité du traitement sans pour autant que le virus soit résistant à l'antiviral (Rabella *et al*., 2002). L'inverse est également possible; un virus résistant *in vitro* à l'ACV n'amène pas nécessairement un échec au traitement antiviral (Nugier *et al*., 1992, Rabella *et al*., 2002). De plus, des techniques différentes peuvent être utilisées afin d'évaluer la sensibilité *in vitro* des virus et dépendant de celles-ci, les seuils de résistance sont différents. En effet, dépendant des études, ce seuil varie entre une CI_{50} de 1 à 4 µg/ml (Bacon *et al*., 2002, Boon *et al*., 2000, Christophers *et al*., 1998, Englund *et al*., 1990, Hill *et al*., 1991, Nugier *et al*., 1992, Safrin *et al*., 1994a). Finalement, les populations à l'étude

ne sont pas toujours homogènes (ex : type d'individus immunosupprimés). Déterminer avec certitude l'incidence de la résistance du VHS aux antiviraux en se fiant aux quelques données publiées est donc peu réaliste. Cependant, quelques conclusions importantes ont émergé de certaines études.

Chez les patients immunocompétents, il est clair que la résistance du VHS à l'ACV est peu fréquente. Les quelques études effectuées dans différentes populations démontrent un taux très faible d'apparition de virus résistants (0 à 0,6%) (Bacon *et al*., 2002, Boon *et al*., 2000, Christophers *et al*., 1998, Collins & Ellis, 1993, Englund *et al*., 1990, Honda *et al*., 2001, Mertz *et al*., 1988b, Sarisky *et al*., 2002b) et ce, indépendamment du fait que les patients soient traités ou non à l'ACV. De plus, cette incidence semble constante à travers le temps. Celle-ci refléterait la fréquence naturelle de la résistance due à des mutations aléatoires dans le gène de la TK. Finalement, mis à part deux cas (Kost *et al*., 1993, Swetter *et al*., 1998), l'isolement de VHS résistants chez les immunocompétents n'entraîne pas d'échec au traitement. De plus, la résistance a été démontrée comme étant transitoire (Whitley & Gnann, 1992).

D'un autre côté, la résistance du VHS chez les patients immunosupprimés est un problème bien reconnu. Les virus résistant à l'ACV sont beaucoup plus fréquemment isolés et sont associés à des infections persistantes. Les lésions peuvent même progresser, s'aggraver, et se disséminer pour causer des infections telles que des pneumonies, des œsophagites et des encéphalites. (Christophers *et al*., 1998, Englund *et al*., 1990, Erlich *et al*., 1989a, Erlich *et al*., 1989b, Kost *et al*., 1993, Levin *et al*., 2001, Safrin *et al*., 1994b, Swetter *et al*., 1998, Venard *et al*., 2001, Whitley, 2001). De façon générale, l'incidence de la résistance du VHS à l'ACV varie entre 3,8% à 14% parmi tous les groupes de patients immunosupprimés évalués (Christophers *et al*., 1998, Englund *et al*., 1990, Rabella *et al*., 2002). Plus précisément, les études de Christophers et de ses collaborateurs ont démontré que 6,5% des cancéreux, 10% des transplantés (cœur ou poumons) et 6% des patients atteints du SIDA sont infectés par des souches de VHS résistantes à l'ACV. De façon similaire, l'équipe de Englund et collaborateurs a rapporté une prévalence de 7% chez les patients atteints du SIDA et de 5 à 14% chez les transplantés (moelle osseuse ou organe solide). Une étude plus spécifique a évalué que 8% des patients transplantés avec des cellules souches

hématopoïétiques démontraient une infection persistante au VHS malgré un traitement à l'ACV, alors que pour 5% d'entre eux, des virus résistant à l'ACV ont été isolés (Chakrabarti *et al*., 2000). Tel que mentionné préalablement, nous ne possédons pas de données fiables sur la durée du traitement associée à l'émergence de la résistance, à l'exception de certains cas. Par exemple, chez des patients transplantés médullaires, une étude a révélé une incidence de la résistance de 7% qui apparaît en moyenne dans les 42 jours suivant le traitement prophylactique à l'ACV (Chen *et al*., 2000c). Plus récemment, un très haut niveau de résistance a été démontré chez cinq des sept patients séropositifs pour le VHS et transplantés avec des cellules hématopoïétiques progénitrices déplétées en lymphocytes T et B (Langston *et al*., 2002). Finalement, une apparition très rapide (7 jours (Levin *et al*., 2001) et 21 jours (Oram *et al*., 2000)) de la résistance à l'ACV a été observée chez des nouveau-nés traités avec cet antiviral. Dans certains cas, un traitement au FOS peut mener à la résolution complète ou partielle des infections résistantes (Erlich *et al*., 1989a, Pechere *et al*., 1998) et dans certaines études, un traitement au CDV a été tenté avec succès (Kopp *et al*., 2002, Lalezari *et al*., 1995, Lalezari *et al*., 1994, LoPresti *et al*., 1998, Snoeck *et al*., 1993, Snoeck *et al*., 1994).

L'incidence clinique de la résistance virale aux autres antiviraux (FOS, CDV) est peu connue puisque ces derniers constituent des traitements de seconde ligne. De plus, le CDV n'est pas encore approuvé pour le traitement des infections au VHS. Le FOS et le CDV sont très toxiques et de ce fait, peu utilisés. Quelques études démontrent cependant une absence de la résolution des infections herpétiques (déjà résistant à l'ACV) suite au traitement avec le FOS chez des individus immunosupprimés (transplantés, nouveau-nés, VIH-positifs) (Chakrabarti *et al*., 2000, Chen *et al*., 2000c, Langston *et al*., 2002, Safrin *et al*., 1994b, Segal *et al*., 1997). Une CI_{50} ≥100 µg/ml ou une augmentation de la CI_{50} de ≥3 fois par rapport à une souche sensible prélevée avant la thérapie ont été rapportées comme des critères de la résistance du VHS au FOS (Safrin *et al*., 1994a, Schmit & Boivin, 1999). Un retour au traitement à l'ACV suite à une certaine période d'arrêt thérapeutique a également démontré une certaine efficacité dans les cas d'échecs au FOS (Pechere *et al*., 1998, Safrin *et al*., 1994b). Cependant, une ré-émergence rapide de la résistance du VHS à l'ACV est à envisager due à la re-sélection de virus comprenant des mutations dans le gène

de la TK, préalablement sélectionnés par le traitement à l'ACV (Safrin *et al*., 1994b, Schmit & Boivin, 1999). De plus en plus d'études supportent l'efficacité du CDV pour le traitement des infections au VHS résistantes à l'ACV et/ou au FOS (Kopp *et al*., 2002, Lalezari *et al*., 1995, Lalezari *et al*., 1994, LoPresti *et al*., 1998, Snoeck *et al*., 1993, Snoeck *et al*., 1994). Toutefois, un échec à ce traitement alternatif a également été récemment rapporté (Chen *et al*., 2000c).

Quelques théories ont été émises afin d'expliquer l'incidence plus élevée de la résistance du VHS aux antiviraux chez les individus immunosupprimés. Premièrement, une réponse immunitaire inadéquate entraîne une réplication virale plus élevée et de façon continuelle, ce qui pourrait favoriser la sélection de virus mutants (variants). En effet, la sévérité de l'immunosuppression ainsi que l'utilisation prolongée de l'ACV sont considérées comme étant les deux facteurs principaux menant au développement de la résistance aux antiviraux. D'un autre côté, face à un système immunitaire déficient, des variants existant avant l'initiation de la thérapie antivirale pourraient se répliquer plus efficacement chez les individus immunosupprimés (Parris & Harrington, 1982). Cette dernière théorie peut être supportée par des études effectuées chez la souris qui ont clairement démontré que des VHS mutés dans certains gènes (TK, ICP0, RR, vhs, ICP 34.5) et sévèrement atténués dans leur capacité de réplication sont tout de même capables de se répliquer efficacement chez des souris dépourvues d'une réponse immunitaire efficace (Leib *et al*., 1999).

1.13.2 Résistance phénotypique

Plusieurs mécanismes viraux peuvent être à l'origine de la diminution de la susceptibilité du VHS à l'ACV : I) l'absence complète de l'expression du gène de la TK du VHS (TK-); II) une diminution de la production de la TK virale (TK-faible); III) l'expression d'une TK active encore capable de phosphoryler les nucléosides, mais dont l'affinité pour l'ACV a été modifiée (TK altérée), et finalement; IV) l'expression d'une ADN pol virale altérée incapable d'incorporer l'antiviral en tant que substrat. Le dernier mécanisme de résistance est le seul associé à la résistance du VHS au FOS et aux ANP révélé jusqu'à maintenant puisque ces antiviraux ne nécessitent pas d'étape d'activation préalable par la TK virale. En clinique, une modification dans l'expression du gène de la TK est le mécanisme de

résistance le plus fréquemment rencontré dans les souches de VHS résistantes à l'ACV, probablement dû au fait que la TK virale a un rôle moins critique que l'ADN pol dans la réplication virale (Roizman & Knipe, 2001). En effet, certaines études ont bien démontré que la TK n'est pas essentielle pour le cycle lytique du virus, mais qu'elle est par contre requise pour la multiplication du virus à un site secondaire et pour certaines étapes de la latence (Coen *et al*., 1989b, Efstathiou *et al*., 1989, Tenser *et al*., 1989, Wilcox *et al*., 1992). Certaines méthodes ont donc été mises au point afin de mesurer l'activité de la TK virale dans le but d'identifier les souches résistantes à l'ACV.

1.13.2.1 Méthodes phénotypiques d'évaluation de la résistance

L'expression de la TK virale peut être mise en évidence par l'incorporation sélective de [^{125}I]iododeoxycytidine (IdC), un analogue de l'ACV, et de la [^{14}C]thymidine qui est le substrat naturel (Martin *et al*., 1985) par des cellules permissives à l'infection. Cette technique permet également de faire la distinction entre les phénotypes d'expression de la TK virale. Les cellules infectées par des virus ayant une TK compétente (TK+) sont détectées par autoradiographie suite à un marquage avec l'un ou l'autre des deux isotopes durant la croissance virale. D'un autre côté, les cellules infectées par des virus résistants, exprimant une TK- ou faible n'incorporeront pas ou peu ces isotopes. Les virus TK-altérés vont mener au marquage des cellules au [^{14}C]thymidine, et non au ^{125}IdC. Cette technique permet également d'identifier une faible proportion (environ 10%) de virus résistants présents dans une population majoritairement sensible (Martin *et al*., 1985). Le groupe de Suzutani a développé un système rapide pour la caractérisation phénotypique des virus, par l'amplification et la traduction *in vitro* du gène de la TK du VHS (Suzutani *et al*., 2000). En comparant les poids moléculaires et l'activité enzymatique de la TK, il est possible de faire la distinction entre des virus exprimant une TK+ et donc sensibles à l'ACV et des virus exprimant une TK modifiée entraînant la résistance à l'ACV. Par contre, cette technique ne permet pas de différencier les virus TK-, TK-faibles et TK altérés. Un autre groupe (Sahli *et al*., 2000), a développé un système d'expression du gène de la TK du VZV pour identifier les souches résistantes à l'ACV et ce système pourrait probablement être utilisé pour la TK du VHS. Cette méthode consiste en l'expression du gène de la TK virale dans

des bactéries TK déficientes (tdk mutantes). L'activité enzymatique peut donc être directement évaluée par la réduction de la formation de colonies en présence d'un analogue des nucléosides, le 5-fluorodeoxyuridine (FudR). De façon similaire, un système d'expression hétérologue du gène de la TK du VHS dans le parasite *Leishmania*, a été mis au point dans notre laboratoire (Bestman-Smith *et al*., 2001) et constitue une des principales études présentées dans cette thèse de doctorat. Ce système permet d'évaluer la susceptibilité de la TK virale aux analogues des nucléosides et permet également l'identification des mutations associées à la résistance. La technique de même que les résultats de cette étude seront présentés au chapitre II de cette thèse (p.112). De tels systèmes permettant d'évaluer l'expression du gène de l'ADN pol du VHS n'ont pas encore été décrits jusqu'à maintenant.

La sensibilité des isolats cliniques de VHS aux différents antiviraux est très importante à déterminer puisque dans la plupart des cas, la résistance *in vitro* est associée à un échec au traitement (Safrin *et al*., 1994a). Plusieurs techniques ont donc été mises au point afin d'évaluer la sensibilité du VHS aux différents antiviraux. Cependant, les seuils de résistance peuvent différer, dépendant de la méthode utilisée (Sarisky *et al*., 2002a) (Tableau 6, p.81) et dans la plupart des cas, ces méthodes n'ont pas été standardisées. De plus, plusieurs facteurs intra-essais peuvent influencer le résultat final de la sensibilité de l'isolat à l'antiviral testé (Tableau 7, p.82).

1.13.2.2 Réduction des plaques

Malgré le fait qu'il existe plusieurs méthodes pour mesurer la sensibilité du VHS aux différents antiviraux, la méthode de réduction des plaques (MRP) demeure l'une des techniques les plus utilisées et est considérée comme étant la méthode de choix. C'est d'ailleurs cette méthode qui a été utilisée tout au long des travaux présentés dans cette thèse. Cette méthode consiste en l'infection de cellules Véro à confluence, cultivées dans des plaques de 24 puits, avec un inoculum viral standardisé (30 à 60 unités formatrices de plaques (UFP) par puits). Suite à une période d'incubation de 1 h 30 (adsorption virale), des concentrations sériées d'antiviral sont ajoutées (excepté pour les puits contrôles), et les cellules sont incubées pour une période de 48 à 96 h. Les cellules infectées sont alors

inactivées à la formaldéhyde et colorées au cristal violet de manière à pouvoir compter les UFP dans chacun des puits. Une courbe d'inhibition présentant le pourcentage d'inhibition de la croissance virale selon la concentration de l'antiviral est ensuite établie. Cette courbe permet de déterminer la CI_{50} du virus. Dans certains cas, la CI_{90} est également considérée. Selon la valeur obtenue et le seuil de résistance établi, l'isolat sera considéré comme étant sensible ou résistant à l'antiviral testé (Tableau 6, p.81).

1.13.2.3 Colorimétrique ("dye uptake assay")

Avec cette technique, l'activité antivirale est mesurée par la quantification de la protection de l'effet cytopathique engendré par l'infection virale. Le colorant utilisé pour cette méthode (rouge neutre) est seulement capté par les cellules viables (non-infectées). Il est alors possible de quantifier par spectrophotométrie et de comparer l'incorporation du rouge neutre par les cellules infectées et traitées avec un antiviral à celle des puits contrôles, et de déterminer la CI_{50}. Cette technique a l'avantage de pouvoir être effectuée dans des plaques de 96 puits, propice à l'automatisation. Malgré le fait que le seuil de résistance du VHS à l'ACV mesuré par cette méthode est plus élevé qu'avec la MRP, une bonne corrélation entre les phénotypes de sensibilité et de résistance à l'ACV a été démontrée avec ces deux méthodes (Collins & Ellis, 1993).

1.13.2.4 Cytofluorométrie

Cette méthode est basée sur la détection de l'expression de la gC du VHS-1 à la surface des cellules infectées suite à un cycle de réplication (18 h d'incubation). Cette méthode a donc l'avantage d'être rapide (24 h) et permet également de détecter un faible pourcentage de virus résistants parmi une population hétérogène (virus sensibles et résistants) (Pavic *et al.*, 1997).

1.13.2.5 Hybridation

Cette méthode consiste en la quantification de l'ADN viral produit suite à l'exposition des virus à un antiviral. L'isolat viral est inoculé dans une culture cellulaire avec des quantités

variables de l'antiviral. Suite à une période d'incubation (48 h à 72 h), les cellules sont lysées et absorbées sur des filtres qui sont ensuite hybridés avec des sondes radioactives comprenant des fragments spécifiques au génome du VHS-1 et -2. Cette méthode est commercialisée sous le nom de Hybriwix® (Diagnostic Hybrids Inc.)

1.13.2.6 ELVIRA®

Pour cette méthode, des cellules transformées de façon stable avec le gène LacZ de *Escherichia coli* sous le contrôle du promoteur du gène UL39 du VHS-1 (BHKICP6LacZ) sont utilisées. Les cellules infectées par le VHS expriment donc la β-galactosidase, et en présence d'un substrat chromogénique, il est possible de mesurer la densité optique du lysat cellulaire qui sera directement proportionnelle à l'importance de l'infection virale. Cette technique a l'avantage de pouvoir être effectuée dans des plaques de 96 puits. Un faible inoculum peut donc être utilisé et cette technique a été automatisée et est maintenant commercialisée (Diagnostic Hybrids) mais ce, en tant que méthode pour détecter la présence de VHS dans des échantillons cliniques (voir section 1.10, p.48). De plus, une corrélation presque parfaite avec la MRP pour la détection de virus résistant à l'ACV a été démontrée (Stranska *et al*., 2001b).

Tableau 6. Valeurs des seuils de résistance (CI_{50}) aux antiviraux selon la méthode utilisée.

	MRP	Colorimétrie	Hybridation	Cytofluorométrie	ELVIRA®
ACV	2 µg/ml	3 µg/ml	≥2 µg/ml	ND	≥0,95 µg/ml
FOS	100 µg/ml	ND	ND	ND	>80 µg/ml

(Collins & Ellis, 1993, Safrin *et al*., 1994a, Schmit & Boivin, 1999, Stranska *et al*., 2001a)
Note : ND : non déterminé.

Plusieurs variantes de ces méthodes ont également été développées, principalement pour augmenter la rapidité de ces techniques (Cotarelo *et al*., 1999, Tebas *et al*., 1998). Des contrôles adéquats tels qu'un isolat sensible pré-thérapie provenant du même patient ou si non disponible, une souche du même type bien caractérisée pour sa sensibilité et une autre

pour sa résistance à l'antiviral testé sont à inclure dans chacun des essais. Une augmentation significative (≥3 fois) de la CI_{50} par rapport aux souches contrôles sensibles ou pré-thérapie confirmera le phénotype de résistance de l'isolat à l'antiviral testé.

Tableau 7. Facteurs pouvant influencer les mesures de sensibilité du VHS à un antiviral.

Facteurs	Conséquences possibles
Cellulaires	– Différente activité des antiviraux dépendant des types cellulaires (pénétration, niveau endogène de thymidine kinase). – Différence de permissivité des cellules envers l'infection virale.
	– L'efficacité de l'antiviral peut dépendre de la phase de croissance cellulaire : latence, croissance exponentielle, plateau. – Le sérum peut interférer avec la technique de même que le niveau de thymidine.
Viraux	– Une multiplicité d'infection élevée (m.o.i.) peut être associée à une diminution de l'efficacité de l'antiviral. – La présence de virus sauvages peut masquer une sous-population virale résistante.

(modifié de (Field, 2001)).

1.13.3 Résistance génotypique

Les antiviraux présentement disponibles pour le traitement des infections herpétiques nécessitent ou non une activation par la TK virale et ont tous comme cible ultime l'ADN pol virale. Des modifications au sein du gène de la TK virale peuvent être à l'origine de la résistance du VHS aux analogues des nucléosides (ACV, PCV), alors que des changements moléculaires au niveau du gène de l'ADN pol sont associés à la résistance à tous les antiviraux présentement disponibles. Les quatre phénotypes menant à la résistance du VHS aux antiviraux (TK-, TK-faible, TK-altéré, et ADN pol altéré) (Tableau 8, p.88) ont été identifiés dans des souches de VHS cliniques. Des changements dans le gène de la TK demeurent le mécanisme de résistance le plus observé *in vivo* et *in vitro* et, dans

approximativement 95% des cas, la résistance du VHS aux analogues des nucléosides est due à des mutations au sein de ce gène (Christophers *et al*., 1998, Pottage & Kessler, 1995). Cependant, le gène de l'ADN pol de tous les virus résistant à l'ACV n'a pas toujours été séquencé.

1.13.3.1 Mutations dans le gène de la TK virale.

Le VHS code pour sa propre TK qui est le produit du gène précoce UL23. Le gène UL23 du VHS-1 est composé de 1128 nucléotides (souche KOS) et celui du VHS-2 (souche 333) de 1125 nucléotides, avec 81% d'homologie nucléotidique entre les deux types. La protéine TK résultante est composée de 377 aa chez le VHS-1 et de 376 aa chez le VHS-2 avec 68% d'homologie en aa entre les deux types (Kit, 1985, Swain & Galloway, 1983). La TK ne semble pas essentielle à la réplication virale en culture cellulaire (Earnshaw *et al*., 1992), mais est certainement impliquée dans la virulence et la réactivation du virus de son état de latence (Coen *et al*., 1989b, Jacobson *et al*., 1993, Tenser & Edris, 1987). Le rôle de la TK virale est de catalyser la phosphorylation des nucléosides de manière à former des nucléotides. Deux groupements phosphates sont ensuite ajoutés aux nucléotides par les kinases cellulaires et les nucléosides triphosphates sont incorporés dans l'ADN viral en cours de réplication (Kussmann-Gerber *et al*., 1998, Pilger *et al*., 1999). La TK virale diffère considérablement de la TK des cellules humaines par la grande variété de substrats qu'elle peut phosphoryler (Pilger *et al*., 1999). En effet, la TK du VHS possède une activité kinase normalement couverte par trois enzymes cellulaires distinctes. Elle phosphoryle la thymidine (dT), qui est alors transformée par les kinases cellulaires en thymidine triphosphate, et la deoxyuridine (dU). Ces deux réactions sont comparables à celles effectuées par la TK des cellules humaines. La TK du VHS convertit également la deoxycytidine (dC) en dCMP et phosphoryle le thymidylate (dTMP), alors que ces deux fonctions sont effectuées par les deoxycytidine (dCK) et TMP (TmpK) kinases humaines, respectivement (Pilger *et al*., 1999). De plus, contrairement à la TK des cellules, celle du VHS est capable de phosphoryler les analogues des purines (i.e. l'ACV). Cette différence dans la diversité de substrats constitue en fait la base moléculaire de la sélectivité du traitement antiviral (Keller *et al*., 1981). Ses propriétés ont également été mises à profit

dans le développement de traitements contre le cancer (Boviatsis *et al*., 1994, Huber *et al*., 1991, Takamiya *et al*., 1993) et le SIDA (Caruso *et al*., 1995), basés sur l'utilisation de la TK virale en tant que gène suicide.

Des mutations spontanées sont introduites dans le génome viral et sont le reflet du taux d'erreurs inhérent à l'ADN pol virale (Hall & Almy, 1982). Ces erreurs procurent un certain avantage aux virus, en leur conférant de la diversité génétique, ce qui facilite l'adaptation et l'évolution de l'organisme. Une étude évaluant l'évolution moléculaire du VHS-1 estime que l'évolution de ce virus est relativement lente avec un taux de mutations de 3,5 X 10^{-8} substitutions par site par année (Sakaoka *et al*., 1994). Dans une population de VHS dérivés en laboratoire ou obtenus d'un échantillon clinique, des virus résistant à l'ACV sont déjà présents avant même qu'il y ait eu exposition à l'antiviral. Il a été évalué que les mutations menant à la résistance aux antiviraux sont présentes dans approximativement 6 à 8 virus par 10^4 UFP et sont typiquement introduites dans le gène de la TK virale. Ces mutations mènent généralement au phénotype TK- (DasGupta & Summers, 1978, Hall *et al*., 1984). La fréquence des mutations spontanées serait plus importante dans des isolats cliniques de VHS-1 que de VHS-2 (Sarisky *et al*., 2000). L'équipe de Parris et ses collaborateurs ont même démontré que des mutants résistants à de fortes concentrations d'ACV (25 à 75 µM) sont présents dans une population virale passée en culture un nombre restreint de fois et ce, en l'absence d'ACV (Parris & Harrington, 1982).

Les additions et délétions de nucléotides dans les homopolymères de G et de C à l'intérieur de la TK sont à l'origine de la plupart des mutations rapportées dans les isolats de VHS résistant à l'ACV (Sasadeusz *et al*., 1997) (Figure 7, p.87). Deux études ont révélé qu'environ 50% des souches cliniques de VHS résistant à l'ACV comportent ce type de mutation, alors que l'autre moitié consiste en des substitutions d'aa dans des sites actifs ou non de l'enzyme (Gaudreau *et al*., 1998, Morfin *et al*., 2000a). En effet, les séries de G et de C sont assez fréquentes dans le gène de la TK du VHS et ce type de mutation entraîne un changement du cadre de lecture et l'apparition d'un codon d'arrêt en aval de la mutation. La production d'une protéine tronquée non fonctionnelle résulte de ce type de mutation et a été mise en évidence par des études d'immunoprécipitation et des analyses Western blot sur

des extraits de cellules infectées (Chatis & Crumpacker, 1991, Sasadeusz *et al*., 1997). Sasadeusz et ses collaborateurs ont également confirmé le rôle fonctionnel de ces mutations en restaurant l'activité TK suite à la réparation d'une mutation dans une série de G (Sasadeusz *et al*., 1997). Dans le cas du VZV qui code pour une TK similaire à celle du VHS, les mutations impliquées dans la résistance à l'ACV sont distribuées de façon plus hétérogène dans le gène de la TK. Par contre, la TK du VZV a un contenu en G et C moins riche que celle du VHS-1 et –2 (45% vs 65% et 69%, respectivement) et comprend moins d'homopolymères répétés de G et de C (11 vs 24 et 23, respectivement). Les mutations ponctuelles qui entraînent l'apparition d'un codon d'arrêt prématuré sont toutefois responsables de 50% des cas de résistance du VZV aux analogues des nucléosides rapportés jusqu'à maintenant (Boivin *et al*., 1994, Morfin *et al*., 1999, Saint-Leger *et al*., 2001).

Les séries d'homopolymères de nucléotides sont également le site commun de mutations dans d'autres organismes (Baumann *et al*., 1985, Streisinger & Owen, 1985, Wilson *et al*., 1986). En effet, les homopolymères de nucléotides sont plus susceptibles à l'introduction de mutations spontanées et ce, de façon proportionnelle au nombre de répétitions d'un même nucléotide. Ces séries de nucléotides permettent un mauvais alignement tout en conservant le bon appariement des bases (Streisinger & Owen, 1985). Il a également été proposé que l'ADN pol pourrait préférentiellement glisser ou "bégayer" dans ces régions. De plus, l'ACV pourrait même influencer l'ADN pol virale à sélectivement glisser dans ces répétions et entraîner un changement du cadre de lecture (Sasadeusz *et al*., 1997). Les homopolymères de nucléotides pourraient également servir au virus de mécanisme d'évasion durant la thérapie antivirale lui permettant ultérieurement de regagner sa pathogénicité par un mécanisme de changement de cadre de lecture traductionnel (Hwang *et al*., 1994) ou de réversion spontanée (Sasadeusz & Sacks, 1996). De façon différente, les mutations identifiées dans des souches de VHS sélectionnées avec le PCV consistent en majorité en des substitutions d'aa dans le gène de la TK (Sarisky *et al*., 2001). Ces résultats suggèrent donc que ces deux antiviraux interagissent de façon différente soit avec la TK et/ou l'ADN pol virale. D'un autre côté, malgré le fait que les deux antiviraux (ACV et PCV) sélectionnent différents types de mutations dans le gène de la TK, celles-ci entraînent

tout de même la résistance croisée à ces deux analogues de nucléosides (Sarisky *et al*., 2001).

Les substitutions de nucléotides qui entraînent un changement d'aa dans le gène de la TK virale sont également à l'origine de la résistance du VHS à l'ACV. Darby et ses collègues ont proposé trois sites actifs pour la TK du VHS-1 : I) le site de liaison de l'ATP (aa 51 à 63); II) le site de liaison des nucléosides (aa 168 à 176) et III) le codon 336 qui semble jouer un rôle important dans le maintien de la structure tridimensionnelle du site de liaison de l'ATP (Darby *et al*., 1986) (Figure 7, p.87). De plus, des études de mutagenèse dirigée et des analyses structurales poussées ont permis de confirmer l'importance des aa aux postions 63, 125, 168, 176 et 336 de la TK virale (Kussmann-Gerber *et al*., 1998). La thréonine à la position 63 permet la liaison du Mg^{2+}, et est donc essentielle à l'activité catalytique de l'enzyme. L'alanine au codon 168 limite l'accessibilité stérique des substrats alors que l'arginine en position 176 semble importante au maintien de l'équilibre électrostatique du site actif. Finalement, la glutamine en position 125, située hors des sites actifs de l'enzyme, est essentielle à la liaison de la thymidine et de l'ACV. De plus, le groupe de Balasubramaniam et ses collaborateurs ont comparé les séquences des gènes TK chez douze virus animaux et humains de la famille des *Herpesviridae* ce qui a mené à l'identification de six régions conservées (Figure 7, p.87) (Balasubramaniam *et al*., 1990). Des mutations dans l'une ou l'autre de ces régions pourraient donc être susceptibles d'entraîner des changements fonctionnels dans la TK virale et la résistance du VHS aux analogues des nucléosides.

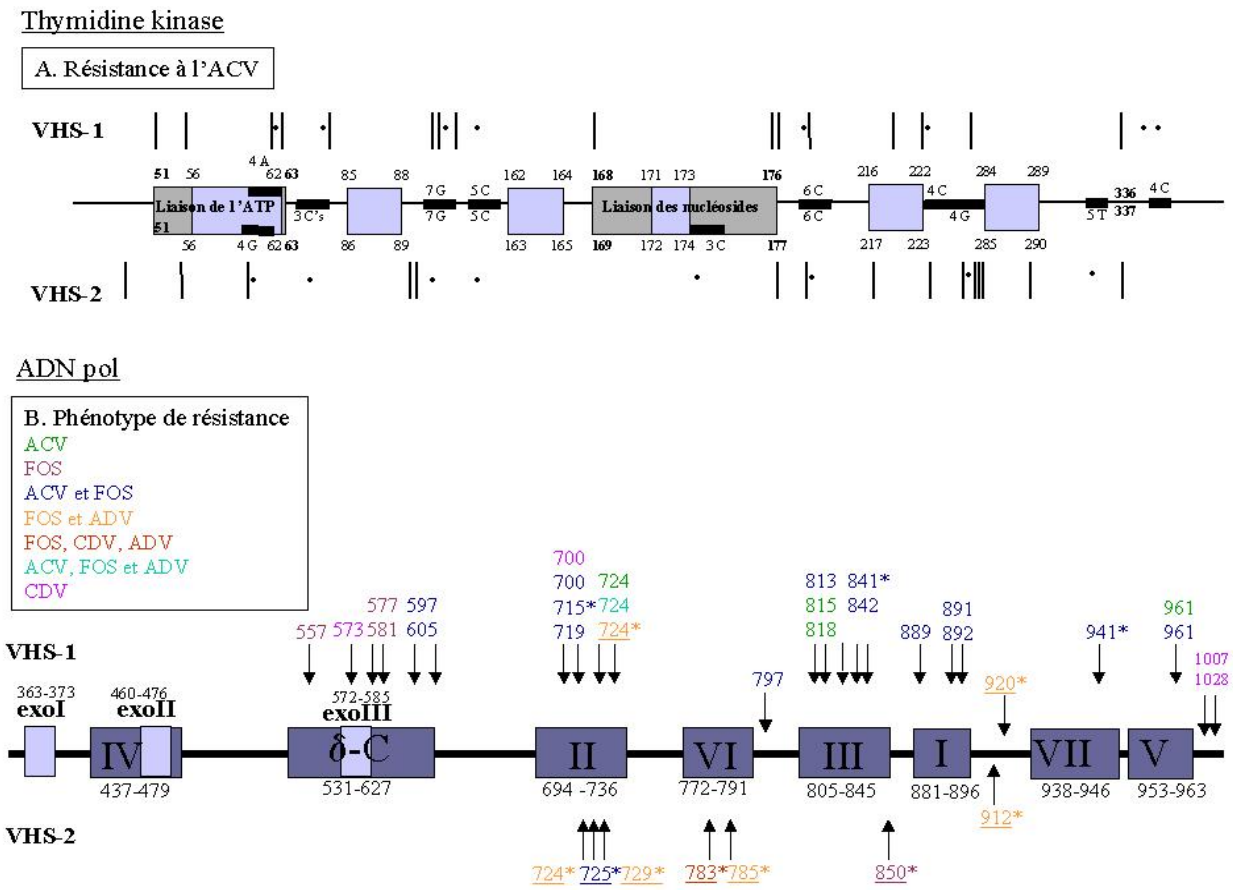

Figure 7. Représentation schématique du gène de la TK et de l'ADN pol des VHS-1 et –2 ainsi que des mutations associées à la résistance aux différents antiviraux.

A) Les sites actifs (Darby *et al*., 1986) et les régions conservées (Balasubramaniam *et al*., 1990) sont représentés par les boîtes grises et bleues, respectivement. Les numéros au dessus et en-dessous des boîtes indiquent la position (numéro des codons) de ces régions. Les barres (|) indiquent les substitutions en acide aminé, alors que les points (•) indiquent les additions et les délétions de nucléotides. B) La position en acide aminé des régions conservées du gène de l'ADN pol du VHS-1 ainsi que les motifs exo sont indiqués. Les mutations identifiées dans des isolats cliniques sont marquées par un astérisque (*) et celles identifiées par notre groupe de recherche sont soulignées. Il est à noter que ces mutants n'ont pas nécessairement été testés pour leur sensibilité à tous les antiviraux indiqués. (modifiée de (Gilbert *et al*., 2002)).

En effet, des mutations localisées dans chacun des sites actifs décrits plus haut et dans certaines régions conservées du gène de la TK virale ont été identifiées dans des isolats de VHS dérivés en laboratoire ainsi que dans des souches cliniques résistantes à l'ACV (révisé dans (Gilbert *et al*., 2002)). Ces mutations ont été associées à la production d'une TK-,

faible ou altérée. Dans certains cas, des substitutions d'aa ont été identifiées hors des régions conservées ou des sites actifs du gène, ce qui rend difficile la détermination du rôle de ces mutations dans la résistance à l'ACV (Bestman-Smith *et al*., 2001, Bodaghi *et al*., 2000, Chatis & Crumpacker, 1991, Gaudreau *et al*., 1998, Hwang & Chen, 1995, Kit *et al*., 1987, Morfin *et al*., 2000a, Sarisky *et al*., 2001, Sasadeusz *et al*., 1997, Tanaka *et al*., 1993). Le gène de la TK comprend un certain degré de polymorphisme génétique (environ 4% de changements de position en nucléotides) (Bestman-Smith *et al*., 2001, Kudo *et al*., 1998, Lee *et al*., 1999, Morfin *et al*., 2000a, Venard *et al*., 2001) et la discrimination entre une mutation impliquée dans la résistance d'une autre, uniquement impliquée dans le polymorphisme génétique peut être difficile à faire en l'absence de souches isolées en pré-thérapie. Le développement de nouvelles méthodes permettant d'évaluer le rôle des mutations impliquées dans la résistance du VHS aux antiviraux est donc essentiel.

Tableau 8. Sommaire des phénotypes et génotypes qui entraînent la résistance du VHS à l'ACV.

Phénotype de résistance	**Mécanisme moléculaire**	**Modification génétique résultante**
TK déficiente (TK-)	Substitution de nucléotide(s).	Substitution d'aa ou apparition d'un codon d'arrêt prématuré.
	Addition ou délétion de nucléotide(s).	Changement du cadre de lecture et, généralement, apparition d'un codon d'arrêt prématuré.
TK faible	Substitution de nucléotide(s).	Substitution d'aa ou apparition d'un codon d'arrêt prématuré.
	Addition et délétion de nucléotide(s).	Changement du cadre de lecture et, généralement, apparition d'un codon d'arrêt prématuré.
TK altérée	Substitution de nucléotide(s).	Substitution d'aa.
ADN pol altérée	Substitution de nucléotide(s).	Substitution d'aa.

1.13.3.1.1 Détermination du rôle des mutations dans le gène de la TK virale

La caractérisation rapide des mutants résistants directement obtenus de fluides biologiques nécessite une bonne connaissance des mutations associées à la résistance et celles reliées au polymorphisme génétique du gène de la TK virale. Tel que discuté précédemment, les délétions et les additions de nucléotides dans les homopolymères amenant un changement du cadre de lecture peuvent facilement être tenues responsables de la résistance aux analogues des nucléosides. Le rôle d'une mutation dans la résistance aux antiviraux peut également être facilement déduit lorsqu'elle est présente dans une souche résistante et non dans un isolat sensible prélevé chez le même patient avant le début du traitement antiviral. Par contre, plus d'une mutation dans le gène de la TK et des mutations dans deux gènes différents (TK et ADN pol) (Sarisky *et al*., 2001, Sasadeusz *et al*., 1997, Schmit & Boivin, 1999) peuvent être identifiées et il devient alors difficile de confirmer l'implication de chacune de ces mutations dans la résistance à l'ACV. Il est possible de présumer que les mutations identifiées dans les régions catalytiques et conservées du gène de la TK puissent être à l'origine du phénotype de résistance observé bien qu'une mutation dans une région conservée puisse être également associée au polymorphisme génétique (Bestman-Smith *et al*., 2001).

Pour l'instant, le transfert d'un gène muté (contenant une seule mutation) dans une souche sauvage sensible à l'ACV par recombinaison homologue est l'une des seules méthodes disponibles afin de confirmer le rôle d'une mutation identifiée au sein du gène de la TK virale. En plus d'être longue et fastidieuse, cette technique comporte plusieurs désavantages. La recombinaison homologue est un phénomène assez rare chez les virus herpétiques et les virus ayant incorporé la mutation désirée doivent être sélectionnées par un antiviral. Cette pression sélective risque en fait de générer d'autres mutations non présentes *in vivo*, ce qui limite l'interprétation des résultats obtenus. Le développement de nouvelles méthodes permettant d'identifier plus précisément les mutations responsables de la résistance aux analogues des nucléosides est donc d'un grand intérêt. Récemment, des systèmes d'expression du gène de la TK dans des cellules (Kim *et al*., 2002) et des bactéries (Sahli *et al*., 2000) ont été mis au point et faciliteront probablement la caractérisation des mutations au sein de ce gène. Tel que mentionné préalablement, un

système hétérologue d'expression du gène de la TK du VHS dans le parasite *Leishmania*, normalement dépourvu d'activité TK endogène, a également été mis au point dans notre laboratoire. Cette nouvelle méthode permet d'associer efficacement le rôle d'une mutation à la résistance aux analogues des nucléosides ou au polymorphisme génétique et elle est le sujet d'un article publié récemment (Bestman-Smith *et al*., 2001) qui sera présenté au chapitre II de cette thèse (p. 112).

1.13.3.2 Mutations dans le gène de l'ADN polymérase virale.

L'ADN pol du VHS est la cible ultime de tous les antiviraux présentement disponibles pour le traitement du VHS. Une seule mutation au sein de ce gène pourrait donc possiblement entraîner la résistance du VHS à tous ces antiviraux. Par contre, l'ADN pol du VHS fait partie d'un complexe de sept protéines virales essentielles à la réplication, et il est possible que seulement un nombre limité de mutations puisse entraîner la résistance tout en maintenant une activité enzymatique fonctionnelle nécessaire à la réplication de l'ADN viral. La caractérisation du gène de l'ADN pol du VHS est donc d'un très grand intérêt et va permettre d'identifier les régions associées à la reconnaissance des antiviraux et celles impliquées dans le mécanisme de réplication du virus.

Il a été démontré assez rapidement que des extraits cellulaires infectés avec le VHS comprenaient une activité polymérase distincte de celle des cellules. L'activité catalytique de l'ADN pol du VHS a été mesurée par expression *in vitro* (Dorsky & Crumpacker, 1988), dans des levures (Haffey *et al*., 1988) et dans des cellules d'insectes en utilisant des baculovirus et l'incorporation de nucléotides marqués par l'ADN pol virale (Marcy *et al*., 1990b). Il est maintenant bien connu que l'ADN pol du VHS-1 et –2 est codée par le gène UL30 qui comprend un cadre de lecture de 3705 nucléotides (1235 aa) dans le cas du VHS-1 et de 3720 nucléotides (1240 aa) pour le VHS-2. L'homologie entre l'ADN pol des deux types de virus est d'environ 90% au niveau nucléotidique et de 95% en aa (Tsurumi *et al*., 1987). L'ADN pol du VHS comprend également une activité exonucléase 3'-5' intrinsèque (Bernad *et al*., 1989, Blanco *et al*., 1992, Gibbs *et al*., 1991, Marcy *et al*., 1990b) et semblerait également posséder une 5'-3' RNAse H (Crute & Lehman, 1989, Marcy *et al*., 1990b).

L'ADN pol du VHS est classée dans la famille des ADN pol de type α ou B selon la nomenclature utilisée. Cette famille comprend les ADN pol de procaryotes (ADN pol II de *E.coli*), de phages, d'archae, d'eucaryotes, de virus et de plasmides linéaires eucaryotiques. Des études d'alignement de séquences de différentes ADN pol ont mené à l'identification de huit régions conservées désignées I à VII et δ-région C présentes chez les virus herpétiques (Blanco *et al*., 1991, Hwang *et al*., 1992, Zhang *et al*., 1991) (Figure 7, p.87). Six de ces régions (I-VI) sont également partagées parmi la plupart des ADN pol de la famille α ou B (Braithwaite & Ito, 1993, Wang *et al*., 1989, Wong *et al*., 1988) dont les ADN pol cellulaires α, δ, ε, et ξ. Par contre, la δ-région C est retrouvée seulement chez certains membres de la famille, par exemple l'ADN pol cellulaire δ (Zhang *et al*., 1991). Il est donc présumable que ces régions fassent partie de l'activité catalytique de l'enzyme. L'obtention de la structure cristallisée de l'ADN pol du bactériophage T4 RB69 a permis de déduire en partie la structure de plusieurs autres ADN pol de de la famille α, dont celle du VHS (Franklin *et al*., 2001, Huang *et al*., 1999, Wang *et al*., 1997). Sa structure primaire a été comparée à celle d'une main. Les régions conservées I et II font partie de la paume et contiennent les acides aspartiques aux positions 717, 886, et 888 essentiels à l'activité polymérase de l'enzyme. Les régions III et VI sont à la base des doigts et les régions V et VII à la base du pouce. Ces régions semblent flanquer les sites catalytiques des domaines de la paume et joueraient un rôle dans le positionnement des matrices et des amorces. La région IV et la δ-région C font partie de la fonction 3'-5' exonucléase de l'enzyme. Le domaine 3'-5' exonucléase de toutes les ADN pol, sauf celles d'eukaryotes et de prokaryotes, peut être aligné en trois motifs hautement conservés désignés exoI, II, et III (Blanco *et al*., 1992, Morrison *et al*., 1991). Tel que représenté à la Figure 7 (p.87), les motifs exoII et III font partie des régions conservées IV et δ-région C, respectivement, alors que le motif exoI est situé dans la partie N-terminale des régions conservées du gène, hors de celles-ci. Alors que la δ-région C comprend les résidus catalytiques conservés Tyr577 et Asp581, la région IV jouerait plutôt un rôle structural (Andrei *et al*., 2000, Wang *et al*., 1997). Des mutations au sein des régions conservées du gène de l'ADN pol du VHS ont été identifiées dans des isolats résistants aux antiviraux sélectionnés en laboratoire et chez des individus traités avec des médicaments anti-herpétiques. Les mutations rapportées dans le

gène de l'ADN pol du VHS jusqu'à maintenant ainsi que leur profil de sensibilité aux différents antiviraux sont présentés de façon détaillée au Tableau 9 (p.93) et sont représentées schématiquement dans la Figure 7 (p.87). Une discussion détaillée sur ce sujet a également été publiée sous la forme d'un article de revue par notre groupe de recherche et est intitulé "*Resistance of herpesviruses to antiviral drugs : clinical impacts and molecular mechanisms*" (Gilbert *et al*., 2002). Cet article est présenté à l'annexe I de cette thèse (p.241). Un bref survol de l'ensemble des mutations identifiées au sein du gène de l'ADN pol du VHS et impliquées dans la résistance aux antiviraux sera donc présenté dans les prochains paragraphes de cette section.

Tableau 9. Mutations rapportées dans le gène de l'ADN pol du VHS associées à un phénotype de résistance aux antiviraux.

VHS	Région conservée	Mutation	Phénotype				Dérivé en laboratoire	Isolat clinique	Confirmé par transfert de mutation	Références	Commentaires
		acide aminé	ACV	PPA	CDV	ADV					
VHS-1	δ-C	Y557S		R			X		X	(Kuhn & Knopf, 1996)	Atténuation de l'activité exonucléase
VHS-1	δ-C (exoIII)	V573M	S	S/HS	R	S	X			(Andrei *et al*., 2000)	Diminution de la neurovirulence
VHS-1	δ-C (exoIII)	Y577H	HS	R			X		X	(Hwang *et al*., 1997, Hwang *et al*., 1998)	Atténuation de l'activité exonucléase, réplication *in vitro* diminuée
VHS-1	δ-C (exoIII)	D581A	HS	R			X		X	(Hwang *et al*., 1998)	Atténuation de l'activité exonucléase
VHS-1	δ-C	E597K, D	R	B			X		X	(Gibbs *et al*., 1988, Larder *et al*., 1987)	Possibilité de mutation additionnelle (E597K)
VHS-1	δ-C	A605V	R	R			X		X	(Gibbs *et al*., 1988, Larder *et al*., 1987)	
VHS-1	II	R700M	S	S/HS	R	S	X			(Andrei *et al*., 2000)	Diminution de la neurovirulence
VHS-1	II	R700G	R	R			X		X	(Gibbs *et al*., 1988)	
VHS-1	II	V715G	R	R				X		(Saijo *et al*., 2002)	
VHS-1	II	A719V	R	R			X		X	(Knopf, 1987, Larder *et al*., 1987)	
VHS-2	II	S725G	R	R				X		(Chibo *et al*., 2002)	Présence d'une délétion de 969 pb dans la TK
VHS-2	II	A724T	S	R	S	R		X		(Bestman-Smith & Boivin, 2002, Schmit & Boivin, 1999)	

VHS-1	II	S724N	S/R	R	S	R	X	X	X	(Andrei *et al*., 2000, Bestman-Smith & Boivin, 2002, Gibbs *et al*., 1988, Larder *et al*., 1987, Schmit & Boivin, 1999)	
VHS-1	II	S724N, D, Q, E, A, K, T, H	R	HS			X		X	(Matthews *et al*., 1993)	
VHS-2	II	S729N	B	R	S	B		X		(Bestman-Smith & Boivin, 2002, Schmit & Boivin, 1999)	
VHS-2	VI	L783M	S	R	R	R		X		(Bestman-Smith & Boivin, 2002, Schmit & Boivin, 1999)	
VHS-2	VI	D785N	S	R	S	B		X		(Bestman-Smith & Boivin, 2002, Schmit & Boivin, 1999)	
VHS-1	Entre VI-III	P797T	R	R			X		X	(Gibbs *et al*., 1988)	
VHS-1	III	V813M	R	R			X		X	(Gibbs *et al*., 1988)	
VHS-1	III	N815S,T	R	S/HS			X		X	(Larder *et al*., 1987, Matthews *et al*., 1993)	
VHS-1	III	N815Q	R	S			X		X	(Larder *et al*., 1987, Matthews *et al*., 1993)	
VHS-1	III	N815L, V, Y, E	S	HS			X		X	(Larder *et al*., 1987, Matthews *et al*., 1993)	
VHS-1	III	Y818C		R			X		X	(Hall *et al*., 1989)	
VHS-1	III	G841S	R	B			X		X	(Collins *et al*., 1989, Larder *et al*., 1987)	
VHS-1	III	G841C	R	R			X		X	(Chiou *et al*., 1995)	Résistance au PCV
VHS-1	III	R842S	R	R			X		X	(Field & Coen, 1986, Gibbs *et al*., 1988, Pelosi *et al*., 1998b)	Diminution de la neurovirulence

VHS-2	III	L850I	S	R	S	S		X		(Bestman-Smith & Boivin, 2002, Schmit & Boivin, 1999)	
VHS-1	I	S889A	R	R			X		X	(Dorsky & Plourde, 1993)	
VHS-1	I	F891C	R	R			X		X	(Marcy *et al*., 1990a)	
VHS-1	I	F891Y	B	B			X		X	(Marcy *et al*., 1990a)	
VHS-1	I	V892M	B	B			X		X	(Marcy *et al*., 1990a)	
VHS-2	Entre I-VII	D912V	R	R	S	R		X		(Bestman-Smith & Boivin, 2002, Schmit & Boivin, 1999)	
VHS-1	Entre I-VII	P920S	S	R	B	R		X		(Bestman-Smith & Boivin, 2002, Schmit & Boivin, 1999)	Présence de la mutation S724N
VHS-1	VII	Y941H	R	R			X		X	(Hwang *et al*., 1992, Pelosi *et al*., 1998b)	Diminution de la réplication dans le cerveau des souris et diminution de la neurovirulence
VHS-1	V	N961K	R	R/S			X		X	(Gibbs *et al*., 1988)	Possibilité de mutations additionnelles. HS au PCV (Chiou *et al*., 1995)
VHS-1	Après V	L1007M	S	S	R	S	X			(Andrei *et al*., 2000)	
VHS-1	Après V	I1028T	S	S	R	S	X			(Andrei *et al*., 2000)	Diminution de la neurovirulence

Note: Les régions conservées sont présentées à la Figure 7, p.87. Les substitutions en acide aminé sont présentées selon le code à une lettre. ACV; acyclovir, PPA; analogues des pyrophosphates, CDV; cidofovir, ADV; adéfovir. HS; hypersensible, S; sensible, R; résistant, B; valeur "borderline" de résistance.
(Modifié de (Gilbert *et al*., 2002)).

1.13.3.2.1 Mutants sélectionnés *in vitro*

La mise en évidence du rôle des régions conservées du gène de l'ADN pol du VHS dans la reconnaissance des antiviraux a tout d'abord été faite en laboratoire par la génération de virus résistants. La méthode la plus utilisée et la plus simple jusqu'à maintenant afin de générer des virus mutants résistants consiste à passer le VHS dans des cellules en présence de concentrations croissantes d'antiviral. Le gène de l'ADN pol est ensuite séquencé à la recherche des mutations. Les mutations sélectionnées par cette méthode ont pour la plupart été identifiées dans les régions conservées δ-C, II et III (Andrei *et al*., 2000, Gibbs *et al*., 1988, Knopf & Weisshart, 1988, Larder & Darby, 1985, Larder & Darby, 1986, Larder *et al*., 1987) (voir Tableau 9, p.93). Les régions II et III, situées dans la partie centrale des régions conservées du gène, comprennent la majorité de ces mutations et sont généralement associées à la résistance à l'ACV et aux analogues des ppi. Les quelques mutations identifiées dans la région δ-C ont été associées à la résistance aux analogues des ppi (Gibbs *et al*., 1988, Hwang *et al*., 1998, Kuhn & Knopf, 1996). Par contre, chez le CMV, une sensibilité aux analogues des ppi est conférée par des mutations dans cette région de l'ADN pol (Cihlar *et al*., 1998a, Cihlar *et al*., 1998b, Eckle *et al*., 2000, Erice *et al*., 1997, Jabs *et al*., 2001, Smith *et al*., 1997a). Une description détaillée de certaines mutations identifiées dans les régions conservées du gène de l'ADN pol du VHS sera exposée dans les prochains paragraphes, alors qu'une liste plus exhaustive de ces mutations est présentée au Tableau 9 (p.93).

1.13.3.2.1.1 Mutations dans la région conservée II

Le changement d'une sérine pour une aspargine à la position 724 dans la région conservée II de l'ADN pol du VHS-1 est la mutation la plus fréquemment rapportée dans des virus mutants dérivés en laboratoire (Andrei *et al*., 2000, Gibbs *et al*., 1988, Larder *et al*., 1987). Cette position est conservée parmi tous les ADN pol des virus herpétiques ainsi que dans d'autres ADN pol qui partagent cette région conservée (ex : ADN pol humaine δ, α, T4, pol II d'*E.coli*). La mutation S724N a été associée dans presque tous les cas à la résistance à l'ACV et aux analogues des ppi. Cette mutation a également été sélectionnée en présence de dérivés PME (PME-adénine (adéfovir) et PME-2,6-diaminopurine) et associée à la

résistance à ces mêmes agents ainsi qu'aux analogues des ppi et à l'ACV (Andrei *et al*., 2000). Le groupe de Matthews a démontré, à l'aide d'études de mutagenèse dirigée et d'expression du gène dans des levures, qu'une variété d'aa (N, D, Q, E, A, K, T, H) pouvaient être tolérés à cette position (Matthews *et al*., 1993). D'un autre côté, contrairement à ce qui avait préalablement été rapporté, les changements d'aa à cette position ont été associés à la résistance à l'ACV, mais à une sensibilité aux analogues des ppi lorsqu'évalués par cette méthode. Cette divergence dans les résultats de sensibilité peut être due à plusieurs facteurs. L'utilisation de différentes souches parentales de VHS pour générer les mutants peut entraîner des variances dans les niveaux de sensibilité aux antiviraux. De plus, la présence d'autres mutations dans des régions non séquencées du gène de l'ADN pol pourrait contribuer aux différents phénotypes de résistance obtenus. En effet, la méthode de génération de virus résistants en culture cellulaire comporte plusieurs désavantages et il est possible que des mutations situées dans d'autres gènes (TK par exemple), soient présentes et puissent contribuer au phénotype observé. Il devient donc important de confirmer le rôle des mutations identifiées en transfectant le gène muté dans une souche virale sensible, et suite à la recombinaison homologue, vérifier la résistance de cette souche recombinante.

Différents changements en aa survenant à la même position peuvent également entraîner des phénotypes distincts (Matthews *et al*., 1993). Par exemple, le changement arginine pour glycine à la position 700 du VHS-1 confère une résistance croisée à l'ACV et aux analogues des ppi (Gibbs *et al*., 1988), alors qu'une méthionine à cette même position est uniquement associée à la résistance au CDV (Andrei *et al*., 2000). De même, des mutations au sein d'aa adjacents peuvent entraîner des phénotypes de résistance tout à fait différents. Par exemple, la mutation Y696H située dans la région conservée II a été associée à un phénotype de sensibilité et d'hypersensibilité à l'ACV et aux analogues des ppi, respectivement (Hall *et al*., 1989, Matthews *et al*., 1993, Tsurumi *et al*., 1987). Trois isolats de VZV résistant au FOS (un analogue des ppi) sélectionnés en laboratoire comportant des mutations aux positions 665, 666 et 692 dans la région conservée II du gène de l'ADN pol du VZV ont également été rapportés (Visse *et al*., 1999). La sensibilité de ces mutants à l'ACV n'a cependant pas été déterminée.

1.13.3.2.1.2 Mutations dans la région conservée III

Plusieurs mutations ont également pu être sélectionnées dans la région conservée III et ont généralement été associées à un phénotype de résistance croisée à l'ACV et aux analogues des ppi. Cependant, certaines mutations ont été associées à des phénotypes différents (ex : résistance à l'ACV et sensibilité aux ppi, sensibilité à l'ACV et résistance aux ppi, et sensibilité et hypersensibilité à l'ACV et aux ppi, respectivement). Plusieurs changements en aa ont été évalués à la position 815, et de façon intéressante, ceux-ci ont été associés à la sensibilité voire même à l'hypersensibilité aux analogues des ppi (Larder *et al*., 1987, Matthews *et al*., 1989, Matthews *et al*., 1993). Une mutation (N779S) rapportée chez le VZV et correspondante à cette position chez le VHS (815) a également été associée à un phénotype de sensibilité au FOS (Kamiyama *et al*., 2001). De plus, certains aa à cette même position chez le VHS (leucine, valine, tyrosine, acide glutamique) confèrent un phénotype de sensibilité au FOS de même qu'à l'ACV (Matthews *et al*., 1993). De façon similaire, plusieurs mutations identifiées dans la région conservée III du gène de l'ADN pol du CMV sont associées à des niveaux de sensibilité variés (résistance/hypersensibilité) aux différents antiviraux (Cihlar *et al*., 1998a).

1.13.3.2.1.3 Mutations dans les régions conservées IV à VII

Seulement une mutation a été rapportée dans la région conservée V (N961K) du VHS-1 et aucune n'a été décrite dans les régions conservées IV, VI, et VII d'isolats sélectionnés en laboratoire. La mutation N961K a été associée à un phénotype de résistance à l'ACV et de sensibilité ou de résistance aux analogues des ppi (Gibbs *et al*., 1988). La présence d'autres mutations pouvant contribuer au phénotype de résistance rapporté n'a cependant pu être infirmé. De façon surprenante, Chiou et ses collaborateurs ont rapporté un phénotype d'hypersensibilité au PCV associé à cette mutation, suggérant que ces deux analogues des nucléosides (ACV et PCV) pourraient avoir des sites de liaisons distincts sur l'ADN pol du VHS (Chiou *et al*., 1995). Dans le cas du CMV, des mutations dans la région IV ont été associées à la résistance croisée au GCV et au CDV (Cherrington *et al*., 1998, Cihlar *et al*., 1998a).

1.13.3.2.1.4 Mutations dans la région conservée I

De façon intéressante, aucune mutation n'a pu être générée en culture cellulaire dans la région conservée I du VHS. Cette région est la plus conservée et comporte une séquence 884-YDGTDS-889 pratiquement invariable parmi tous les ADN pol de type α. Des études de mutagenèse dirigée et d'expression *in vitro* (Bernad *et al*., 1990, Dorsky & Crumpacker, 1990) et la génération de virus recombinants mutants (Marcy *et al*., 1990a) ont donc été nécessaires afin de caractériser cette région qui semblait critique pour l'activité fonctionnelle de l'enzyme. Des substitutions d'aa aux positions 885, 886, 887, 888, ont substantiellement aboli l'activité catalytique de l'ADN pol tel que démontré dans des models d'expression *in vitro* (Bernad *et al*., 1990, Dorsky & Crumpacker, 1990) alors que des mutations aux positions 884, et 889 ne semblaient pas supprimer cette activité (Bernad *et al*., 1990, Dorsky & Crumpacker, 1990, Dorsky & Plourde, 1993). De plus, des virus recombinants comprenant la mutation G885A dans l'ADN pol n'ont pas pu être isolés par transfection du gène mutant et recombinaison avec un virus sauvage (Marcy *et al*., 1990a). Les virus recombinants générés par transfection et comportant la mutation 889 ont démontré de hauts niveaux de résistance à l'ACV et aux analogues des ppi. D'autres mutations (G881R, F891C/Y, Y892M), hors du motif YDGTDS, ont également pu être générées et intégrées efficacement dans des virus recombinants. La mutation G881R n'est pas impliquée dans la résistance aux antiviraux, alors que les changements en aa aux positions 891 et 892 sont associés à des niveaux variables de résistance à l'ACV et aux analogues des ppi (Marcy *et al*., 1990a).

1.13.3.2.1.5 Mutations dans les motifs exo (région IV et δ-région C)

Un des mécanismes principaux pour prévenir l'incorporation de mutations durant la réplication de l'ADN réside dans l'activité 3'-5' exonucléase associée à l'ADN pol. Cette activité est reliée à 3 régions distinctes (exoI, exoII et exoIII) hautement conservées parmi les ADN pol de type α (Blanco *et al*., 1992, Morrison *et al*., 1991). Les motifs exoII et exoIII sont compris dans les régions conservées IV et δ-région C, respectivement, tandis que le motif exoI est situé à l'extrémité N-terminale du gène (Figure 7, p.87). Des études de mutagenèse dirigée ont permis de déterminer la contribution de certaines positions précises dans l'activité exonucléase de l'enzyme (Hall *et al*., 1995, Hwang *et al*., 1997, Hwang *et*

al., 1999, Hwang *et al*., 1998, Kuhn & Knopf, 1996) ainsi que dans la liaison aux antiviraux (Hwang *et al*., 1998, Kuhn & Knopf, 1996). Aucune activité exonucléase n'est détectée suite à l'introduction des mutations D368A et E370A dans le motif exoI (Hall *et al*., 1995, Kuhn & Knopf, 1996), tandis qu'une certaine fonction polymérase peut être observée (Kuhn & Knopf, 1996). D'un autre côté, l'équipe de Hall a tenté, mais sans succès de construire des virus recombinants comportant la mutation D368A (Hall *et al*., 1995). L'absence d'activité exonucléase pourrait donc entraîner la génération de mutations létales, rendant impossible la réplication de virus exprimant cette mutation. De façon similaire, la mutation D471A dans le motif exoII, n'a pu être générée dans des virus recombinants et aucune activité pol n'a été détectée suite à la sur-expression de l'enzyme mutante (Hall *et al*., 1995). Finalement, deux mutations (Y577S et D581A) dans la région exoIII affectant dramatiquement l'activité 3'-5' exonucléase de l'enzyme (Hall *et al*., 1995, Kuhn & Knopf, 1996) et, de façon moins marquée, l'activité pol (Kuhn & Knopf, 1996) ont pu être incorporées dans l'ADN pol de virus recombinants (Hwang *et al*., 1997, Hwang *et al*., 1998). Malgré la génération importante de mutations, ces virus sont capables de se répliquer, mais de façon moins efficace que les VHS recombinants sauvages. En effet, l'utilisation d'une lignée cellulaire complémentaire, exprimant une ADN pol virale de type sauvage est probablement nécessaire à la génération des virus recombinants comportant les mutations Y577S et D581A (Hwang *et al*., 1997, Hwang *et al*., 1998). Ces mutations entraînent également un phénotype de résistance aux analogues de ppi et une hypersensibilité à l'ACV (Hwang *et al*., 1997, Hwang *et al*., 1998). L'ensemble de ces études a donc permis de déterminer l'importance des motifs exo dans l'activité exonucléase de l'enzyme, ainsi que dans la réplication du VHS.

De façon intéressante, une mutation (V573M) dans le motif exoIII a pu être sélectionnée en culture cellulaire avec la présence de dérivés HPMP qui comprennent entre autre le CDV (Andrei *et al*., 2000). Les travaux rapportés dans cette étude ont également démontré que cette mutation semble être reliée à une diminution de la neurovirulence du VHS chez la souris. Le rôle de cette mutation dans la réplication du VHS en culture cellulaire n'a cependant pas été évalué. Deux autres mutations E597K et A605V, situées hors des motifs exo mais comprises dans la δ-région C du VHS, ont également pu être sélectionnées en

culture cellulaire et ont été associées à une diminution de la sensibilité des virus à l'ACV et aux analogues des ppi (Gibbs *et al*., 1988, Larder *et al*., 1987).

1.13.3.2.1.6 Mutations hors des régions conservées

Des mutations se situant entre les régions conservées du gène de l'ADN pol ont également été rapportées dans des souches de VHS passées en laboratoire (Andrei *et al*., 2000). Deux mutations (L1007M, I1028T) dans la partie C-terminale de l'enzyme (en aval des régions conservées) ont été sélectionnées en présence de dérivés HPMP (Andrei *et al*., 2000). De façon surprenante, ces mutations ont uniquement été associées à la résistance à ces mêmes dérivés n'amenant aucun changement significatif dans la sensibilité aux dérivés PME, faisant partie de la même classe d'antiviraux (ANP). Ces résultats vont également dans le même sens que des études effectuées avec des souches de CMV recombinantes (Cihlar *et al*., 1998a) ce qui suggère que ces deux sous-classes d'antiviraux (HPMP et PME) interagissent avec des sites de liaisons différents sur l'ADN pol virale. D'un autre côté, les mutants résistants aux dérivés PMEA semblent moins sensibles aux analogues des ppi, ce qui pourrait indiquer que les sites de liaison de ces antiviraux se superposent (Andrei *et al*., 2000, Andrei *et al*., 1997, Bestman-Smith & Boivin, 2002, Cihlar *et al*., 1998a). Ces études suggèrent donc que le CDV et non l'ADV, pourrait consister en un traitement alternatif intéressant pour la résolution d'infections herpétiques résistantes au FOS. Cependant, une meilleure connaissance des mutations impliquées dans la résistance du VHS au CDV est requise avant de conclure avec certitude à l'indication du CDV en tant que traitement alternatif.

1.13.3.2.2 Mutations sélectionnées in vivo

Les deux premiers isolats de VHS comprenant des mutations au sein du gène de l'ADN pol à être isolés en clinique ont été obtenus chez des patients sévèrement immunosupprimés (transplanté de moelle osseuse) ayant subi un traitement prolongé avec l'ACV (Collins *et al*., 1989, Sacks *et al*., 1989). Des mutations aux positions 941 (tyrosine pour une histidine) dans la région VII (Hwang *et al*., 1992, Sacks *et al*., 1989) et 841 (glycine pour une sérine) dans la région conservée III, ont été respectivement identifiées. Ces deux mutations ont été associées à un phénotype de résistance à l'ACV et aux analogues des ppi par la mesure des

CI_{50} *in vitro*. Ces phénotypes ont également été confirmés par des études de transfection et de recombinaison homologue (Hwang *et al*., 1992, Larder *et al*., 1987, Pelosi *et al*., 1998b). Cependant, il est intéressant de noter que le patient infecté par le mutant Y941H a pu être traité de façon efficace avec le FOS. Cette mutation était également associée à une atténuation de la neurovirulence du VHS chez la souris, et ce, probablement dû à la diminution de la capacité réplicative du mutant dans le cerveau de la souris (Pelosi *et al*., 1998b).

Neuf isolats cliniques résistants au FOS ont ensuite été isolés chez des patients infectés par le VIH suite à un échec séquentiel de traitements à l'ACV et au FOS (Safrin *et al*., 1994b). Ces isolats ont été caractérisés phénotypiquement et génotypiquement dans notre laboratoire et des mutations ponctuelles dans les régions conservées II, III, VI, et entre les régions VII et I du gène de l'ADN pol ont été identifiées (Schmit & Boivin, 1999) (voir Tableau 9, p.93). Ces mutations ont été associées à une diminution significative de la sensibilité du VHS au FOS, mais à des valeurs de CI_{50} indiquant une sensibilité à l'ACV (Bestman-Smith & Boivin, 2002, Schmit & Boivin, 1999). Les détails ainsi que les résultats de cette étude sont en fait le sujet du chapitre III de cette thèse (p.135). Les isolats résistants au FOS ont également démontré une résistance croisée à l'ADV tout en demeurant sensibles au CDV (Bestman-Smith & Boivin, 2002). Par contre, le rôle de ces mutations dans la résistance aux antiviraux n'avait pas été confirmé de façon définitive. En effet, des souches de VHS pré-thérapie de type sauvage et isolées des mêmes patients n'étaient pas disponibles pour fin de comparaison. En fait, les isolats obtenus avant le début du traitement au FOS (pré-FOS) comportaient des mutations au sein du gène de la TK virale, responsables de l'échec initial du traitement à l'ACV (Bestman-Smith *et al*., 2001, Schmit & Boivin, 1999). Ces isolats ne pouvaient donc pas servir de contrôle pour mesurer les changements de sensibilité à l'ACV et au CDV. En effet, des études ont démontré que des VHS exprimant une TK modifiée sont plus susceptibles au CDV et ce, dû à une diminution du "pool" des dCTP (Bestman-Smith & Boivin, 2002, Mendel *et al*., 1995). De plus, un des isolats obtenu après le traitement au FOS comportait à la fois une mutation dans le gène de l'ADN pol (D912V) et dans le gène de la TK virale (délétion d'un C au nt 463) (Schmit & Boivin, 1999). La contribution de la mutation D912V au sein de l'ADN pol du VHS-2 dans la résistance à l'ACV, n'a donc pu être déterminée dans cette étude. Finalement, trois

isolats de VHS-1 obtenus du même patient comportaient plus d'une mutation dans l'ADN pol (S724N et P920S) dans les trois cas. La mutation S724N a été identifiée dans plusieurs isolats de laboratoire résistants à l'ACV et au FOS tel que discuté préalablement (Andrei *et al*., 2000, Gibbs *et al*., 1988, Larder *et al*., 1987), alors que l'implication de la mutation P920S située hors des régions conservées n'est pas encore connue. Tout récemment, une mutation à la position V715G au niveau de la région conservée II du gène de l'ADN pol a été identifiée dans un isolat clinique de VHS-1. Ce mutant a été obtenu chez un patient avec une immunodéficience congénitale (syndrome de Wiskott-Aldrich) (Saijo *et al*., 2002) traité avec l'ACV et le FOS et les mesures de sensibilité *in vitro* de cette souche ont révélé une hypersensibilité au CDV et une résistance à l'ACV et au FOS (Saijo *et al*., 2002). Une autre mutation (S725G) dans cette même région conservée du gène de l'ADN pol du VHS-2 a été identifiée dans une souche résistante au FOS chez un patient atteint du SIDA (Chibo *et al*., 2002). Le rôle de cette mutation dans la résistance à l'ACV n'a cependant pu être déterminé, dû à la présence simultanée d'une mutation dans le gène de la TK (délétion de 969 pb). Pour toutes les raisons énumérées (absence de souche pré-thérapie, plus d'une mutation dans le gène de l'ADN pol et des mutations à la fois dans le gène de la TK et de l'ADN pol), la confirmation du rôle des mutations dans le gène de l'ADN pol de ces isolats s'avère nécessaire afin de déterminer leur rôle définitif dans la résistance aux antiviraux.

Considérant toutes les données rapportées jusqu'à maintenant, aucune corrélation parfaite ne peut être faite entre les mutations dans une région conservée donnée et le phénotype de résistance aux antiviraux obtenus. Pour la plupart des mutations identifiées au sein du gène de l'ADN pol du VHS, la sensibilité aux dérivés ANP n'a pas été évaluée. De plus, le rôle définitif de certaines de ces mutations n'a pas été confirmé de façon convaincante et ce, probablement dû au fait qu'il y ait peu de méthodes disponibles qui permettent d'évaluer de façon adéquate le rôle des mutations dans la résistance aux antiviraux. En effet, le transfert d'une mutation dans une souche sauvage par transfection et recombinaison homologue est encore la méthode la plus utilisée, mais conserve des désavantages importants tel que discuté précédemment (1.13.3.1.1, p.89). Finalement, les capacités réplicatives n'ont pas été évaluées pour la plupart des mutants rapportés. Certaines conclusions intéressantes peuvent toutefois être dégagées de l'ensemble des études effectuées jusqu'à maintenant. Par exemple, il est maintenant acceptable d'affirmer que le CDV et non l'ADV consisterait en

une alternative adéquate pour le traitement des infections causées par des virus résistants à l'ACV et/ou au FOS et ce, bien que cet antiviral ne soit pas approuvé pour le traitement du VHS. En effet, il semble exister une résistance croisée entre le FOS et l'ADV. Puisque les mutations associées à un phénotype de résistance spécifique sont nombreuses et peuvent originer de plusieurs régions conservées et comme seulement certaines mutations ont été définitivement impliquées dans la résistance, des tests génotypiques rapides ne peuvent être recommandés pour l'instant. Le développement de nouvelles méthodes afin de caractériser de façon plus complète le gène de l'ADN pol du VHS permettrait certainement d'orienter plus efficacement le choix du traitement des infections résistantes. Dans le cas du CMV, l'équipe du Dr Thomas Cihlar a développé un système de cosmides et de plasmides recombinants qui permet de générer des virus comprenant des mutations dans le gène de l'ADN pol et d'évaluer leur rôle dans la résistance aux antiviraux (Cihlar *et al.*, 1998a). Une méthode similaire serait certainement envisageable et profitable afin de connaître plus précisément la relation entre une mutation dans le gène de l'ADN pol du VHS et la résistance aux antiviraux d'autant plus qu'il ne semble pas exister une corrélation parfaite entre les phénotypes de résistance pour des mutations similaires dans le gène de l'ADN pol de ces deux virus (VHS et CMV).

1.13.4 Pathogénicité des virus résistants (capacité réplicative)

La génération de mutations conférant la résistance aux antiviraux peut s'accompagner d'une altération des propriétés biologiques des virus, notamment au niveau de leur capacité de réplication, de leur tropisme et de leur pathogénicité. Tel que discuté dans une section précédente (1.5, p.17), deux méthodes sont habituellement utilisées afin d'étudier la pathogénicité des souches de VHS chez la souris. Le modèle d'encéphalite herpétique implique une infection létale du SNC et permet d'évaluer de façon générale la neurovirulence de la souche. Toutefois, les résultats obtenus lors de ce genre d'essais chez la souris ne peuvent être transposés tels quels chez l'humain, puisque le cours de la maladie chez ce dernier (pour qui l'infection n'est pas nécessairement létale) n'est pas tout à fait le même que chez la souris. D'un autre côté, le deuxième type d'étude (explantation des ganglions sensitifs en milieu de culture suite à une infection en périphérie) représente

mieux le cours naturel d'une infection par le VHS chez l'humain, et vise principalement l'étude du phénomène de la latence.

Il a rapidement été démontré que les souches de VHS résistantes aux antiviraux sont généralement moins neurovirulentes que les souches sauvages tel que démontré par une diminution de la DL_{50} ou par une capacité moindre des virus mutants à envahir le SNC et/ou périphérique chez l'animal (Coen *et al*., 1989a, Coen *et al*., 1989b, Efstathiou *et al*., 1989). La réduction de la virulence des VHS résistants aux antiviraux expliquerait peut-être en partie l'absence relative de ces virus chez les individus immunocompétents. D'un autre côté, chez les immunosupprimés et les nouveau-nés, les souches mutantes possèdent habituellement encore la capacité d'entraîner des infections persistantes et même la mort (Chibo *et al*., 2002, Levin *et al*., 2001, Oram *et al*., 2000, Sacks *et al*., 1989, Safrin *et al*., 1994b, Saijo *et al*., 1998). De façon générale, les virus totalement dépurvus de TK (i.e. les souches possédant des délétions de nucléotides et l'apparition d'un codon d'arrêt) sont les plus neuro-atténués, i.e. incapables de causer une infection létale du SNC et de se répliquer dans certains sites périphériques (Martuza *et al*., 1991). En fait, il semble que ces mutants se répliquent moins efficacement dans le cerveau de la souris (Boivin *et al*., 2002, Chrisp *et al*., 1989, Efstathiou *et al*., 1989) et sont incapables de se réactiver au niveau des sites de latence (Coen *et al*., 1989b, Efstathiou *et al*., 1989, Jacobson *et al*., 1993a). Une étude récente a mis en évidence la nécessité de la TK dans la réplication virale au niveau du SNC qui résulte en l'induction de la réponse inflammatoire. Celle-ci semble en partie responsable des dommages observés au niveau de ces tissus menant à la mort éventuelle de la souris (Boivin *et al*., 2002). D'un autre côté, les virus TK-altérés et faibles producteurs de TK sembleraient moins neuro-atténués. Des études plus poussées ont révélé que des virus complètement dépourvus d'activité TK sont capables de se répliquer efficacement au site d'inoculation (Coen *et al*., 1989b), d'établir la latence dans les ganglions sensitifs, mais sont incapables de se réactiver et de se répliquer activement dans les ganglions sensitifs (Coen *et al*., 1989b, Efstathiou *et al*., 1989, Jacobson *et al*., 1993b). Des quantités suffisantes d'ADN viral peuvent en effet être détectées dans ces ganglions (Katz *et al*., 1990, Leist *et al*., 1989), et les LATs sont également décelés dans les ganglions infectés. Toutefois, il a été démontré que ces mutants sont incapables de se répliquer suite à l'explantation des ganglions dans un environnement favorable à la réplication du VHS

(Coen *et al*., 1989b, Leist *et al*., 1989, Tenser *et al*., 1989). La TK virale serait donc essentielle à la réplication du VHS au niveau des ganglions sensitifs.

La nécessité d'une certaine activité TK a été démontrée par la réactivation des virus TK- en présence d'une sous-population de virus TK+ (Efstathiou *et al*., 1989, Field & Lay, 1984). Ce mécanisme de compensation de l'activité TK par des virus sauvages expliquerait en partie la présence de populations virales hétérogènes (TK+ et TK-) dans les isolats cliniques de VHS au site des lésions récurrentes (Englund *et al*., 1990, Gaudreau *et al*., 1998, Kost *et al*., 1993, Martin *et al*., 1985, Nugier *et al*., 1992, Sacks *et al*., 1989, Sarisky *et al*., 2001, Sasadeusz *et al*., 1997). D'autre part, les VHS mutants TK-partiel ou –altéré sont moins affectés dans leur neurovirulence et possèdent la capacité de se répliquer dans le SNP et de se réactiver plus ou moins efficacement dépendant de la quantité de TK exprimée (Coen *et al*., 1989a, Tanaka *et al*., 1993). Le rôle de la TK dans la réactivation du VHS serait en fait de fournir la thymidine. En effet, des concentrations supraphysiologiques de thymidine (Tenser *et al*., 1996) ou une activité TK abondante dans des cellules en division, permet la réactivation de virus TK- (Suzutani *et al*., 1995). De plus, l'équipe de Chen et ses collaborateurs a souligné de façon élégante l'importance de l'activité thymidylate kinase pour la réplication et la réactivation du VHS dans les ganglions sensitifs à l'aide de VHS recombinants exprimant individuellement différents types de kinases humaines (Chen *et al*., 1998). En effet, le tissu du SNC (qui ne se multiplie pas) est caractérisé par un faible métabolisme du thymidylate et les virus TK-déficients dans lequel ils avaient inséré la tymidylate kinase humaine ont pu retrouver leur capacité de se réactiver.

De façon quelque peu contradictoire, des virus résistant à l'ACV et semblant totalement dépourvus d'activité TK ont été isolés de lésions récurrentes chez quelques patients immunosupprimés (Erlich *et al*., 1989b, Horsburgh *et al*., 1998, Morfin *et al*., 2000b, Sacks *et al*., 1989, Saijo *et al*., 1999, Sasadeusz & Sacks, 1996). Une pathogénicité semblable à celle des virus sauvages a également été mesurée pour ces virus dans des modèles animaux (Chatis & Crumpacker, 1991, Erlich *et al*., 1989b, Horsburgh *et al*., 1998, Huang *et al*., 1999, Sasadeusz & Sacks, 1996, Tanaka *et al*., 1993). La présence d'une faible sous-population de virus sauvages ou une certaine activité TK indécelable par les techniques de

laboratoire utilisées pourraient être à l'origine de ces observations (Hwang *et al*., 1994, Sasadeusz & Sacks, 1996). Sasadeusz et ses collaborateurs ont également émis l'hypothèse qu'une mutation spontanée dans un homopolymère de nucléotides pourrait être à l'origine de la réversion du phénotype de TK- à un phénotype de TK+ (Sasadeusz & Sacks, 1996). En effet, tel que discuté préalablement (section 1.13.3.1, p.83), les homopolymères de G ou de C, fréquemment à l'origine de mutations ponctuelles (addition et délétion), sont plus susceptibles aux changements de cadre de lecture lors de la traduction de l'ARN sur les ribosomes (ribosomal frameshifting). Ce phénomène pourrait en fait entraîner la production d'une quantité suffisante de TK pour permettre la réactivation du virus (Sasadeusz *et al*., 1997). Finalement, une augmentation de l'activité d'autres enzymes virales telles que la dUTPase ou la ribonucléotide réductase pourrait possiblement compenser la perte de l'activité TK (Horsburgh *et al*., 1998). L'ensemble des études effectuées dans les modèles animaux ne semble pas, pour le moment, permettre d'expliquer totalement le mécanisme de réactivation de ces virus mutants déficients en TK chez l'humain.

L'implication du gène de l'ADN pol dans la pathogénicité du VHS a été beaucoup moins étudiée que celle de la TK virale. Certaines mutations dans le gène de l'ADN pol, associées à la résistance aux antiviraux, entraînent également une diminution de la neurovirulence du VHS chez la souris (Andrei *et al*., 2000, Field & Coen, 1986, Jacobson *et al*., 1995, Larder & Darby, 1986, Pelosi *et al*., 1998b, Sacks *et al*., 1989). Dans ces cas-ci, ces virus ont, pour la plupart, pu se réactiver de la latence. Par contre, leur habileté à se répliquer dans le SNP ou dans d'autres types cellulaires n'a pas été évaluée. Le mécanisme associé à cette neuro-atténuation pourrait en effet être simplement relié à une diminution des capacités réplicatives des virus ADN pol mutants. Toutefois, l'équipe de Field et ses collaborateurs ont démontré que malgré une réplication efficace au site d'inoculation (oreilles de souris), trois souches de virus possédant des mutations au sein du gène de ADN pol (Pro797Thr, Arg842Ser et Asn961Lys) étaient moins neurovirulentes que les souches sauvages (Field & Coen, 1986). Les auteurs ont spéculé sur une possible diminution de l'affinité de ces ADN pol pour les déoxynucléotides, possiblement en concentration moindre dans les cellules du SNC et périphérique. Pelosi et ses collaborateurs ont pour leur part tenté d'élucider de façon plus approfondie le mécanisme d'atténuation de la virulence d'un de ces mutants (Arg842Ser, région III) (Pelosi *et al*., 1998b). Suite à l'inoculation intracérébrale des souris,

des titres viraux comparables à ceux de la souche sauvage ont été mesurés dans le cerveau des souris infectées avec des virus comportant cette mutation. De plus, une distribution similaire et des niveaux d'expression semblables des antigènes viraux ont été décelés pour les virus mutant et sauvage. D'un autre côté, un autre mutant ADN pol (Tyr941His, région VII) démontrant une neuro-atténuation semblable à celle du mutant Arg842Ser, se répliqua beaucoup moins efficacement dans le cerveau des souris infectées (Pelosi *et al*., 1998b). Le mécanisme par lequel la mutation Arg842Ser entraîne une diminution de la neurovirulence n'est donc pas encore bien compris.

De façon intéressante, un effet synergique dans l'atténuation de la neurovirulence d'une souche recombinante comportant à la fois la mutation Arg842Ser et une TK-faible a également pu être observé (Jacobson *et al*., 1995). En effet, suite à une inoculation virale intracornéenne, la réplication des souches mutantes exprimant soit la TK-faible ou l'ADN pol mutante au niveau des ganglions sensitifs était similaire à celle d'une souche sauvage tandis que le double mutant n'a pu être décelé à ces niveaux. De plus, les souches comportant un seul gène mutant (TK ou ADN pol) ont pu être réactivées de leur latence. Finalement, suite à une inoculation intracérébrale, le double mutant démontra une neuro-atténuation beaucoup plus importante que les autres souches (TK ou ADN pol mutante) (Jacobson *et al*., 1995). Plus récemment, le groupe de Andrei et ses collaborateurs ont démontré que des mutants sélectionnés en présence de dérivés HPMP ont une DL_{50} beaucoup plus élevée chez la souris comparativement aux mutants sélectionnés en présence de FOS ou de dérivés PMEA. Le rôle du gène de l'ADN pol dans la pathogénicité du VHS semble différent de celui de la TK virale. La baisse de la capacité de réplication des virus due à des mutations au sein de l'ADN pol n'explique pas tous les cas de neuro-atténuation et d'autres mécanismes pourraient être en cause, comme par exemple un changement de tropisme ou une diminution de l'expression de certains gènes, notamment celui de la TK virale. D'autres investigations sont donc nécessaires afin de caractériser ces gènes dans la pathogénicité du VHS.

1.14 Objectifs de recherche

1.14.1 Problématique

Des VHS résistants aux antiviraux sont isolés relativement fréquemment en clinique, et ce, presque exclusivement chez les individus immunosupprimés. Les infections qu'ils causent sont habituellement persistantes et peuvent se disséminer, ce qui engendre considérablement de morbidité chez ces patients. La plupart des virus mutants isolés en clinique comportent des mutations au sein du gène de la TK virale, cette dernière étant essentielle à l'activation des antiviraux de première ligne, i.e. les analogues des nucléosides. Le FOS est actuellement le seul antiviral approuvé pour le traitement des infections causées par des VHS résistants aux analogues des nucléosides. Cependant, un traitement à long terme au FOS est fréquemment associé à une forte toxicité et des virus mutants résistant à cet antiviral peuvent aussi être isolés chez des patients immunosupprimés. D'autres antiviraux tels que le CDV et l'ADV ont démontré une certaine efficacité contre l'infection au VHS et possèdent donc un potentiel en tant que traitement alternatif. Cependant, l'ADN pol virale est la cible ultime de tous ces agents anti-herpétiques et il est donc vraisemblable d'envisager que des mutations au sein de ce gène puissent être à l'origine de résistances multiples.

En clinique, la résistance phénotypique du VHS à l'ACV est confirmée par la détermination de la CI_{50} en utilisant la MRP. Cependant, cette méthode est longue et ardue et difficilement reproductible d'un laboratoire à l'autre et même d'un technicien à l'autre. Il est donc difficile d'envisager la possibiliter d'évaluer la sensibilité des souches de VHS à plusieurs antiviraux à la fois dans le but de prévoir un traitement alternatif adéquat. De plus, la détection de souches résistantes par des tests phénotypiques est souvent limitée, dû à l'hétérogénéité des souches infectant un individu et la présence probable de mutants résistants ayant des capacités de réplication réduites. D'un autre côté, l'utilisation de méthodes génotypiques afin d'identifier les virus résistants, directement à partir de spécimens cliniques, requiert une bonne connaissance des mutations impliquées dans la résistance aux antiviraux. La présence d'un certain niveau de polymorphisme génétique au sein des gènes de la TK et de l'ADN pol du VHS (les deux gènes impliqués dans la résistance antivirale) rend d'autant plus difficile l'identification de ces mutations. Jusqu'à

maintenant, la méthode la plus utilisée pour évaluer le rôle des mutations virales (transfection et recombinaison homologue entre un gène muté et une souche sauvage) comporte plusieurs désavantages. Premièrement, la recombinaison homologue est un phénomène rare chez les virus herpétiques. De plus, la nécessité d'appliquer une pression sélective avec un antiviral pour isoler les rares virus mutants peut facilement mener à l'introduction de nouvelles mutations. Finalement, les virus ainsi obtenus doivent être purifiés afin d'obtenir une population virale homogène.

L'objectif principal des études présentées dans cette thèse de doctorat consiste donc en la caractérisation des mutations virales impliquées dans la résistance du VHS aux antiviraux. Deux nouvelles méthodes ont été mises au point et serviront à identifier avec plus de précision le rôle des mutations au sein des gènes de la TK et de l'ADN pol viral.

1.14.2 Caractérisation du gène de la TK

La première méthode développée consiste en un système d'expression hétérologue du gène de la TK du VHS chez le parasite *Leishmania tarentolae* (normalement dépourvu d'activité TK) afin d'évaluer le rôle des mutations au sein de ce gène dans la résistance aux analogues des nucléosides. Plusieurs isolats cliniques de VHS-1 et –2 isolés de patients immunosupprimés (infectés par le VIH et transplantés) ont été obtenus du Dr Sharon Safrin (Schmit & Boivin, 1999), du laboratoire de l'université du Minnesota (Gaudreau *et al*., 1998), et de plusieurs hôpitaux de la province de Québec. Ces virus ont été isolés avant, pendant et/ou suivant un traitement à l'ACV. Ces isolats cliniques de VHS seront caractérisés phénotypiquement et génotypiquement en déterminant la CI_{50} à l'ACV par la MRP et par l'amplification par PCR et séquençage du gène de la TK. La mise au point du nouveau système d'expression chez le parasite *Leishmania* vise donc à discriminer entre les mutations dans le gène de la TK conférant la résistance du VHS aux analogues des nucléosides et celles seulement impliquées dans le polymorphisme génétique. Les détails du matériel et de la méthode concernant la mise au point de ce nouveau système de même que les résultats obtenus par ces travaux ont été publiés dans une revue scientifique (Bestman-Smith *et al*., 2001) et seront donc présentés sous cette forme au chapitre II (p. 112) de cette thèse.

1.14.3 Caractérisation du gène de l'ADN pol

Puisque tous les agents anti-herpétiques ont comme cible ultime l'ADN pol virale, il apparaît intéressant d'évaluer le site de liaison spécifique des antiviraux et d'évaluer les profils de résistance croisée conférés par des mutations dans ce gène. Une série d'isolats de VHS obtenus de patients sidéens ayant subit un échec séquentiel au traitement à l'ACV et au FOS et comportant des mutations au sein du gène de l'ADN pol (Schmit & Boivin, 1999) feront l'objet de cette étude. La sensibilité de ces souches virales à l'ACV, au FOS, au CDV et à l'ADV sera donc évaluée afin de déterminer le profil de résistance associé aux mutations identifiées dans le gène de l'ADN pol virale. Les résultats des analyses phénotypiques et génotypiques concernant la résistance des souches cliniques de VHS ont été publiés dans une revue scientifique (Bestman-Smith & Boivin, 2002) et seront présentés sous cette forme au chapitre III de cette thèse (p. 135).

La caractérisation plus précise des mutations au sein du gène de l'ADN pol sera réalisée en se servant d'un système de cosmides et de plasmides dont les inserts couvrent le génome entier du VHS et s'entrecoupent entre eux. Des mutations, simples ou multiples, pourront ensuite être introduites par mutagénèse dirigée dans les différentes régions conservées du gène de l'ADN pol. Les virus recombinants ADN pol mutants seront alors générés par la co-transfection des cosmides et des plasmides dans les cellules Véro. La sensibilité des virus recombinants aux divers antiviraux, permettra enfin de déterminer le profil de résistance conféré par une ou plusieurs mutations spécifiques au sein de ce gène. Finalement, la capacité réplicative des virus recombinants pourra être évaluée par la mesure des titres viraux en culture cellulaire à différents temps post-infection. Les détails du matériel et de la méthode concernant la mise au point de ce nouveau système de cosmides et de plasmides recombinants de même que les résultats obtenus par ces travaux ont également été publiés dans une revue scientifique (Bestman-Smith & Boivin, 2003) et seront présentés sous cette forme au chapitre IV (p. 148) de cette thèse.

2 CHAPITRE II :ÉVALUATION DE LA RÉSISTANCE D'ISOLATS CLINIQUES DU VIRUS HERPÈS SIMPLEX AUX ANALOGUES DES NUCLÉOSIDES À L'AIDE D'UN NOUVEAU SYSTÈME D'EXPRESSION HÉTÉROLOGUE

Ce chapitre reproduit le texte intégral d'un article intitulé *Highly reliable heterologous system for evaluating resistance of clinical herpes simplex virus isolates to nucleoside analogues* par **Julie Bestman-Smith**, Isabelle Schmit, Barbara Papadopoulou et Guy Boivin. Cet article a été publié dans la revue *Journal of Virology*, vol. 75, No.7 (2001), p. 3105-3110.

CONTRIBUTION DES AUTEURS :

Julie Bestman-Smith

- Mise au point de la méthode présentée
- Analyse génotypique et phénotypique des mutants recombinants
- Rédaction de l'article scientifique

Isabelle Schmit

- Mise au point de la méthode présentée
- Analyse génotypique et phénotypique des mutants recombinants

Dr Barbara Papadopoulou

- Correction de la rédaction

Dr Guy Boivin

- Supervision du projet de recherche
- Coordination et correction de la rédaction

2.1 Résumé

La résistance des virus herpès simplex (VHS) à l'acyclovir (ACV) est principalement conférée par des mutations dans le gène de la thymidine kinase (TK) virale. Il est difficile avec les méthodes actuelles (transfection et recombinaison homologue) de faire la distinction entre les mutations virales impliquées dans la résistance et celles faisant simplement partie du polymorphisme génétique. Nous avons donc mis au point et validé un système d'expression du gène de la TK dans le parasite *Leishmania* (normalement dépourvu de ce gène) dans le but d'identifier les mutations impliquées dans la résistance à l'ACV. Les gènes codant pour la TK provenant d'isolats cliniques de 5 VHS sensibles et de 13 VHS résistants à l'ACV ainsi que celui des souches de références MS2 (type 2) et KOS (type 1) faisant partie d'un vecteur d'expression épisomal, ont été transfectés dans le parasite *Leishmania*. La sensibilité des parasites TK-recombinants au ganciclovir (GCV), un analogue de nucléoside, a été évaluée par la simple mesure de la densité optique de parasites *Leishmania* cultivés en présence de cet antiviral. L'expression de gènes TK provenant des souches cliniques sensibles à l'ACV a entraîné une sensibilité du *Leishmania* au GCV et inversement, la transfection de gènes TK comprenant des mutations menant à un changement de cadre de lecture ou à des substitutions de nucléotides de souches cliniques résistantes à l'ACV a résulté en un niveau élevé de résistance du parasite au GCV. L'expression du gène de la TK chez le parasite *Leishmania* permet de confirmer de façon efficace et rapide le phénotype de résistance ou de sensibilité des souches de VHS aux analogues des nucléosides et de déterminer le rôle spécifique des mutations au sein du gène de la TK virale.

2.2 Abstract

Clinical resistance of Herpes simplex virus (HSV) type 1 and 2 to acyclovir (ACV) is usually caused by the presence of point mutations within the coding region of the viral thymidine kinase (TK) gene. The distinction between viral TK mutations involved in ACV resistance or part of viral polymorphism can be difficult to evaluate with current methodologies based on transfection and homologous recombination. We have developed and validated a new heterologous system based on the expression of the viral TK gene by the protozoan parasite *Leishmania* normally devoided of TK activity. The viral TK genes from 5 ACV-susceptible and 13 ACV-resistant clinical HSV isolates and from the reference strains MS2 (type-2) and KOS (type-1) were transfected as part of an episomal expression vector in the parasite *Leishmania*. The susceptibility of TK-recombinant parasites to ganciclovir (GCV), a closely related nucleoside analogue, was evaluated by a simple measurement of the absorbance of *Leishmania* cultures grown in the presence of the drug. Expression of the TK gene from ACV-susceptible clinical isolates resulted in *Leishmania* susceptibility to GCV whereas expression of a TK gene with frameshift mutations or nucleotide substitutions from ACV-resistant isolates gave rise to parasites with high levels of GCV resistance. The expression of the HSV TK gene in *Leishmania* provides an easy, reliable, and sensitive assay for evaluating HSV susceptibility to nucleoside analogues and for assessing the role of specific viral TK mutations.

2.3 Introduction

Acyclovir (ACV)-resistant Herpes simplex viruses (HSV) infections are relatively frequent and can be associated with significant morbidity among immunocompromised patients [14, 15, 17, 37, 38]. Resistance to ACV can be the result of point mutations within the viral thymidine kinase (TK) gene, the enzyme responsible for the initial phosphorylation of ACV into ACV-monophosphate or, more rarely, mutations within the viral DNA polymerase (pol) gene [4, 10]. The former mechanism is most frequently seen in the clinic [8, 16, 17, 29], probably because TK is not essential for viral replication in most tissues and culture cells [36]. However, several reports have demonstrated that TK activity facilitates HSV reactivation from latency in neural ganglia [11, 13, 44, 46].

Changes in the TK gene can result in viruses producing no or partial amounts of TK or with an altered substrate specificity [4, 23]. Darby *et al*., have proposed a preliminary model for the active center of the HSV-1 TK enzyme including three distinct regions: an ATP-binding site (amino acids 51 to 63), a nucleoside-binding site (amino acids 168 to 176) and the amino acid 336 [12]. Indeed, single point mutations in one or more of these conserved regions have been reported in ACV-resistant HSV isolates [16, 20, 25, 30, 41, 42]. Furthermore, Sasadeusz *et al.* have identified mutational "hot spots" consisting of frameshift mutations within homopolymer nucleotide stretches of Gs and Cs [41]. Recent studies by our group [16] and others [25] have demonstrated that about 50% of the clinical ACV-resistant strains contain an insertion or a deletion of 1 or 2 nucleotides in homopolymer runs of Gs and Cs, whereas the other half presents single-base substitutions in conserved or non-conserved regions of the TK gene.

Characterization of the TK gene from ACV-susceptible isolates frequently reveals the presence of non-silent mutations outside the active sites of the TK gene reflecting a certain degree of viral polymorphism [21, 24, 25]. At this time, identification of TK mutations conferring resistance to nucleoside analogues is fastidious and requires transfection of the mutated TK gene in a wild-type virus by a rare homologous recombination event followed by selection of the recombinant strain with an antiviral drug. Such drug pressure may frequently lead to generation of new viral mutations not present *in vivo* thus limiting the

interpretation of the results. It is therefore of major interest to develop alternative methods for rapid identification and efficient evaluation of TK mutations conferring ACV resistance. In this study, we describe an heterologous system using the non-pathogenic protozoan parasite *Leishmania tarentolae* (normally devoided of TK activity) as a recipient strain for evaluating the role of several viral mutations detected in clinical ACV-susceptible and ACV-resistant HSV strains.

2.4 Materials and methods

Patients and isolates. HSV clinical isolates from immunocompromised patients (HIV-infected subjects and solid organ transplant recipients) were provided by Sharon Safrin (University of California, San Francisco) [42], the clinical virology laboratory at the University of Minnesota Hospital and Clinics [16], and various hospitals in the Province of Québec, Canada. Upon reception, viruses were grown once on Vero cells, and then stock cultures were stored in aliquots at -80°C.

Antiviral susceptibility assay. Susceptibility to ACV was determined by a plaque reduction assay (PRA) performed on Vero cells [39]. Resistance to ACV was defined by a 50% inhibitory drug concentration (IC_{50}) value ≥ 8,8 µM [7, 14, 39]. Reference laboratory HSV strains KOS (HSV type 1) and MS2 (HSV type 2) were used as susceptible controls.

Genotypic analysis. Total cellular DNA was extracted from infected Vero cells by the use of the QIAamp Blood Mini Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA). Amplification of the viral TK gene was done in a DNA thermal cycler (Hybaid Omnigene; Interscience, Markham, Canada) using ~ 1 µg of extracted DNA, 1X cloned Pfu DNA polymerase reaction buffer (Stratagene, La Jolla, CA), 200 µM of each dNTP, 0.2 µM of each primer, 2.5 U of PfuTurbo® DNA polymerase (Stratagene), and 5% DMSO. The sequences of the two consensus primers used for both HSV-1 and HSV-2 amplification were as follows: 5'-CGTCTAGATGGCGTGAAACTCCCGCACCT-3' (forward) and 5'-ACAAGCTTTCTGTCTTTTTATTGCCGTCAT-3' (reverse) containing the *Xba*I and *Hin*dIII restriction sites (underlined), respectively. Amplification conditions included an initial denaturation step of 5 min at 94°C followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at

55°C, and 2 min at 72°C with a final extension step of 10 min at 72°C . Polymerase chain reaction (PCR) products were purified with an extraction kit (QIAquick Gel; QIAGEN, Chatsworth, CA), and then amplified TK genes were directly sequenced using a cycle sequencing kit (Taq DyeDeoxy Terminator; Applied Biosystems, Foster City, CA) and a DNA sequencing system (ABI 373A; Applied Biosystems). Results were compared with known TK sequences from KOS (type 1) or 333 (type 2) reference strains and to sensitive pre-therapy isolates from patients when available. All TK mutations were confirmed by double-strand DNA sequencing from two different PCR products.

Cloning and expression of viral TK genes in *Leishmania tarentolae*. Experiments were conducted using the wild-type *Leishmania tarentolae* TarII strain described previously [45]. Parasites were grown in SDM-79 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Multicell; Wisent Canadian Laboratories, St-Bruno, Canada) and hemin (5 mg/ml). *Leishmania tarentolae* TK-recombinant parasites expressing wild-type or mutant TK genes and the neomycin phosphotransferase gene (NEO) as a dominant positive selection marker conferring resistance to G418 were generated by transfection of the expression vector pSPαNEOαTK. The latter plasmid was constructed by first subcloning the *Sma*I-*Bam*HI αNEOα expression cassette [34] into the pSP72 vector (Promega, Madison, WI) and then the 1.2-kb *Xba*I-*Hin*dIII digested PCR product containing the TK gene into *Xba*I-*Hin*dIII sites of the pSPαNEOα vector. Transfection experiments were done as described previously [34], and transfectants were selected and grown in the presence of 40 µg/ml of G418 (Geneticin; Life Technologies GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). The expression of the TK and NEO genes in vector pSPαNEOαTK is driven by the α-tubulin intergenic region of *Leishmania enriettii* [22] as shown in Fig. 1. The sequence of the TK gene prior and after transfection into *Leishmania* was confirmed by isolating the expression plasmid with a miniprep kit (Promega) and sequencing the PCR-amplified TK genes.

Susceptibility of *Leishmania* to ganciclovir. Susceptibility of *Leishmania* to the nucleoside analogue ganciclovir (GCV; Cytovene, Syntex Laboratories Inc., Palo Alto, CA) was determined by using a cell growth assay previously described by Muyombwe *et al*. [27]. Briefly, parasites expressing the HSV TK gene were grown in the presence of various concentrations of ganciclovir (5-10000 µM). After 72 h of incubation, the growth of the

parasites was assessed by measuring the absorbance of culture medium at 600 nm and the IC_{50} value was determined.

2.5 Results

Susceptibility of HSV clinical isolates to ACV. Eighteen HSV clinical isolates were recovered from 12 patients, including 10 HIV-infected subjects (1-3, 5-10, 12), one solid organ transplant recipient (4), and one subject with undefined underlying illness (11). For the first 5 patients, a pair of susceptible and resistant isolates was available. For the other 7 patients, only ACV-resistant strains were available. Clinical informations and phenotypic/genotypic characterization of 13 strains isolated from 8 patients (1-4, 6 and 10-12) have been previously reported [16, 42]. Table 1 summarizes susceptibility results to ACV for all clinical isolates. Five HSV isolates recovered from patients either before ACV (n=2) or after foscarnet (n=3) therapy were susceptible to ACV (IC_{50} range: 2-4,4 μM) as measured by the PRA method. Thirteen HSV isolates recovered either during or after ACV treatment were resistant to ACV (IC_{50} range: 9,9-966,1 μM). For patients with both ACV-susceptible and ACV-resistant isolates, the mean change in IC_{50} values over time was 22,9 (range: 4,1-55,6).

Analysis of HSV-TK gene mutations. When compared to pre-therapy ACV-susceptible clinical isolates, ACV-resistant isolates from patients 1-5 contained at least one distinct mutation within the coding region of the TK gene (Table 1). The first two resistant strains (1b and 2b) had an additional G within a stretch of 7 Gs (nt 433-439) when compared to their pre-therapy counterpart. Isolate 3b had a single base substitution at nt 1007 which resulted in a Cys to Tyr amino-acid change at codon 336. This mutation has been previously reported in both laboratory-derived HSV-1 mutants [12, 19, 35] and HSV-2 clinical isolates [41] resulting in a TK-altered or TK–low producer phenotype. Isolate 4b contained a nucleotide substitution (C→T) at position 664 that produced a change from Arg to Cys at codon 222. This residue was reported by Balasubramaniam *et al*. to be part of one of the six conserved regions (site 5, residues 216 to 222) of the TK genes from 12 human and animal herpesviruses [3]. Two distinct mutations Asp55Asn and Arg222His were

present in the proposed ATP-binding site and in conserved region 5 [3], respectively, of isolate 5b but not in the susceptible virus (5a) isolated from the same patient.

For the other patients, only ACV-resistant isolates were available (Table 1). The two ACV-resistant strains isolated from patient 6 had a deleted C at nt 463. However, two additional amino-acid changes at codons 78 and 140 were also detected in those TK genes. Both are located in non-conserved regions of HSV TK and have been reported in ACV-susceptible isolates described in this study (Table 1) and elsewere [20, 24, 31]. Isolate 6b also contained a mutation in the DNA pol gene conferring resistance to foscarnet [42]. Isolate 7 contained a deleted A at nt 1065 and three other non-silent mutations of which two (Pro42Leu and Arg89Gln) have been found in other pre-therapy isolates from this study and elsewhere [21, 25] and thus presumably associated with gene polymorphism. Isolates 8 and 9 had a deleted G at position 779 and 180, respectively. Such deletions resulted in the generation of a premature stop codon and, presumably, in a truncated TK protein. Isolates 8 and 9 also contained an amino-acid substitution (Glu39Gly and Asn78Asp, respectively) in a non-conserved region of the TK gene. The former substitution has been previously associated with a TK-deficient phenotype as determined by plaque autoradiography [41]. On the other hand, the amino-acid substitution (Asn78Asp) detected in isolate 9 was also present in one ACV-susceptible isolate from this study (1a). Isolate 10 contained a nt substitution at codon 131 resulting in a threonine to proline change within a non-conserved region of the HSV TK gene. Isolate 11 contained a substitution at nt 527 that resulted in an amino-acid substitution at codon 176 within the putative nucleoside binding site as well as two other changes (codon 42 and 89) associated with gene polymorphism [21, 25]. The amino-acid change (Arg176Glu) has been previously reported in a laboratory-derived HSV-1 mutant [12] and in ACV-resistant HSV-1 isolates [30]. A 3G for 3C substitution was observed in isolate 12 at positions 175-179 within the proposed ATP-binding site [42].

Heterologous expression of the HSV-TK gene derived from clinical isolates in *Leishmania tarentolae* and susceptibility to GCV. The role of the mutations found within the HSV-TK genes in conferring resistance to nucleoside analogues was evaluated using the non-pathogenic parasite *Leishmania tarentolae* as an heterologous system. A series of pSPαNEOαTK vectors carrying TK genes from several ACV-susceptible and ACV-

resistant HSV strains were transfected by electroporation into *L. tarentolae* as described previousely [34]. Transfection of pSPαNEOαTK vector containing TK genes from the acyclovir-susceptible reference laboratory strains MS2 (HSV-2) and KOS (HSV-1) resulted in parasites expressing resistance to G418 and susceptibility to GCV (IC_{50} values of 55,91 and 17,19 μM, respectively) whereas transfectants without the TK gene were highly resistant to GCV (IC_{50} >10000 μM). As shown in Table 2, the expression of the TK gene from 5 ACV-susceptible clinical isolates (1a-5a) resulted in susceptibility of the parasites to GCV (IC_{50}<100 μM, range: 11,35-99,4 μM). Non-silent viral mutations from our study that are not associated with ACV resistance are summarized in Table 3. On the other hand, expression of TK genes from 13 ACV-resistant clinical isolates resulted in high-level resistance of the parasites to GCV (IC_{50}>5000 μM). More specifically, nucleotide substitutions 3G175-173C, A391C, G527A and G1007A resulted in *Leishmania* IC_{50} values exceeding 10000 μM of GCV whereas the C664T substitution gave a somewhat lower IC_{50} value of 7993 μM. For two isolates (5b and 8), the simultaneous presence of two TK mutations also resulted in resistance of *Leishmania* to GCV although the specific role of each individual mutation could not be assessed. Finally, frameshift mutations (addition or deletion) (strains 1b, 2b, 6a, 6b, 7, and 9) also resulted in high level of resistance of the parasite to GCV. In summary, a >50-fold difference in *Leishmania* IC_{50} values for GCV (from <100 to >5000 μM) was found between ACV-susceptible and ACV-resistant HSV isolates.

2.6 Discussion

ACV-resistant HSV viruses are recovered relatively frequently from immunocompromised subjects receiving this drug for a prolonged period of time [8]. Rapid genotypic characterization of drug-resistant mutants directly from clinical biological fluids requires a good knowledge of viral mutations associated with resistance and those associated with viral polymorphism [21, 24, 25]. Such distinction is particularly important in the case of point substitutions and when pre-therapy isolates are unavailable. Homologous recombination of a mutated TK gene in a wild-type virus following transfection is the method currently in use to confirm the role of specific point mutations. However, homologous recombination is a rare event and the need to apply a drug pressure to select

for such mutant can lead to additional viral mutations. To circumvent this limitation, we have developed an heterologous system in which the TK gene from several HSV clinical isolates was expressed in the parasite *Leishmania* lacking endogenous TK activity.

HSV-1 TK expression has been already used in combination with ACV or GCV as suicide enzyme in gene therapy of cancer [5, 18, 43], AIDS [6], and *Leishmania* infection [26, 27]. In our model, transfected parasites were evaluated for their susceptibility to GCV, a close analogue of ACV. As described elsewere [27], ACV did not inhibit the growth of *Leishmania* transfectants expressing TK activity (data not shown) probably due to the different chemical conformation of the molecule precluding its penetration in the parasite. Nevertheless, ACV-resistant HSV strains containing TK mutations have been shown to be cross-resistant to GCV [1, 2, 28]. In our study, expression of wild-type HSV TK in *Leishmania* resulted in GCV IC_{50} values <100 μM; in contrast, expression of TK genes derived from ACV-resistant HSV strains did not affect the growth of the transfected *Leishmania* (IC_{50} >5000 μM) similar to the situation seen in wild-type parasites. Such large difference in IC_{50} values using the *Leishmania* heterologous system can easily clarify any ambiguities between functional mutations and those associated with gene polymorphism [20, 21, 24, 25, 31]. In our system, the TK gene is expressed as part of an episomal vector that is present on average at 25-50 copies per parasite cell. In such system, the level of random point mutations that may occur following selection with GCV is expected to be extremely low because it is practically impossible to generate the same type of mutation responsible for a resistance phenotype in all the vector copies simultaneously. Moreover, no rearrangements of the TK-transfected genes within the parasite were seen as confirmed by sequence analysis. Indeed, exogenous DNA transfected into *Leishmania*, as part of an episomal or an integration vector, is very stable [32, 33].

In the clinic, HSV resistance to nucleoside analogues is usually confirmed by determination of IC_{50} values using the time-consuming and subjective PRA. DNA sequencing of the open reading frame of the TK gene can further confirm the resistance phenotype of an isolate by identifying mutations most likely responsible for ACV resistance. In some cases, the role of the identified mutation in conferring ACV resistance is highly probable. For instance, nucleotide deletion or addition in G and C homopolymer runs have been commonly

reported in ACV-resistant isolates [16, 41, 42]. These mutations cause a frameshift in the coding sequence of the gene resulting in the formation of a truncated protein as demonstrated by Chatis and Crumpacker [7], and Sasadeusz *et al*. [41] who performed immunoprecipitation of TK polypeptides and Western blot analysis on virus-infected cell extracts. Expression of such TK mutants in *Leishmania* resulted in high-level GCV resistance comparable to non-transfected parasites validating the ability of our model to detect non-functional TK activity and therefore confirming once again the role of such frameshift mutations in conferring ACV resistance. The role of a specific TK substitution can also be assumed to be associated with ACV resistance in the case where a mutation is only present in the resistant isolate but not in a susceptible strain previously recovered from the same patient. However, it is still of interest to ascertain the role of such mutations in isolates containing both TK and DNA pol mutations. Indeed, isolate 6b from this study contained both a TK alteration and a DNA pol mutation between conserved region I and VII conferring resistance to foscarnet and ACV [42]. In this case, we were able to confirm the role of the TK mutation (*Leishmania* IC_{50} value for GCV of 6391 μM) although additional experiments are needed to appreciate the overall contribution of the DNA pol mutation in the ACV-resistant phenotype.

It is particularly important to assess the role of viral substitutions in the case where a high degree of gene polymorphism is present and no pre-therapy isolates are available. Mutations occurring within the catalytic domains or conserved regions of the enzyme are presumed to be responsible for ACV resistance. However, confirmation of their role in the ACV resistance phenotype may contribute to identify more precisely the importance of specific amino-acid residues part of these domains. For example, amino-acid changes at residues 59, 176, and 336 part of the catalytic sites of HSV-1 or –2 described in this study were shown to induce a GCV-resistance phenotype in *Leishmania*. On the other hand, some non-silent TK mutations part of a conserved site can also be associated with gene polymorphism as illustrated by the GCV-susceptible phenotype in *Leishmania* associated with change at residue 286 (isolates 3a and 4a) part of the conserved region 6 described by Balasubramaniam *et al*. [3]. Thus, one obvious consequence of our study was to confirm and expand TK gene polymorphisms associated with HSV type 1 and 2 [21, 24, 25] (Table 3). Such knowledge could be used to rapidly ascertain the role of specific viral mutations in

isolates or directly in clinical samples when some of them have been already associated with gene polymorphism. As an example, the Asn to Asp change at position 78 that was found in both ACV-susceptible and –resistant strains from our study has been previously reported in an ACV-resistant isolate that also contained a mutation at residue 177 within the nucleoside binding site [20]. Thus, based on our work, the functional role of the TK mutation at codon 78 can be definitively ruled out. We were also able to confirm the role of an amino-acid substitution in a non-catalytic and non-conserved region of the TK gene (codon 131) in conferring resistance to ACV. Specific mutations could also be evaluated in our system using site-directed mutagenesis on PCR-amplified TK genes. However, since only the coding region of the TK gene is expressed in the parasite, any mutations occurring outside this region (i.e. within the TK promoter or RNA processing signals) that could affect the expression of the enzyme would not be detected in our system.

One drawback of this system is its inability to determine the levels of resistance conferred by specific TK mutations since all ACV-resistant isolates induced extremely high levels of GCV resistance in *Leishmania.* Nevertheless, the use of this heterologous system will greatly simplify the identification of mutational "hot spots" in the TK gene associated with resistance to nucleoside analogues. Moreover, a similar strategy can be used to evaluate the activity of the TK enzyme or its analogue in other herpesviridae (for example varicella zoster virus [40]) and the impact of TK mutations detected in such viruses.

2.7 Acknowledgments

The authors would like to thank Carole Dumas for technical support and Michel J. Tremblay for constructive comments and helpful discussions. This work was supported by a grant (no. MT-13924) from the Canadian Institutes of Health Research to G.B. J.B.-S. holds a student fellowship from the Canadian Institutes of Health Research.

2.8 References

1. Andrei, G., R. Snoeck, and E. De Clercq. 1997. Differential susceptibility of several drug-resistant strains of herpes simplex virus type 2 to various antiviral compounds. Antivir. Chem. Chemother. 8:457-461.

2. Andrei, G., R. Snoeck, and E. De Clercq. 1995. Susceptibilities of several drug-resistant herpes simplex virus type 1 strains to alternative antiviral compounds. Antimicrob. Agents Chemother. 39:1632-1635.

3. Balasubramaniam, N. K., V. Veerisetty, and G. A. Gentry. 1990. Herpesviral deoxythymidine kinases contain a site analogous to the phosphoryl-binding arginine-rich region of porcine adenylate kinase; comparison of secondary structure predictions and conservation. J. Gen. Virol. 71:2979-2987.

4. Balfour, H. H., Jr. 1983. Resistance of herpes simplex to acyclovir. Ann. Intern. Med. 98:404-406.

5. Boviatsis, E. J., J. S. Park, M. Sena-Esteves, C. M. Kramm, M. Chase, J. T. Efird, M. X. Wei, X. O. Breakefield, and E. A. Chiocca. 1994. Long-term survival of rats harboring brain neoplasms treated with ganciclovir and a herpes simplex virus vector that retains an intact thymidine kinase gene. Cancer Res. 54:5745-5751.

6. Caruso, M., B. Salomon, S. Zhang, E. Brisson, F. Clavel, I. Lowy, and D. Klatzmann. 1995. Expression of a Tat-inducible herpes simplex virus-thymidine kinase gene protects acyclovir-treated CD4 cells from HIV-1 spread by conditional suicide and inhibition of reverse transcription. Virology 206:495-503.

7. Chatis, P. A., and C. S. Crumpacker. 1991. Analysis of the thymidine kinase gene from clinically isolated acyclovir-resistant herpes simplex viruses. Virology 180:793-797.

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

9. Clayton, C. E. 1999. Genetic manipulation of kinetoplastida. Parasitol. Today 15:372-378.

10. Coen, D. M. 1986. General aspects of virus drug resistance with special reference to herpes simplex virus. J. Antimicrob. Chemother. 18 Suppl B:1-10.

11. Coen, D. M., M. Kosz-Vnenchak, J. G. Jacobson, D. A. Leib, C. L. Bogard, P. A. Schaffer, K. L. Tyler, and D. M. Knipe. 1989. Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:4736-4740.

12. Darby, G., B. Larder, and M. Inglis. 1986. Evidence that the "active centre" of the herpes simplex virus thymidine kinase involves an interaction between three distinct regions of the polypeptide. J. Gen. Virol. 67:753-758.

13. Efstathiou, S., S. Kemp, G. Darby, and A. C. Minson. 1989. The role of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase in pathogenesis. J. Gen. Virol. 70:869-879.

14. Englund, J. A., M. E. Zimmerman, E. M. Swierkosz, J. L. Goodman, D. R. Scholl, and H. H. Balfour, Jr. 1990. Herpes simplex virus resistant to acyclovir. A study in a tertiary care center. Ann. Intern. Med. 112:416-422.

15. Erlich, K. S., J. Mills, P. Chatis, G. J. Mertz, D. F. Busch, S. E. Follansbee, R. M. Grant, and C. S. Crumpacker. 1989. Acyclovir-resistant herpes simplex virus infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. N. Engl. J. Med. 320:293-296.

16. Gaudreau, A., E. Hill, H. H. Balfour, Jr., A. Erice, and G. Boivin. 1998. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant herpes simplex viruses from immunocompromised patients. J. Infect. Dis. 178:297-303.

17. Hill, E. L., G. A. Hunter, and M. N. Ellis. 1991. In vitro and in vivo characterization of herpes simplex virus clinical isolates recovered from patients infected with human immunodeficiency virus. Antimicrob. Agents Chemother. 35:2322-2328.

18. Huber, B. E., C. A. Richards, and T. A. Krenitsky. 1991. Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: an innovative approach for cancer therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043.

19. Hwang, C. B., and H. J. Chen. 1995. An altered spectrum of herpes simplex virus mutations mediated by an antimutator DNA polymerase. Gene 152:191-193.

20. Kost, R. G., E. L. Hill, M. Tigges, and S. E. Straus. 1993. Brief report: recurrent acyclovir-resistant genital herpes in an immunocompetent patient. N. Engl. J. Med. 329:1777-1782.

21. Kudo, E., H. Shiota, T. Naito, K. Satake, and M. Itakura. 1998. Polymorphisms of thymidine kinase gene in herpes simplex virus type 1: analysis of clinical isolates from herpetic keratitis patients and laboratory strains. J. Med. Virol. 56:151-158.

22. Laban, A., J. F. Tobin, M. A. Curotto de Lafaille, and D. F. Wirth. 1990. Stable expression of the bacterial neo gene in Leishmania enriettii. Nature 343:572-574.

23. Larder, B. A., and G. Darby. 1984. Virus drug-resistance: mechanisms and consequences. Antiviral Res. 4:1-42.

24. Lee, N. Y., Y. Tang, M. J. Espy, C. P. Kolbert, P. N. Rys, P. S. Mitchell, S. P. Day, S. L. Henry, D. H. Persing, and T. F. Smith. 1999. Role of genotypic analysis of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus for determination of neurovirulence and resistance to acyclovir. J. Clin. Microbiol. 37:3171-3174.

25. Morfin, F., G. Souillet, K. Bilger, T. Ooka, M. Aymard, and D. Thouvenot. 2000. Genetic characterization of thymidine kinase from acyclovir-resistant and -susceptible herpes simplex virus type 1isolated from bone marrow transplant recipients. J. Infect. Dis. 182:290-293.

26. Muyombwe, A., M. Olivier, P. Harvie, M. G. Bergeron, M. Ouellette, and B. Papadopoulou. 1998. Protection against Leishmania major challenge infection in mice vaccinated with live recombinant parasites expressing a cytotoxic gene. J. Infect. Dis. 177:188-195.

27. Muyombwe, A., M. Olivier, M. Ouellette, and B. Papadopoulou. 1997. Selective killing of Leishmania amastigotes expressing a thymidine kinase suicide gene. Exp. Parasitol. 85:35-42.

28. Naesens, L., R. Snoeck, G. Andrei, J. Balzarini, J. Neyts, and E. De Clercq. 1997. HPMPC (cidofovir), PMEA (adefovir) and related acyclic nucleoside phosphonate analogues: a review of their pharmacology and clinical potential in the treatment of viral infections. Antivir. Chem. Chemother. 8:1-23.

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

30. Nugier, F., P. Collins, B. Larder, M. Langlois, M. Aymard, and G. Darby. 1991. Herpes simplex virus isolates from an immunocompromised patient who failed to respond to acyclovir treatment express thymidine kinase with altered substrate specificity. Antiviral Chem. Chemother. 2:295-302.

31. Palu, G., G. Gerna, F. Bevilacqua, and A. Marcello. 1992. A point mutation in the thymidine kinase gene is responsible for acyclovir-resistance in herpes simplex virus type 2 sequential isolates. Virus Res. 25:133-144.

32. Papadopoulou, B., G. Roy, W. Mourad, E. Leblanc, and M. Ouellette. 1994. Changes in folate and pterin metabolism after disruption of the Leishmania H locus short chain dehydrogenase gene. J. Biol. Chem. 269:7310-7315.

33. Papadopoulou, B., G. Roy, and M. Ouellette. 1994. Autonomous replication of bacterial DNA plasmid oligomers in Leishmania. Mol. Biochem. Parasitol. 65:39-49.

34. Papadopoulou, B., G. Roy, and M. Ouellette. 1992. A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of Leishmania. EMBO 11:3601-3608.

35. Rechtin, T. M., M. E. Black, F. Mao, M. L. Lewis, and R. R. Drake. 1995. Purification and photoaffinity labeling of herpes simplex virus type-1 thymidine kinase. J. Biol. Chem. 270:7055-7060.

36. Roizman, B., and A. E. Sears. 1996. Herpes simplex viruses and their replication., p. 2231-2296. *In* B. N. Fields and D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), Fields Virology, 3rd ed. Lippincott-Raven, PA.

37. Safrin, S., T. Assaykeen, S. Follansbee, and J. Mills. 1990. Foscarnet therapy for acyclovir-resistant mucocutaneous herpes simplex virus infection in 26 AIDS patients: preliminary data. J. Infect. Dis. 161:1078-1084.

38. Safrin, S., C. Crumpacker, P. Chatis, R. Davis, R. Hafner, J. Rush, H. A. Kessler, B. Landry, and J. Mills. 1991. A controlled trial comparing foscarnet with vidarabine for acyclovir- resistant mucocutaneous herpes simplex in the acquired immunodeficiency syndrome. N. Engl. J. Med. 325:551-555.

39. Safrin, S., S. Kemmerly, B. Plotkin, T. Smith, N. Weissbach, D. De Veranez, L. D. Phan, and D. Cohn. 1994. Foscarnet-resistant herpes simplex virus infection in patients with AIDS. J. Infect. Dis. 169:193-196.

40. Sahli, R., G. Andrei, C. Estrade, R. Snoeck, and P. R. Meylan. 2000. A rapid phenotypic assay for detection of acyclovir-resistant varicella-zoster virus with mutations in the thymidine kinase open reading frame. Antimicrob. Agents Chemother. 44:873-878.

41. Sasadeusz, J. J., F. Tufaro, S. Safrin, K. Schubert, M. M. Hubinette, P. K. Cheung, and S. L. Sacks. 1997. Homopolymer mutational hot spots mediate herpes simplex virus resistance to acyclovir. J. Virol. 71:3872-3878.

42. Schmit, I., and G. Boivin. 1999. Characterization of the DNA polymerase and thymidine kinase genes of herpes simplex virus isolates from AIDS patients in

whom acyclovir and foscarnet therapy sequentially failed. J. Infect. Dis. 180:487-90.

43. Takamiya, Y., M. P. Short, F. L. Moolten, C. Fleet, T. Mineta, X. O. Breakefield, and R. L. Martuza. 1993. An experimental model of retrovirus gene therapy for malignant brain tumors. J. Neurosurg. 79:104-110.

44. Tenser, R. B., K. A. Hay, and W. A. Edris. 1989. Latency-associated transcript but not reactivatable virus is present in sensory ganglion neurons after inoculation of thymidine kinase-negative mutants of herpes simplex virus type 1. J. Virol. 63:2861-2865.

45. White, T. C., F. Fase-Fowler, H. van Luenen, J. Calafat, and P. Borst. 1988. The H circles of Leishmania tarentolae are a unique amplifiable system of oligomeric DNAs associated with drug resistance. J. Biol. Chem. 263:16977-16983.

46. Wilcox, C. L., L. S. Crnic, and L. I. Pizer. 1992. Replication, latent infection, and reactivation in neuronal culture with a herpes simplex virus thymidine kinase-negative mutant. Virology 187:348-352.

Table 2-1. Phenotypic and genotypic analyses of HSV TK genes from 18 clinical isolates

Table 1. Phenotypic and genotypic analyses of HSV TK genes from 18 clinical isolates

Isolate	HSV type	Acyclovir IC_{50} (μM)	HSV TK mutation[a]	
			Nucleotide	Amino acid
1a	2	1,98	A232G	Asn78Asp
			T306C	Silent
			G420T	Leu140Phe
			T486C	Silent
1b	2	110	—	—
			Added G 432	**Stop 82 ds**
2a	2	4,4	T486C	Silent
2b	2	39,6	—	—
			Added G 436	**Stop 82 ds**
3a	1	3,65	T16G	Cys6Gly
			G122A	Arg41His
			C125T	Pro42Leu
			C171T	Silent
			A528G	Silent
			C575T	Ala192Val
			C672T	Silent
			G723A	Silent
			G751T	Gly251Cys
			G799T	Val267Leu
			C802A	Pro268Thr
			C858A	Asp286Glu
			T915C	Silent
			C1053T	Silent
			A1126C	Asn376His
3b	1	55,54	—	—
			A840G	Silent
			G1007A	**Cys336Tyr**
4a	1	2,49	T16G	Cys6Gly
			G122A	Arg41His
			C125T	Pro42Leu
			C171T	Silent
			A528G	Silent
			C575T	Ala192Val
			C672T	Silent
			G723A	Silent
			G751T	Gly251Lys
			G799T	Val267Leu
			C802A	Pro268Thr
			C858A	Asp286Glu
			T915C	Silent
			A1065C	Silent
4b	1	64,11	—	—
			C664T	**Arg222Cys**
5a	1	2,42	C125T	Pro42Leu
			C171T	Silent
			G266A	Arg89Gln
5b	1	9,9	—	—
			G163A	**Asp55Asn**
			G665A	**Arg222His**
6a	2	203,41	A232G	Asn78Asp
			T306C	Silent
			G420T	Leu140Phe
			Deleted C 463	**Stop 28 ds**
			T486C	Silent
6b	2	966,06	same as 6a	same as 6a
7	1	17,6	G102A	Silent
			C125T	Pro42Leu
			C171T	Silent
			G266A	Arg89Gln
			C513T	Silent
			C582T	Silent
			G719A	Gly240Glu
			Deleted A 1065	**Stop 375 ds**
8	2	118,8	A116G	Glu39Gly
			T306C	Silent
			T486C	Silent
			Deleted G 779	**Stop 263 ds**
9	2	122,32	**Deleted G 180**	**Stop 69 ds**
			A232G	Asn78Asp
			T306C	Silent
			T486C	Silent
10	2	62,57	T306C	Silent
			A391C	**Thr131Pro**
			T486C	Silent
11	1	26,75	C125T	Pro42Leu
			C171T	Silent
			G266A	Arg89Gln
			G527A	**Arg176Gln**
12	2	214,54	T306C	Silent
			T486C	Silent
			3G 175-177 3C	**Gly59Pro**

[a] — , Same mutation as in the susceptible strain isolated from the same patient. Mutations that could account for ACV resistance are indicated in bold.
ds, downstream.

Table 2-2. Susceptibility of HSV isolates to ACV and of TK-recombinant Leishmania to GCV

Table 2. Susceptibility of HSV isolates to ACV and of TK-recombinant *Leishmania* to GCV

Patient	HSV Type	TK mutation(s)[a]		IC_{50} (µM)	
		Nucleotide	Amino acid	HSV ACV[b]	*Leishmania* GCV
1a	2			1,98 (S)	68,16
1b	2	Added G 432	Stop 82 ds	110 (R)	>10000
2a	2			4,4 (S)	99,4
2b	2	Added G 439	Stop 82 ds	39,6 (R)	>10000
3a	1			3,65 (S)	23,16
3b	1	G1007A	Cys336Tyr	51,54 (R)	>10000
4a	1			2,49 (S)	60,6
4b	1	C664T	Arg222Cys	64,11 (R)	7993
5a	1			2,42 (S)	11,35
5b	1	G163A;G665A	Asp55Asn;Arg222His	9,9 (R)	>10000
6a	2	Deleted C 463	Stop 28 ds	203,41 (R)	>10000
6b	2	Deleted C 463	Stop 28 ds	966,06 (R)[b]	6391
7	1	Deleted A 1065	Stop 375 ds	17,6 (R)	9379
8	2	A116G;Deleted G 779	Glu39Gly;Stop 263 ds	118,80 (R)	9947
9	2	Deleted G 180	Stop 69 ds	122,32 (R)	9891
10	2	A391C	Thr131Pro	62,57 (R)	>10000
11	1	G 527A	Arg176Gln	26,75 (R)	>10000
12	2	3G 175-7 3C	Gly59Pro	214,54 (R)	>10000
MS2	2			3,52 (S)	55,91
KOS	1			2,2 (S)	17,19

[a]Only HSV TK-mutations (based on 333 or KOS sequences) that could account for resistance to ACV are indicated. ds: downstream.

[b](S), ACV-susceptible strain; (R), ACV-resistant strain.

[c]Presence of a DNA polymerase mutation (Asp912Val).

Table 2-3. Summary of non-silent TK mutations unrelated to ACV-resistance

Table 3. Summary of non-silent TK mutations unrelated to ACV-resistance

Nucleotide substitution	Amino acid substitution	Reference(s)
T16G	Cys6Gly	21, 25
G122A	Arg41His	
C125T	Pro42Leu	21, 25
A232G	Asn78Asp	20
G266A	Arg89Gln	21, 25
G420T	Leu140Phe	20, 24, 31
C575T	Ala192Val	24, 25
G719A	Gly240Glu	21, 25
G751T	Gly251Cys	25
G799T	Val267Leu	21, 25
C802A	Pro268Thr	21, 25
C858A	Asp286Glu	21, 25
A1126C	Asn376Pro/His	21, 25

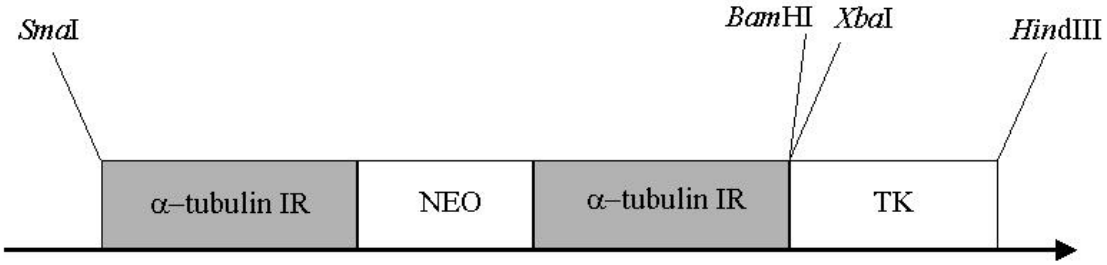

Figure 8 : **Figure 1**. Schematic representation of the Leishmania expression vector pSPαNEOαTK.

The HSV TK and the phosphotransferase neomycine (NEO) genes are under the control of the intergenic region (IR) of the Leishmania enrietti α-tubulin gene [22] represented by the grey boxes. Intergenic regions are important for transcript maturation by trans-splicing and polyadenylation in the parasite *Leishmania* [9]. The arrow indicates the orientation of transcription for the NEO and TK genes.

3 CHAPITRE III :ISOLATS CLINIQUES DE VIRUS HERPÈS SIMPLEX AYANT UNE SENSIBILITÉ RÉDUITE À L'ADÉFOVIR, SÉLECTIONNÉS SUITE À UNE THÉRAPIE AU FOSCARNET

Ce chapitre reproduit le texte intégral d'un article intitulé *Herpes simplex virus isolates with reduced adefovir susceptibility selected in vivo by foscarnet therapy* par **Julie Bestman-Smith** et Guy Boivin. Cet article a été publié dans la *revue Journal of Medical Virology* vol. 67, No 1 (2002) p. 88-91.

CONTRIBUTION DES AUTEURS :

Julie Bestman-Smith

- Analyse génotypique et phénotypique des isolats cliniques
- Rédaction de l'article scientifique

Dr Guy Bovin

- Supervision du projet de recherche
- Coordination et correction de la rédaction

3.1 Résumé

Des souches cliniques de virus herpès simplex (VHS) isolées de patients atteints du SIDA et recevant une thérapie au foscarnet ont été évaluées pour leur sensibilité envers l'adéfovir. Les souches résistantes au foscarnet comprenant des mutations au sein du gène de l'ADN polymérase viral dans les régions conservées II, VI et entre les régions I et VII ont également démontrées une diminution significative de leur sensibilité envers l'adéfovir (diminution moyenne des CI_{50} de 4,6 fois en comparaison à des souches de type sauvage obtenues avant le traitement au foscarnet). Ces résultats suggèrent donc que des souches de VHS résistantes à l'adéfovir peuvent être sélectionnées *in vivo* avec une thérapie au foscarnet.

3.2 Abstract

Sequential herpes simplex virus (HSV) isolates from AIDS patients receiving foscarnet therapy were evaluated for their susceptibility to adefovir. Foscarnet-resistant isolates with DNA polymerase mutations in regions II, VI, and between I and VII were also associated with an important decrease in susceptibility to adefovir (mean IC_{50} increase: 4.6-fold compared to pre-foscarnet or wild-type isolates) suggesting that adefovir-resistant HSV could be selected *in vivo* by foscarnet therapy.

3.3 Brief report

Foscarnet, a pyrophosphate analogue that inhibits directly the herpes simplex virus (HSV) DNA polymerase (pol), is the primary alternative treatment for immunocompromised patients with suspected or confirmed acyclovir-resistant HSV infections [Safrin et al., 1991]. However, a significant level of toxicity may occur following prolonged intravenous foscarnet therapy. Furthermore, a few laboratory-derived and clinical HSV strains containing mutations within the conserved regions of the viral DNA pol gene have been associated with a resistant phenotype to both pyrophosphate analogues and acyclovir [Gibbs et al., 1988; Collins et al., 1989; Hwang et al., 1992]. Thus, development of new anti-HSV agents with different mechanisms of action is of high interest. Acyclic nucleoside phosphonates (ANP), such as cidofovir (HPMPC) and adefovir (PMEA), were shown to inhibit the replication of HSV *in vitro* [Hitchcock et al., 1996; Naesens et al., 1997]. In contrast to acyclovir but similar to foscarnet, ANP derivatives do not require a virally-dependent phosphorylation step [Merta et al., 1990] with the potential to inhibit most acyclovir-resistant isolates containing thymidine kinase (TK) mutations. In fact, intravenous as well as topical cidofovir were shown to be useful in the treatment of acyclovir- and foscarnet-resistant mucocutaneous HSV lesions [Snoeck et al., 1993; Lalezari et al., 1994; Snoeck et al., 1994; Lalezari et al., 1997; LoPresti et al., 1998]. However, laboratory-derived HSV strains resistant to ANP derivatives have also been reported [Vonka et al., 1990; Foster et al., 1991; Andrei et al., 1995; Andrei et al., 1997; Andrei et al., 2000].

We identified previously DNA pol mutations that were associated with resistance to foscarnet in clinical HSV isolates recovered from HIV-infected subjects [Schmit and Boivin, 1999]. We now report on susceptibility patterns to adefovir induced by viral DNA pol mutations from the same clinical isolates.

Fourteen HSV (*Herpesviridae* family, *Alphaherpesvirinae* subfamily, and *Simplexvirus* genus) clinical isolates recovered from seven AIDS patients who sequentially failed acyclovir and foscarnet therapy were used in this study. Viral susceptibility of those isolates to acyclovir, foscarnet and cidofovir has been previously reported by our group [Schmit and

Boivin, 1999]. Susceptibility testing for the latter drugs and adefovir were evaluated using a plaque reduction assay [Safrin et al., 1994]. Ten wild type (wt) (five HSV 1 and five HSV 2) isolates from untreated immunocompetent subjects, and two control strains (MS2 and KOS) were also tested for their susceptibility to the different antivirals. Acyclovir resistance was defined by an $IC_{50} \geq 2$ µg/ml [Safrin et al., 1994] whereas foscarnet resistance was defined by an $IC_{50} \geq 100$ µg/ml or a 3-fold increase compared to a pretherapy isolate [Schmit and Boivin, 1999]. No cutoffs have been proposed for HSV resistance to ANP derivatives.

For the first five patients (1 to 5), sequential isolates (pre- and post-foscarnet therapy) were available. For two patients (6 and 7), only post-foscarnet isolates were obtained. Clinical histories of the patients as well as genotypic characterization of the HSV strains have been previously reported [Schmit and Boivin, 1999]. Table I summarizes the mean IC_{50} values (from three different experiments) to acyclovir, foscarnet, cidofovir, and adefovir for all isolates. Interestingly, wt HSV 1 isolates were more susceptible to adefovir (by a factor of 2.0) and, as previously reported [Schmit and Boivin, 1999], to cidofovir (by a factor of 5.2) than wt HSV 2 strains. Foscarnet-resistant isolates were generally less susceptible to adefovir as demonstrated by a mean adefovir IC_{50} increase of 4.6 (range: 1.2 to 8.6) when compared to pre-foscarnet isolates from the same patients or type-specific wt strains. Only the foscarnet-resistant isolate from patient 6 was definitively still susceptible to adefovir (1.2-fold adefovir IC_{50} increase) whereas the post-foscarnet isolate from patient 4 was associated with a modest decrease in adefovir susceptibility (2-fold IC_{50} increase). On the other hand, susceptibility of foscarnet-resistant isolates to cidofovir was generally unchanged although one isolate from patient 1 had a 2.7-fold increase in cidofovir IC_{50} value compared with its foscarnet-susceptible counterpart. The specific point mutations within the viral DNA pol gene of foscarnet-resistant HSV isolates [Schmit and Boivin, 1999] and the resulting drug phenotypes are summarized in table I.

ANP compounds are characterized by their long intracellular half-life allowing infrequent dosing and by their large spectrum of antiviral activity [Naesens et al., 1997]. Such features are particularly interesting when treating immunocompromised patients with several concomitant opportunistic viral infections. Moreover, an oral prodrug of adefovir (adefovir

dipivoxil) has been developed and is currently in phase III trial for hepatitis B virus infections [Naesens et al., 1997]. Although not approved in that indication, ANP derivatives such as cidofovir and adefovir also exert important antiviral activity against HSV 1 and 2 [Hitchcock et al., 1996; Naesens et al., 1997]. However, resistance to ANP derivatives may occur following selection of HSV DNA pol mutants in the laboratory [Vonka et al., 1990; Foster et al., 1991; Andrei et al., 1997; Andrei et al., 2000]. Characterization of drug-resistant viruses and determination of their patterns of cross-resistance may be useful to clarify the selective mechanism of action for new drugs and may facilitate the management of drug-resistant HSV infections in the clinic. In this study, the susceptibility profiles of several clinical acyclovir- and/or foscarnet-resistant HSV isolates to adefovir were evaluated. The main conclusion of our study is the almost complete correlation between foscarnet resistance and decrease susceptibility to adefovir whereas most foscarnet-resistant strains retained susceptibility to cidofovir as previously reported in a few laboratory-derived HSV 1 and 2 strains and recombinant human cytomegalovirus (HCMV) strains [Andrei et al., 1997; Cihlar et al., 1998; Andrei et al., 2000]. Our foscarnet-resistant clinical isolates expressed susceptibility or, at the most, borderline degree of resistance to acyclovir (defined by $IC_{50} \geq 2$ µg/ml [Safrin et al., 1994]). The only isolate with high level resistance to acyclovir (patient 5) also contained a TK mutation [Schmit and Boivin, 1999].

Each foscarnet-resistant virus from this study contained one or two nucleotide substitutions within the conserved regions II, III, VI, and between regions I and VII of the HSV DNA pol gene [Schmit and Boivin, 1999]. Mutations in regions II, VI, and between I and VII were also associated with a valuable decrease in adefovir susceptibility. However, one mutation at position 850 within conserved region III of an HSV-2 isolate (patient 6) was associated with a foscarnet-resistant/adefovir-susceptible phenotype, suggesting that these two antivirals may not interact exactly at the same sites on the HSV DNA pol. However, further experiments using recombinant viruses are needed to confirm this observation. Cihlar et *al*., have reported that mutations within region III of the HCMV DNA pol gene were associated with various resistant/hypersusceptible drug profiles [Cihlar et al., 1998].

Finally, this study did not allow the identification of mutations associated with a significant decrease in susceptibility to cidofovir. The post-foscarnet isolate of patient 1 had a

moderate (2.7-fold) increase in cidofovir IC_{50} value when compared to the pre-foscarnet strain. However, since this pre-foscarnet isolate also contained a TK mutation, the relevance of this observation is difficult to interpret. Indeed, HSV mutants with deficient or altered TK activity have been reported to be more susceptible to cidofovir in tissue culture than parental strains, probably due to a decreased dCTP pool in infected cells [Mendel et al., 1995]. On the other hand, adefovir-resistant isolates have been shown to be more susceptible to HPMPA (a close analogue of cidofovir) [Vonka et al., 1990; Foster et al., 1991]. All pre-foscarnet isolates from this study contained a TK mutation responsible for acyclovir resistance [Schmit and Boivin, 1999] and these isolates were indeed found to be slightly more susceptible to cidofovir than wt isolates by a factor of 1.8. Moreover, foscarnet- and adefovir-resistant isolates were generally more susceptible to cidofovir than wt isolates by a factor of 2.2. The availability of wt TK-competent and post-treatment strains isolated from the same patients will thus be important to evaluate more precisely the patterns of resistance to cidofovir. DNA pol mutations within the δ-region C and conserved region II of laboratory-derived HSV 1 strains [Andrei et al., 2000], and within the δ-region C, and the conserved regions IV and V of recombinant HCMV isolates have been associated with resistance to cidofovir [Cihlar et al., 1998].

To our knowledge, this is the first report in which clinical HSV 1 and 2 isolates resistant to foscarnet were evaluated for their susceptibility to adefovir. Our results demonstrate that most foscarnet-resistant clinical HSV isolates are also associated with a remarkable decrease in adefovir susceptibility. Whether such *in vitro* resistance data would correlate with clinical failure to adefovir is currently unknown. Cidofovir-resistant HSV isolates were not selected in our patients receiving prolonged therapy with acyclovir and foscarnet. Similarly, most DNA pol mutations arising from foscarnet therapy in this study did not confer resistance to acyclovir with the possible exception of DNA pol mutations located in conserved region II. In conclusion, adefovir would not constitute a valuable alternative treatment for immunocompromised patients developing HSV infections resistant to foscarnet therapy.

3.4 Acknowledgments

This work was supported by grants from “Le Fond de la Recherche en Santé du Québec” and Glaxo Wellcome Canada to Guy Boivin. J.B.-S. holds a student fellowship from the Canadian Institutes of Health Research.

3.5 References

Andrei G, Snoeck R, De Clercq E. 1995. Susceptibilities of several drug-resistant herpes simplex virus type 1 strains to alternative antiviral compounds. Antimicrob Agents Chemother 39:1632-1635.

Andrei G, Snoeck R, De Clercq E. 1997. Differential susceptibility of several drug-resistant strains of herpes simplex virus type 2 to various antiviral compounds. Antivir Chem Chemother 8:457-461.

Andrei G, Snoeck R, De Clercq E, Esnouf R, Fiten P, Opdenakker G. 2000. Resistance of herpes simplex virus type 1 against different phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purines and pyrimidines due to specific mutations in the viral DNA polymerase gene. J Gen Virol 81:639-648.

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

Collins P, Larder BA, Oliver NM, Kemp S, Smith IW, Darby G. 1989. Characterization of a DNA polymerase mutant of herpes simplex virus from a severely immunocompromised patient receiving acyclovir. J Gen Virol 70:375-382.

Foster SA, Cerny J, Cheng YC. 1991. Herpes simplex virus-specified DNA polymerase is the target for the antiviral action of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine. J Biol Chem 266:238-244.

Gibbs JS, Chiou HC, Bastow KF, Cheng YC, Coen DM. 1988. Identification of amino acids in herpes simplex virus DNA polymerase involved in substrate and drug recognition. Proc Natl Acad Sci USA 85:6672-6676.

Hitchcock MJM, Jaffe HS, Martin JC, Stagg RJ. 1996. Cidofovir, a new agent with potenet anti-herpesvirus activity. Antivir Chem Chemother 7:115-127.

Hwang CB, Ruffner KL, Coen DM. 1992. A point mutation within a distinct conserved region of the herpes simplex virus DNA polymerase gene confers drug resistance. J Virol 66:1774-1776.

Lalezari JP, Drew WL, Glutzer E, Miner D, Safrin S, Owen WF, Jr., Davidson JM, Fisher PE, Jaffe HS. 1994. Treatment with intravenous (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]-cytosine of acyclovir-resistant mucocutaneous infection with herpes simplex virus in a patient with AIDS. J Infect Dis 170:570-572.

Lalezari J, Schacker T, Feinberg J, Gathe J, Lee S, Cheung T, Kramer F, Kessler H, Corey L, Drew WL, Boggs J, McGuire B, Jaffe HS, Safrin S. 1997. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of cidofovir gel for the treatment of acyclovir-unresponsive mucocutaneous herpes simplex virus infection in patients with AIDS. J Infect Dis 176:892-898.

LoPresti AE, Levine JF, Munk GB, Tai CY, Mendel DB. 1998. Successful treatment of an acyclovir- and foscarnet-resistant herpes simplex virus type 1 lesion with intravenous cidofovir. Clin Infect Dis 26:512-513.

Mendel DB, Barkhimer DB, Chen MS. 1995. Biochemical basis for increased susceptibility to cidofovir of herpes simplex viruses with altered or deficient thymidine kinase activity. Antimicrob Agents Chemother 39:2120-2122.

Merta A, Vesely J, Votruba I, Rosenberg I, Holy A. 1990. Phosphorylation of acyclic nucleotide analogs HPMPA and PMEA in L1210 mouse leukemia cell extracts. Neoplasma 37:111-120.

Naesens L, Snoeck R, Andrei G, Balzarini J, Neyts J, De Clercq E. 1997. HPMPC (cidofovir), PMEA (adefovir) and related acyclic nucleoside phosphonate analogues: a review of their pharmacology and clinical potential in the treatment of viral infections. Antivir Chem Chemother 8:1-23.

Safrin S, Crumpacker C, Chatis P, Davis R, Hafner R, Rush J, Kessler HA, Landry B, Mills J. 1991. A controlled trial comparing foscarnet with vidarabine for acyclovir- resistant

mucocutaneous herpes simplex in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 325:551-555.

Safrin S, Kemmerly S, Plotkin B, Smith T, Weissbach N, De Veranez D, Phan LD, Cohn D. 1994. Foscarnet-resistant herpes simplex virus infection in patients with AIDS. J Infect Dis 169:193-196.

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

Snoeck R, Andrei G, De Clercq E, Gerard M, Clumeck N, Tricot G, Sadzot-Delvaux C. 1993. A new topical treatment for resistant herpes simplex infections. N Engl J Med 329:968-969.

Snoeck R, Andrei G, Gerard M, Silverman A, Hedderman A, Balzarini J, Sadzot-Delvaux C, Tricot G, Clumeck N, De Clercq E. 1994. Successful treatment of progressive mucocutaneous infection due to acyclovir- and foscarnet-resistant herpes simplex virus with (S)-1-(3- hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine (HPMPC). Clin Infect Dis 18:570-578.

Vonka V, Anisimova E, Cerny J, Holy A, Rosenberg I, Votruba I. 1990. Properties of a 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA)-resistant herpes simplex virus type 1 virus mutant. Antiviral Res 14:117-121.

Table 3-1. Phenotypic and genotypic caracterization of clinical herpes simplex viruses to acyclovir, foscarnet, adefovir, and cidofovir

Table I. Phenotypic and genotypic caracterization of clinical herpes simplex viruses to acyclovir, foscarnet, adefovir, and cidofovir.

Patients/	DNA pol mutation[a]		DNA pol	acyclovir IC_{50}[b]	foscarnet IC_{50}[b]		cidofovir IC_{50}[b]		adefovir IC_{50}	
Isolates	Nucleotide	amino-acid	conserved region	(µg/ml)	(µg/ml)	Ratio[c]	(µg/ml)	Ratio[c]	(µg/ml)	Ratio[c]
1 (pre-FOS)[d]	——			40.2	21.4		3.9		9.5	
1 (post-FOS)	C2347A	L783M	VI	0.5	163.2	7.6	10.5	2.7	30.8	3.2
2 (pre-FOS)[d]	——			29.6	23.1		1.8		6.8	
2 (post-FOS)	G2170A	A724T	II	0.6	72.3	3.1	1.8	1.0	22.2	3.3
3 (pre-FOS)[d]	——			44.3	43.1		4.9		12.5	
3 (post-FOS)	G2186A	S729N	II	1.9	136.7	3.2	8.0	1.6	50.9	4.1
4 (pre-FOS)[d]	——			9.1	21.8		11.6		9.3	
4 (post-FOS)	G2353A	D785N	VI	1.0	85.1	3.9	3.9	0.3	18.9	2.0
5 (pre-FOS)[d]	——			57.0	32.6		2.3		5.1	
5 (post-FOS)[d]	A2735T	D912V	between I-VII	219.6	125.8	3.9	1.2	0.5	19.2	3.8
6 (post-FOS)	C2548A	L850I	III	0.6	211.8	9.2	1.6	0.3	13.4	1.2
7 (post-FOS)[e]	*In the 3 strains*:			1.0	75.7	3.7	0.6	0.5	45.0	7.9
7 (post-FOS)[e]	G2171A	S724N	II	1.5	80.8	3.9	0.6	0.5	40.5	7.1
7 (post-FOS)[e]	C2758T	P920S	between I-VII	1.8	63.3	3.1	0.6	0.5	49.1	8.6
KOS reference	——			0.7 ± 0.2	27.1 ± 5.6		2.6 ± 1.3		6.9 ± 1.3	
HSV 1 wt[f]	——			0.5	20.6		1.1		5.7	
MS2 reference	——			0.8 ± 0.1	38.6 ± 4.1		4.2 ± 2.2		17.2 ± 5.5	
HSV 2 wt[f]	——			0.8	23.0		5.7		11.6	

NOTE. FOS: foscarnet, wt: wild-type.

[a]Genotypic change compared to pre-FOS isolate from same patient or, when unavailable, to reference strains (KOS and 186) from Gen Bank.

[b]Data from previous study [Schmit and Boivin, 1999]. Note that IC_{50} values for cidofovir in the previous study were reported in µM and that some IC_{50} values may slightly differ due to repetitions of experiments.

[c]IC_{50} values of post-foscarnet isolates over pre-foscarnet isolates from same patients (when available) or over type-specific wt strains from immunocompetent subjects.

[d]Presence of a TK mutation [Schmit and Boivin, 1999].

[e]Herpes simplex virus 1 strains.

[f]Mean IC_{50} results of 5 wt isolates from immunocompetent subjects.

4 CHAPITRE IV :PROFIL DE RÉSISTANCE AUX ANTIVIRAUX CHEZ DES VIRUS HERPÈS SIMPLEX GÉNÉRÉS PAR UN SYSTÈME DE COSMIDES ET DE PLASMIDES RECOMBINANTS ET POSSÉDANT DES MUTATIONS AU SEIN DU GÈNE DE L'ADN POLYMÉRASE

Ce chapitre reproduit le texte intégral d'un article intitulé *Drug resistance patterns of recombinant herpes simplex virus DNA polymerase mutants generated with a set of overlapping cosmids and plasmids* par **Julie Bestman-Smith** et Guy Boivin. Cet article a été publié dans la revue *Journal of Virology* Vol. 77, No. 14 (2003), p. 7820-7829.

CONTRIBUTION DES AUTEURS :

Julie Bestman-Smith

- Mise au point de la méthode présentée
- Analyse génotypique et phénotypique des mutants recombinants
- Rédaction de l'article scientifique

Dr Guy Bovin

- Supervision du projet de recherche
- Coordination et correction de la rédaction

4.1 Résumé

Des mutations au sein du gène de l'ADN polymérase (pol) du virus de l'herpès simplex (VHS) peuvent mener à la résistance du virus à tous les antiviraux présentement disponibles pour le traitement du VHS. D'un autre côté, la distinction entre les mutations responsables de la résistance aux antiviraux de celles faisant simplement partie du polymorphisme viral est difficile à évaluer avec les méthodes actuelles. Un nouveau système basé sur la transfection de cosmides et de plasmides permettant de générer rapidement des VHS recombinants de type 1 (VHS-1) et qui comportent des mutations dans le gène de l'ADN pol a été mis au point. À l'aide d'une telle approche, vingt VHS-1 recombinants contenant une ou plusieurs mutations au sein du gène de l'ADN pol ont été construits et leur sensibilité à l'acyclovir (ACV), au foscarnet (FOS), au cidofovir (CDV) et à l'adéfovir (ADV) ont été évalués. Les mutations introduites dans les régions conservées II (A719T, S724N), VI (L778M, D780N, L782I) et I (F891C) ont entraîné une résistance croisée à l'ACV, au FOS et à l'ADV, et deux de ces mutations (S724N, L778M) ont également conféré une réduction significative de la sensibilité des virus recombinants au CDV. Le mutant F891C a été associé au plus haut niveau de résistance à l'ACV et au FOS et les capacités réplicatives de ce mutant furent fortement diminuées. Une mutation (D907V) située hors des régions conservées fut également associée à ce phénotype (résistance à l'ACV au FOS et à l'ADV). Certaines mutations (K522E, Y577H) comprises dans la région δ-C furent létales alors que d'autres (P561S, V573M) n'ont pu conférer de résistance aux antiviraux testés. Les virus recombinants comprenant des mutations dans les régions conservées V (N961K) et VII (Y941H) ont démontré des niveaux de résistance à l'ACV, mais une sensibilité au FOS. Finalement, les mutations dans la région conservée III ont été associées à divers profils de sensibilité aux différents antiviraux. Ce nouveau système permet une évaluation rapide et efficace du rôle fonctionnel de plusieurs mutations dans le gène de l'ADN pol du VHS, ce qui permettra certainement de faciliter le traitement des infections engendrées par des VHS résistants aux antiviraux.

4.2 Abstract

Herpes simplex virus (HSV) DNA polymerase (pol) mutations can confer resistance to all currently-available anti-herpetic drugs. However, discrimination between mutations responsible for drug resistance and those part of viral polymorphism can be difficult with current methodologies. A new system is reported for rapid generation of recombinant HSV type 1 (HSV-1) DNA pol mutants based on transfection of a set of overlapping viral cosmids and plasmids. Using this approach, twenty HSV-1 recombinants with single or dual mutations within the DNA pol gene were successfully generated and subsequently evaluated for their susceptibility to acyclovir (ACV), foscarnet (FOS), cidofovir (CDV), and adefovir (ADV). Mutations within DNA pol conserved regions II (A719T, S724N), VI (L778M, D780N, L782I), and I (F891C) were shown to induce cross-resistance to ACV, FOS, and ADV with two of these mutations (S724N, L778M) also conferring significant reduction in CDV susceptibility. Mutant F891C was associated with the highest levels of resistance towards ACV and FOS, and was strongly impaired in its replication capacity. One mutation (D907V) lying outside of the conserved regions was also associated with this ACV/FOS/ADV-resistant phenotype. Some mutations (K522E, Y577H) within the δ-region C were lethal whereas others (P561S, V573M) induced no resistance to any of the drugs tested. Recombinants harboring mutations within conserved regions V (N961K) and VII (Y941H) were resistant to ACV but susceptible to FOS. Finally, mutations within conserved region III were associated with various susceptibility profiles. This new system allows a rapid and accurate evaluation of the functional role of various DNA pol mutations, which should translate into improved management of drug-resistant HSV infections.

4.3 Introduction

Two categories of antivirals are available for the management of herpes simplex virus (HSV) infections. The first class of agents includes molecules that, following viral and/or cellular phosphorylation, compete with natural dNTPs for incorporation into the elongating viral DNA chain. Acyclovir (ACV) and penciclovir with their respective pro-drugs, valacyclovir and famciclovir, are representative agents of this class and are considered the standard therapy for HSV infections. Although not indicated for the treatment of HSV infections, cidofovir (HPMPC, CDV) and adefovir (PMEA, ADV) are acyclic nucleoside phosphonate (ANP) derivatives that, once activated, are also alternative substrates for the viral DNA pol. The other class of HSV inhibitors consists of pyrophosphate analogues such as foscarnet (FOS). These agents are direct non-competitive inhibitors of the viral DNA pol. A single DNA pol mutation could thus confer resistance to more than one antiviral depending on the specific drug binding site on the enzyme.

Resistance to ACV, the most widely-used anti-HSV agent, is mainly due to mutations in the viral thymidine kinase (TK) gene which impairs the initial drug phosphorylation (24). Although less frequently encountered, ACV- and/or FOS-resistant clinical isolates containing DNA pol mutations have been reported following prolonged therapy with these agents (10, 16, 40, 42, 44). HSV DNA pol mutations leading to CDV resistance have also been found in laboratory-derived strains (2, 3), although not yet identified in clinical isolates from patients failing therapy. Moreover, our group has previously reported the emergence of HSV DNA pol mutations associated with a reduction in both FOS and ADV susceptibility in patients receiving FOS therapy (7).

The putative catalytic domain of the HSV DNA pol enzyme contains eight conserved regions designated I to VII along with δ-region C (9, 28, 48). These regions share significant amino acid sequence homology with all other herpesvirus DNA pol enzymes. Drug resistance mutations have been found mainly within such conserved regions of the HSV DNA pol gene with regions II and III containing the greatest clusters of mutations (reviewed in (24)). The δ-region C, which is common to cellular DNA polymerases δ (48), is part of the 3'-5' exonuclease editing domain of the enzyme. When not lethal, some

mutations within this region have been shown to confer resistance to pyrophosphate analogues (23, 30, 34, 35). Only a few drug-resistant mutations have been described within the other conserved regions or outside such regions (2, 7, 19, 23, 28, 37, 44). Because of the reported viral polymorphism (12, 33), the role of any DNA pol mutation must be carefully assessed. Marker-transfer experiments, in which a specific mutation is transferred to a wild-type (wt) virus background by homologous recombination, have been used to generate recombinant HSV DNA pol mutants (11, 28, 29, 36, 37, 40). In addition to being fastidious and inefficient, such methods rely on selection of recombinant mutants through drug pressure which may frequently lead to additional undesired mutations.

Cihlar et al. have elegantly demonstrated the possibility of using a system of overlapping cosmids and plasmids to generate recombinant human cytomegalovirus (HCMV) strains with specific DNA pol mutations (13). Although not specifically designed for site-directed mutagenesis experiments in the DNA pol gene, a similar system has been reported for HSV-1 by Cunningham et al. (17). Herein, we report a modification of the previous cosmid-based recombination system aimed at generating specific HSV-1 DNA pol mutants. Such approach was used to evaluate the drug susceptibility phenotype and replicative capacities of several HSV-1 DNA pol mutants.

4.4 Materials and Methods

Cells and viruses. Vero cells were maintained in Eagle's minimum essential medium supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics. HSV-1 laboratory strain 17 and all recombinant viruses were propagated in Vero cells.

DNA constructs. The set of five overlapping DNA cosmids containing the entire genome of strain 17 was kindly donated by Dr Charles Cunningham, Institute of Virology, United Kingdom (17). The original viral fragment of cosmid 71, corresponding to nucleotides (nt) 40966 to 77049, was replaced by 3 viral plasmids (pNEB23, pPol6, and pNEB10) as shown in Figure 1A. Briefly, a viral fragment corresponding to nt 61377 to 67549 encompassing the entire HSV DNA pol gene (UL30; nt 62807 to 66514) was cloned into the pBluescript II vector (Stratagene) to generate pPol6. This DNA fragment was amplified from cosmid 71 using primers 5'-CAA<u>TCTAGA</u>GGTAAATTTCTCCCCGA-3' (forward) and 5'-

CAAAAGCTTTGGCCTGCGGGAACGAGTT-3' (reverse), containing respectively an *Xba*I and *Hin*dIII restriction site (underlined). The purified *Xba*I/*Hin*dIII-digested PCR product was then cloned into the *Xba*I/*Hin*dIII sites of the pBluescript vector as illustrated on Figure 1B and the exact sequence of the catalytic domain of the DNA pol gene was verified. Plasmids pNEB23 and pNEB10 were generated by cloning DNA fragments (nt 40966 to 64392 and nt 66661 to 77049, respectively) from *Pac*I/*Psi*I-and *Pac*I/*Kpn*I-digested cosmid 71 products into the *Pac*I-*Sma*I and *Pac*I-*Kpn*I sites of pNEB 193 (New England Biolabs) (Figure 1B).

Site-directed mutagenesis of the DNA pol gene. Mutagenesis was performed using the QuickChange™ Site-Directed mutagenesis kit (Stratagene), according to the manufacturer's instructions. Plasmid pPol6 was used as template for all mutagenesis experiments. Each mutation was introduced by using a specific pair of mutagenic primers ranging in length from 28 to 40 bp. The correct nucelotide sequence of the catalytic domain of the DNA pol gene from each mutated plasmid was verified by sequence analysis and compared to reference strain 17.

Generation of DNA pol mutants. Inserts from cosmids 24, 32, 48, and 51 were released by digestion with *Pac*I (17). Inserts from plasmids pPol6, pNEB23, and pNEB10, were released by digestion with *Xba*I/*Hin*dIII, *Pac*I/*Ssp*I, and *Pac*I/*Kpn*I, respectively. All enzymes were inactivated and the seven overlapping DNA fragments were cotransfected in 6-well plates containing Vero cells using Lipofectamine™ 2000 (Life technologies) according to the manufacturer's instructions. Viral cytopathic effects were usually observed within a three-day incubation period. The catalytic domain of the DNA pol gene from each recombinant was amplified and verified by DNA sequencing.

Structural analysis of viral genomes. Extracellular virions were collected from 18 ml of culture medium by centrifugation at 100 000 X g for 120 min. The virus pellets were resuspended in 0,5 ml of TNE-sodium dodecyl sulfate (SDS) buffer (10 mM Tris-HCL [pH 8.0], 100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS), and incubated overnight with 0,2 mg of proteinase K at 56°C with moderate agitation. DNA was extracted twice with phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1) and once with chloroform-isoamylalcohol (24:1), precipitated with ethanol, and resuspended in H_2O. The genomic structure of recombinant

HSV-1 strains was determined by digestion of purified extracellular recombinant virus with *Kpn*I and separation on an 0.5% agarose gel. Viral DNA was then transferred onto Hybond-N+ membranes (Amersham) and probed with the various cosmids labelled by the ECL direct nucleic acid labelling system (Amersham) according to the manufacturer's instructions.

Antiviral susceptibility assays. Susceptibility to ACV, FOS, CDV (gift from Gilead), and ADV (gift from Gilead) was determined by a plaque reduction assay (PRA) on Vero cells (42). The mean 50% inhibitory concentration (IC_{50}) value for each mutant virus was determined by testing in duplicate each of two independently-generated recombinants. A 2-fold difference in IC_{50} values compared to the wt recombinant virus was considered significant as previously reported (13). In the case of ACV, this difference is about the same as the one between the established cut-off value for resistance (2 µg/ml) and the mean IC_{50} value of susceptible clinical isolates (41, 42).

***In vitro* single-cycle replication experiments.** The replication capacity of selected DNA pol mutants was compared to the wt recombinant virus by assessing the yield of extracellular virus production after infection of Vero cells at a high multiplicity of infection (m.o.i.) (20, 29). On the day of infection, cells were infected with each recombinant at a m.o.i. of 5, then 200 µl of supernatant were collected at specific times post-infection ranging from 2 to 144 h. Supernatants were stored at -80°C before titration in 24-well plates.

4.5 Results

Efficiency of DNA recombination between cosmid and plasmid inserts. Cotransfection into Vero cells of digested cosmids and plasmids generated infectious recombinant viruses with typical cytopathic effects usually observed within 3 days. The genomic structure of the recombinant viruses was verified by performing Southern blot analysis of *Kpn*I-digested purified genomes using independent cosmids as hybridization probes. Figure 2 shows representative results with three different probes. Overall, Southern blot analysis of the recombinants revealed no structural differences compared to the genome of the parental HSV-1 strain 17.

Susceptibility of HSV recombinants to antivirals. A total of twenty DNA pol mutants were evaluated in this study by generating two independent recombinants for each specific mutation. Those mutations were selected on the basis of their presence within clinical HSV isolates reported by our group (7, 44) and others (28), or within laboratory-derived HSV strains (2, 23, 29, 30, 33, 35, 37). Furthermore, a few HSV-1 DNA pol mutants were generated based on similar mutations within the HCMV DNA pol gene (5, 6, 13, 32, 45). Each recombinant was tested at least twice for its susceptibility to four antivirals (ACV, FOS, CDV, and ADV) by using the PRA (Table 1). On all occasions, the two generated recombinant viruses harboring the same mutation had similar IC_{50} values for all antivirals.

Effect of specific mutations within conserved regions of the viral DNA pol gene. When not lethal, some of the previously-reported HSV mutations in δ-region C have been associated with resistance to pyrophosphate analogues (23, 30, 34), whereas other mutations within the same region of the HCMV DNA pol have been associated with resistance to ganciclovir (GCV) and CDV (13, 21, 31, 45). In this study, we were able to evaluate two recombinants (P561S and V573M) within this region, whereas mutants K552E and Y577H could not be generated. The former mutants were susceptible to all antivirals, although a slight increase in ACV IC_{50} values was observed for mutant V573M (mean increase: 1,90-fold). Recombinant P561S demonstrated a marked increase in ADV susceptibility compared to the wt virus (mean IC_{50} decrease: 4,76-fold).

Mutations located in conserved region II of the HSV DNA pol gene are frequently associated with resistance to ACV and pyrophosphate analogues (2, 23, 35, 43). Two (A719T and S724N) of the four mutations located within this region conferred a similar phenotype and were also associated with ADV resistance. In addition, a significant decrease in CDV susceptibility was noted for these mutants. Mutation V715M led to significant and almost significant (1,8-fold) decreased levels of susceptibility to ACV and ADV, respectively, whereas it was associated with susceptibility to FOS and hypersusceptibility to CDV (mean IC_{50} decrease: 2,86-fold). The mutant R700M remained susceptible to ACV and ADV, and even hypersusceptible to FOS (mean IC_{50} decrease: 7,14-fold), although it exhibited a significant level of resistance to CDV (mean IC_{50} increase: 3,67-fold).

Only a few mutations have been described in conserved region VI of the DNA pol gene of HSV (7, 44), or HCMV (5, 13, 45, 47), and all were identified in clinical isolates. We generated three corresponding HSV-1 DNA pol mutants (L778M, D780N, L782I) and found that all three recombinants induced resistance to ACV, FOS, and ADV. Moreover, mutants L778M and L782I showed some reduction in CDV susceptibility (mean IC_{50} increase: 2,04- and 1,76-fold, respectively). The three recombinants containing mutations within conserved region III were associated with variable levels of resistance or hypersusceptibility towards the different antiviral agents. One mutant (T821M) had a resistance phenotype to ACV, CDV, and ADV whereas the other two (K805Q and L846I) were susceptible or hypersusceptible to the various drugs.

Region I is one of the most conserved region among α-like DNA pol. Mutation F891C within this region, was associated with the highest levels of resistance towards ACV and FOS (mean IC_{50} increase: 34,99-fold, and 3,91-fold, respectively), with significant levels of resistance to ADV (mean IC_{50} increase: 7,00-fold). In contrast to previous results (28, 40), the mutant Y941H (region VII) was not associated with a significant increase in FOS IC_{50} values although a marked decrease in ACV susceptibility (mean IC_{50} increase: 9,39-fold) was noted as reported. Furthermore, this substitution was associated with a significant level of resistance to ADV but induced hypersusceptibility to CDV. Mutation N961K within conserved region V only conferred resistance to ACV, as previously reported in laboratory-derived HSV-1 strains (23).

Effect of mutations outside conserved regions of the viral DNA pol gene. Only a few mutations located between conserved regions of the HSV DNA pol gene have been reported in drug-resistant viruses (2, 7, 23, 44). Mutation D907V was identified in a clinical HSV-2 isolate that also contained a TK mutation (44). Our results confirm the role of this DNA pol mutation in conferring resistance to ACV, FOS, and ADV. Mutation P920S was also found in combination with mutation S724N (region II) in three clinical HSV-1 isolates from an HIV-infected patient (7, 44). The role of these two mutations was studied by generating three different recombinant viruses. IC_{50} values for the mutant P920S were similar to those reported for the wt recombinant, while mutants S724N and S724N/P920S were associated with a comparable multi-drug resistance phenotype. Two mutations in the

C-terminal part of the HSV DNA pol gene have been described in laboratory-derived strains selected with HPMP derivatives (2). When generated in our system, mutation L1007M conferred an almost significant increase in ACV IC_{50} values (mean IC_{50} increase: 1,84-fold) but susceptibility to CDV in contrast to previous data. On the other hand, mutant I1028T exhibited the same phenotype as previously reported i.e. resistance to CDV only (2).

Replicative capacity of selected recombinant viruses. The DNA pol gene is one of the pivotal proteins involved in viral replication. Mutations within this gene can thus alter the replicative capacity of herpesviruses (6, 14, 25, 29, 34, 37). For instance, we were unable, despite many attempts, to generate two mutants (K552E and Y577H) located within δ-region C. Codon Y577 is part of the exoIII motif involved in the 3'-5' exonuclease activity of the enzyme (29, 30, 34). Although codon 552 is not part of the critical exo motifs, the Lys at this position is highly conserved among all herpesviruses.

The following mutants were selected for evaluation of their replication kinetics based on several factors such as: i) an obvious growth delay and/or smaller plaques when evaluated in cell culture (V715M, L778M, N961K) (Figure 3); ii) a specific location within the 3'-5' exonuclease motif (V573M); and iii) the absence of a resistance phenotype to all tested drugs (P920S). Mutants F891C and Y941H were so severely impaired in their ability to propagate in cell culture that sufficient titers could not be obtained to perform replication kinetic experiments (Figure 3). The extracellular yield of the other recombinant mutants were determined over a period of 144 h post-infection and compared to the wt (Figure 4). At most time points where measurement of virion production was possible (i.e. between 24 and 120 h post-infection), the yield of extracellular viruses was reduced by a factor varying from 5- to 15-fold for mutants V573M, V715M, L778M, and N961K when compared to the wt. The susceptible mutant P920S had replication kinetics similar to those of the wt (data not shown).

4.6 Discussion

Although HSV resistance to ACV is mostly due to alterations within the TK gene (24), mutations within the viral DNA pol gene can be more problematic as the latter protein is

the target of all anti-herpetic agents. In this study, we designed a novel approach to elucidate the role of specific DNA pol mutations by using a set of overlapping viral plasmids and cosmids. Twenty DNA pol recombinant mutants were generated and tested for their drug susceptibility patterns. Our results have revealed that alterations in a specific conserved region are not necessarily associated with a uniform drug resistance pattern. Furthermore, we showed the importance of the central part of the enzyme's catalytic domain (regions II and VI) as a multi-drug recognition site.

The main advantage of our method consists of the lack of a drug selection step, since only homogenous progeny of mutant virus is generated from the overlapping viral fragments. Although we could not exclude the emergence of mutations at the different recombination sites, we believe that such events were unlikely due to the following observations: i) both independently-generated recombinants containing the same DNA pol mutation had virtually identical IC_{50} values; and ii) no major genomic rearrangements occurred during recombination when assessed by Southern blot hybridization. The HSV DNA pol is a multi-functional enzyme that shows several similarities with α-like DNA pols (9). Although no direct crystallographic data are available to place specific HSV DNA pol mutations in a three-dimensional context, the structural significance of some mutations may be deduced based on similarity with pol regions from other members of this family (22, 27, 46).

Our results demonstrate that mutations in all conserved regions of the enzyme could be associated with ACV resistance. Although the chosen resistance definition for our recombinants was somewhat arbitrary (2-fold increase in IC_{50} value over wt), we were able to corroborate most previously-reported ACV resistance phenotypes associated with DNA pol mutations in laboratory-derived (2, 23, 33, 35, 37) and clinical (28, 40) HSV isolates. Of interest, mutation F891C, within conserved region I, was shown to confer the highest level of resistance to ACV in our study. It has been previously suggested that this mutation could alter the conformation of this highly conserved region so that the polymerase is less able to incorporate ACV-TP (27). Of note, we found a significant level of ACV resistance for DNA pol mutants previously reported as susceptible by our group based on an ACV resistance cut-off of 2 μg/ml (7, 44). This fact illustrates the difficulty of relying on a

specific IC_{50} value for defining resistance in the absence of a pre-therapy isolate. Our system was also useful to sort out the role of dual DNA pol and/or TK mutations previously reported in two clinical isolates (7, 44). In the first case, we were able to confirm the role of mutation D907V located outside conserved regions in the resistance phenotype to ACV. This finding, combined with our previous confirmation of the role of a TK mutation in the same clinical isolate (8), establishes the additive effect of mutations in two genes with respect to the final ACV resistance phenotype (7, 43). In the second case, our data now support a role for the S724N (region II) mutation but not for a concomitant DNA pol mutation (P920S) located outside conserved region in the ACV resistance phenotype.

Mutations associated with FOS resistance were found to be mostly located within conserved regions II, VI, and I. Mutation D907V, which is located in a non conserved region, was also associated with resistance to FOS. While some mutations part of conserved region III have been associated with resistance to pyrophosphate analogues (7, 23, 26, 44), the three mutants tested in this study remained susceptible to FOS. Our results confirm the role of most DNA pol mutations (A719T, S724N, L778M, D780N, and D907V) present in FOS-resistant clinical isolates previously reported by our group (7, 44). The mutant L846I (region III) generated in this study was not associated with FOS resistance. This mutation was located next to the corresponding HSV-1 (L845I) mutation reported by our group (7, 44). Thus, the role of newly-observed mutations in drug resistance must be adequately confirmed even when located close to a known mutation associated with a specific drug phenotype. Most notably, our recombinant Y941H mutant was susceptible to FOS despite the fact that this exact mutation was found in a FOS-resistant HSV-1 clinical isolate (28, 40). It is possible that additional DNA pol mutations (not part of the sequenced region) could have been present in the previous isolate. Alternatively, differences in the genetic background of the two HSV-1 strains could also possibly explain the discrepant phenotype. Of note, the acute HSV disease associated with this clinical DNA pol mutant was successfully managed with intravenous FOS therapy (40).

Our results expand on the limited information regarding HSV resistance to CDV. We found that a few DNA pol mutants within regions II, VI, and III exhibited decreased susceptibility

towards this antiviral. We were able to confirm a role in the CDV resistance phenotype for some (R700M, I1028T) but not all (V573M, L1007M) mutations previously reported in laboratory-derived strains selected with HPMP derivatives (2). As the authors did not sequence the entire DNA pol of those laboratory-derived strains, it is possible that additional mutations could be responsible for the CDV-resistant phenotype. Finally, we confirmed the role of the unique mutant (L778M) reported as CDV-resistant in our previous study (7). We also found the same phenotype for the mutant S724N otherwise reported as susceptible to CDV (7). However, the use of a few wt isolates (not obtained from the same patient) to compare CDV IC_{50} values may explain such discrepancy. Importantly, we did not find a correlation between ACV and CDV resistance in HSV mutants as reported between GCV and CDV in HCMV DNA pol mutants, suggesting that the binding sites of ACV and GCV may differ (4, 15) or that those sites may vary according to the virus.

ADV resistance was associated with several DNA pol mutations mainly in regions II, VI, I, and VII, as previously reported in laboratory-derived (2) and clinical (7) HSV isolates. Moreover, consistent with the previous HSV studies (2, 7) and with those of HCMV recombinants (13), an almost perfect cross-resistance pattern was seen between FOS and ADV in our HSV recombinants. Furthermore, all of those FOS/ADV-resistant recombinants were also resistant to ACV in our study, with two of these (S724N, L778M) also exhibiting a notable decrease in CDV susceptibility. These results suggest the possibility that a unique DNA pol mutation can confer resistance to all available anti-herpetic agents. Importantly, we previously reported that such mutations can be selected in vivo in patients who sequentially received ACV and FOS therapy only (7, 44). However, there were two notable exceptions (mutants T821M and Y941H) which did not share this typical FOS/ADV resistance profile. This unusual phenotype has also been reported occasionally for other clinical DNA pol mutants (L850I, N815S) (1, 7), suggesting that subtle differences do exist in the interaction of the two drugs on the enzyme.

The viral pol is an essential enzyme part of a complex of seven proteins involved in the viral DNA replication cycle. As such, it is not unexpected that some DNA pol mutations could affect the efficiency of viral growth (6, 14, 25, 29, 34, 37). Indeed, we were unable to

generate two mutants (K552E, Y577H) located in δ-region C. Hwang et al., (29, 30) have found a drastic increase in the mutational rate of recombinant Y577H (exoIII motif) generated in a complementary cell line expressing a wt HSV-1 DNA pol (29). Also, a K513N HCMV DNA pol mutant (corresponding to the K552 a.a. in HSV-1) had severely-impaired replication kinetics in vitro (14). Along the same line, our V715M HSV-1 mutant had decreased replication capacity as reported for the corresponding HCMV mutant (6). Interestingly, we were successful in generating mutant V573M which involves a non-conserved residue of the exoIII motif. However, this mutant had some impairment in replication as reported in our study and was also shown to be less neurovirulent in mice (2). The recombinant F891C, which lies two amino acids next to the invariant YGDTDS motif of conserved region I (37), could also be generated in our study albeit with severe impairment in replication capacities. Previous investigators have shown that most mutations in this highly-conserved motif inactivate pol elongation activity with a few notable exceptions such as the S889A mutant (18, 19).

We were able to generate three HSV-1 recombinants (P561S, V715M, K805Q) containing a.a. changes previously reported in drug-resistant HCMV strains (5, 6, 13, 31, 45). Only one of these HSV-1 mutants (K805Q) had the same drug resistance phenotype as described for HCMV (13). Some differences in drug susceptibilities were found for the other two recombinants. Thus, despite structural similarities among α-like DNA pols, functional differences regarding interactions with antivirals can be present among distinct viral members (39). Such differences in drug interaction could be explained by slight variance in the conserved regions of the different viruses combined with distinct conformations created by the diversity of non-conserved domains (38). Indeed, interaction of an antiviral with the polymerase requires the folding of several non-contiguous regions within the protein (27, 38). Further experiments such as structural and conformational analysis of the different DNA pol proteins are therefore needed to clarify these observations.

In summary, we showed that the structure-function relationship of the HSV DNA pol catalytic domain was more complex than what could be assumed based on HCMV recombinants studies (13). Also, our results confirm that resistance to a single drug such as ACV can be mapped to numerous conserved regions as well as non-conserved regions of

the DNA pol which will limit rapid genotyping analysis based on discriminative PCR or RFLP analysis. Importantly, we found that some HSV DNA pol mutations (including ones previously-reported in clinical isolates) are associated with a resistance phenotype to all currently-available anti-herpetic agents emphasizing the need to develop new drugs with different mechanisms of action. The development of efficient methods to generate recombinant viruses like the one reported here should facilitate the understanding of drug resistance mechanisms and the assessment of various viral gene functions.

4.7 Acknowledgments

The authors would like to thank Dominic Gagné for technical support and helpful discussions. This work was supported by a grant (no. MT-13924) from the Canadian Institutes of Health Research to G.B. J.B.-S. holds a student fellowship award from the Canadian Institutes of Health Research.

4.8 References

1. **Andrei, G., P. Fiten, P. Goubau, H. Van Landuyt, B. Gordts, D. Selleslag, D. C. E., and R. Snoeck.** 2002. Genotypic characterization of the DNA polymerase of a clinical herpes simplex virus type 1 (HSV-1) isolate with a unique phenotype, abstr.V-921m o,436. In Abstracts of the 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

2. **Andrei, G., R. Snoeck, E. De Clercq, R. Esnouf, P. Fiten, and G. Opdenakker.** 2000. Resistance of herpes simplex virus type 1 against different phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purines and pyrimidines due to specific mutations in the viral DNA polymerase gene. J. Gen. Virol. **81:**639-648.

3. **Andrei, G., R. Snoeck, and E. DeClercq.** 1997. Differential susceptibility of several drug-resistant strains of herpes simplex virus type 2 to various antiviral compounds. Antimicrob. Agents Chemother. **8:**457-461.

4. **Andrei, G., R. Snoeck, J. Neyts, M. L. Sandvold, F. Myhren, and E. De Clercq.** 2000. Antiviral activity of ganciclovir elaidic acid ester against herpesviruses. Antiviral Res. **45:**157-67.

5. **Baldanti, F., A. Sarasini, E. Silini, M. Barbi, A. Lazzarin, K. K. Biron, and G. Gerna.** 1995. Four dually resistant human cytomegalovirus strains from AIDS patients: single mutations in UL97 and UL54 open reading frames are responsible for ganciclovir- and foscarnet-specific resistance, respectively. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. **99:**103-104.

6. **Baldanti, F., M. R. Underwood, S. C. Stanat, K. K. Biron, S. Chou, A. Sarasini, E. Silini, and G. Gerna.** 1996. Single amino acid changes in the DNA polymerase confer foscarnet resistance and slow-growth phenotype, while mutations in the UL97-encoded phosphotransferase confer ganciclovir resistance in three double-resistant human cytomegalovirus strains recovered from patients with AIDS. J. Virol. **70:**1390-1395.

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

8. **Bestman-Smith, J., I. Schmit, B. Papadopoulou, and G. Boivin.** 2001. Highly reliable heterologous system for evaluating resistance of clinical herpes simplex virus isolates to nucleoside analogues. J. Virol. **75:**3105-3110.

9. **Blanco, L., A. Bernad, M. A. Blasco, and M. Salas.** 1991. A general structure for DNA-dependent DNA polymerases. Gene **100:**27-38.

10. **Chibo, D., A. Mijch, R. Doherty, and C. Birch.** 2002. Novel mutations in the thymidine kinase and DNA polymerase genes of acyclovir and foscarnet resistant herpes simplex viruses infecting an immunocompromised patient. J. Clin. Virol. **25:**165-170.

11. **Chiou, H. C., D. Kumura, A. Hu, K. M. Kerns, and D. M. Coen.** 1995. Penciclovir-resistance mutations in the herpes simplex virus DNA polymerase gene. Antiviral Chem. Chemother. **6:**281-288.

12. **Chou, S., N. S. Lurain, A. Weinberg, G. Y. Cai, P. L. Sharma, and C. S. Crumpacker.** 1999. Interstrain variation in the human cytomegalovirus DNA polymerase sequence and its effect on genotypic diagnosis of antiviral drug resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **43:**1500-1502.

13. **Cihlar, T., M. Fuller, and J. Cherrington.** 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.

14. **Cihlar, T., M. D. Fuller, A. S. Mulato, and J. M. Cherrington.** 1998. A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene selected in vitro by cidofovir confers a slow replication phenotype in cell culture. Virology **248:**382-393.

15. **Coen, D. M.** 1996. Nucleosides and Foscarnet-Mechanisms, p. 81-102. *In* D.D. Richman (ed.), Antiviral Drug Resistance. John Wiley & Sons Ltd., New York, N.Y.

16. **Collins, P., B. A. Larder, N. M. Oliver, S. Kemp, I. W. Smith, and G. Darby.** 1989. Characterization of a DNA polymerase mutant of herpes simplex virus from a severely immunocompromised patient receiving acyclovir. J. Gen. Virol. **70:**375-382.

17. **Cunningham, C., and A. J. Davison.** 1993. A cosmid-based system for constructing mutants of herpes simplex virus type 1. Virology **197:**116-124.

18. **Dorsky, D. I., and C. S. Crumpacker.** 1990. Site-specific mutagenesis of a highly conserved region of the herpes simplex virus type 1 DNA polymerase gene. J. Virol. **64:**1394-1397.

19. **Dorsky, D. I., and C. Plourde.** 1993. Resistance to antiviral inhibitors caused by the mutation S889A in the highly-conserved 885-GDTDS motif of the herpes simplex virus type 1 DNA polymerase. Virology **195:**831-835.

20. **Duffy, K. E., M. R. Quail, T. T. Nguyen, R. J. Wittrock, J. O. Bartus, W. M. Halsey, J. J. Leary, T. H. Bacon, and R. T. Sarisky.** 2002. Assessing the contribution of the herpes simplex virus DNA polymerase to spontaneous mutations. BMC Infect. Dis. **2:**7.

21. **Eckle, T., L. Prix, G. Jahn, T. Klingebiel, R. Handgretinger, B. Selle, and K. Hamprecht.** 2000. Drug-resistant human cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation may have different clinical outcomes. Blood **96:**3286-3289.

22. **Franklin, M. C., J. Wang, and T. A. Steitz.** 2001. Structure of the replicating complex of a pol alpha family DNA polymerase. Cell **105:**657-667.

23. **Gibbs, J. S., H. C. Chiou, K. F. Bastow, Y. C. Cheng, and D. M. Coen.** 1988. Identification of amino acids in herpes simplex virus DNA polymerase involved in substrate and drug recognition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85:**6672-6676.

24. **Gilbert, C., J. Bestman-Smith, and G. Boivin.** 2002. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. Drug Resist. Updat. **5:**88-114.

25. **Hall, J. D., K. L. Orth, K. L. Sander, B. M. Swihart, and R. A. Senese.** 1995. Mutations within conserved motifs in the 3'-5' exonuclease domain of herpes simplex virus DNA polymerase. J. Gen. Virol. **76:**2999-3008.

26. **Hall, J. D., Y. S. Wang, J. Pierpont, M. S. Berlin, S. E. Rundlett, and S. Woodward.** 1989. Aphidicolin resistance in herpes simplex virus type I reveals features of the DNA polymerase dNTP binding site. Nucleic Acids Res. **17:**9231-9244.

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

28. **Hwang, C. B., K. L. Ruffner, and D. M. Coen.** 1992. A point mutation within a distinct conserved region of the herpes simplex virus DNA polymerase gene confers drug resistance. J. Virol. **66:**1774-1776.

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

30. **Hwang, Y. T., J. F. Smith, L. Gao, and C. B. Hwang.** 1998. Mutations in the Exo III motif of the herpes simplex virus DNA polymerase gene can confer altered drug sensitivities. Virology **246:**298-305.

31. **Jabs, D. A., B. K. Martin, M. S. Forman, J. P. Dunn, J. L. Davis, D. V. Weinberg, K. K. Biron, and F. Baldanti.** 2001. Mutations conferring ganciclovir resistance in a cohort of patients with acquired immunodeficiency syndrome and cytomegalovirus retinitis. J. Infect. Dis. **183:**333-337.

32. **Jabs, D. A., C. L. Meinert, and J. P. Lalezari.** 1997. Cidofovir for cytomegalovirus retinitis - Response. Ann. Intern. Med. **127:**490-491.

33. **Knopf, C. W., and K. Weisshart.** 1988. The herpes simplex virus DNA polymerase: analysis of the functional domains. Biochim. Biophys. Acta. **951:**298-314.

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

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

36. **Larder, B. A., J. J. Lisle, and G. Darby.** 1986. Restoration of wild-type pathogenicity to an attenuated DNA polymerase mutant of herpes simplex virus type 1. J. Gen. Virol. **67:**2501-2506.

37. **Marcy, A. I., C. B. Hwang, K. L. Ruffner, and D. M. Coen.** 1990. Engineered herpes simplex virus DNA polymerase point mutants: the most highly conserved region shared among alpha-like DNA polymerases is involved in substrate recognition. J. Virol. **64:**5883-5890.

38. **Matthews, J. T., B. J. Terry, and A. K. Field.** 1993. The structure and function of the HSV DNA replication proteins: defining novel antiviral targets. Antiviral Res. **20:**89-114.

39. **Reha-Krantz, L. J., R. L. Nonay, and S. Stocki.** 1993. Bacteriophage T4 DNA polymerase mutations that confer sensitivity to the PPi analog phosphonoacetic acid. J. Virol. **67:**60-66.

40. **Sacks, S. L., R. J. Wanklin, D. E. Reece, K. A. Hicks, K. L. Tyler, and D. M. Coen.** 1989. Progressive esophagitis from acyclovir-resistant herpes simplex. Clinical roles for DNA polymerase mutants and viral heterogeneity? Ann. Intern. Med. **111:**893-899.

41. **Safrin, S., C. Crumpacker, P. Chatis, R. Davis, R. Hafner, J. Rush, H. A. Kessler, B. Landry, and J. Mills.** 1991. A controlled trial comparing foscarnet with vidarabine for acyclovir-resistant mucocutaneous herpes simplex in the acquired immunodeficiency syndrome. N. Engl. J. Med. **325:**551-5.

42. **Safrin, S., S. Kemmerly, B. Plotkin, T. Smith, N. Weissbach, D. De Veranez, L. D. Phan, and D. Cohn.** 1994. Foscarnet-resistant herpes simplex virus infection in patients with AIDS. J. Infect. Dis. **169:**193-196.

43. **Saijo, M., Y. Yasuda, H. Yabe, S. Kato, T. Suzutani, E. De Clercq, M. Niikura, A. Maeda, I. Kurane, and S. Morikawa.** 2002. Bone marrow transplantation in a child with Wiskott-Aldrich syndrome latently infected with acyclovir-resistant (ACVr) herpes simplex virus type 1: Emergence of foscarnet-resistant virus originating from the ACVr virus. J. Med. Virol. **68:**99-104.

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

45. **Smith, I. L., J. M. Cherrington, R. E. Jiles, M. D. Fuller, W. R. Freeman, and S. A. Spector.** 1997. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. J. Infect. Dis. **176:**69-77.

46. **Wang, J., A. K. Sattar, C. C. Wang, J. D. Karam, W. H. Konigsberg, and T. A. Steitz.** 1997. Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69. Cell **89:**1087-1099.

47. **Weinberg, A., D. A. Jabs, S. Chou, B. K. Martin, N. S. Lurain, M. S. Forman, and C. Crumpacker.** 2003. Mutations conferring foscarnet resistance in a cohort of patients with acquired immunodeficiency syndrome and cytomegalovirus retinitis. J. Infect. Dis. **187:**777-784.

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

Table 4-1.Genotypic and phenotypic caracterization of recombinant HSV-1 to antivirals

Table 1: Genotypic and phenotypic characterization of recombinant HSV-1 to antivirals.

Conserved region	Nucleotide changes	Amino acid changes	References	Acyclovir IC_{50}				Foscarnet IC_{50}			Cidofovir IC_{50}			Adefovir IC_{50}		
				IC_{50} (µg/ml)	IC_{50} (µg/ml)	std	Ratio[a]	IC_{50} (µg/ml)	std	Ratio[a]	IC_{50} (µg/ml)	std	Ratio[a]	IC_{50} (µg/ml)	std	Ratio[a]
———	———	WT		0,0057	0,0064	±0,0012	1,00	15,0275	±1,61	1,00	0,1605	±0,0377	1,00	0,8475	±0,05	1,00
δ-C	A1654G	K552E[b]	(K513E[c]) (13, 45)													
δ-C	C1681T	P561S	(P522S[c]) (13, 31, 47)	0,0054	0,0054	±0,0007	0,85	13,6725	±1,91	0,91	0,2383	±0,0414	1,48	0,1800	±0,07	**0,21**
δ-C (exoIII)	G1717A	V573M	(2)	0,0122	0,0120	±0,0030	1,90	13,0340	±3,95	0,87	0,1861	±0,0530	1,16	1,1108	±0,42	1,31
δ–C (exoIII)	T1729C	Y577H[b]	(29,30)													
II	G2099T	R700M	(2)	0,0044	0,0062	±0,0021	0,98	2,0350	±0,52	**0,14**	0,5886	±0,0385	**3,67**	0,4449	±0,01	0,52
II	G2143A	V715M[c]	(5, 6, 13, 47)	0,0198	0,0182	±0,0045	**2,86**	12,1932	±2,76	0,81	0,0561	±0,0151	**0,35**	1,5076	±0,50	1,78
II	G2155A	A719T	(A724T[d]) (7, 44)	0,0373	0,0377	±0,0043	**5,94**	32,6985	±2,57	**2,18**	0,2965	±0,0345	1,85	3,1958	±0,64	**3,77**
II	G2171A	S724N	(2,23,35), (S729N[d]) (7, 44)	0,0633	0,0627	±0,0253	**9,87**	40,4150	±2,96	**2,69**	0,3284	±0,0235	**2,05**	4,6750	±1,31	**5,52**
VI	C2332A	L778M	(D783M[d]) (7, 44)	0,0300	0,0351	±0,0106	**5,53**	30,5800	±6,52	**2,03**	0,3281	±0,0561	**2,04**	2,7312	±1,70	**3,22**
VI	G2338A	D780N	(D785N[d]) (7, 44)	0,0445	0,0388	±0,0097	**6,10**	32,6100	±5,06	**2,17**	0,1937	±0,0387	1,21	2,3979	±0,31	**2,83**
VI	C2344A	L782I	(V781I[c]) (5, 13, 47)	0,0373	0,0408	±0,0086	**6,43**	34,3525	±4,60	**2,29**	0,2825	±0,0658	1,76	3,1875	±0,40	**3,76**
III	A2413C	K805Q[c]	(13, 45)	0,0032	0,0041	±0,0012	0,64	5,0978	±0,25	**0,34**	0,2914	±0,0660	1,82	0,2523	±0,06	**0,30**
III	C2462T	T821M	(33)	0,0294	0,0397	±0,0136	**6,25**	22,1939	±2,90	1,48	0,3392	±0,0364	**2,11**	2,3464	±0,53	**2,77**
III	C2536A	L846I	(L850I[d]) (7, 44)	0,0094	0,0096	±0,0013	1,52	10,5263	±2,26	0,70	0,2015	±0,0332	1,26	0,3913	±0,11	**0,46**
I	T2672G	F891C	(27, 37)	0,2222	0,2222	±0,0196	**34,99**	58,7450	±15,15	**3,91**	0,2795	±0,0542	1,74	5,9300	±0,08	**7,00**
I-VII	A2720T	D907V	(D912V[d]) (7, 44)	0,0280	0,0240	±0,0070	**3,78**	34,1425	±4,76	**2,27**	0,2555	±0,0594	1,59	2,1440	±0,68	**2,53**
I-VII	C2758T	P920S	(7, 44)	0,0051	0,0067	±0,0023	1,05	10,9750	±2,88	0,73	0,1037	±0,0130	0,65	0,8275	±0,09	0,98
VII	T2821C	Y941H	(28)	0,0555	0,0596	±0,0228	**9,39**	20,7158	±3,77	1,38	0,0629	±0,0164	**0,39**	4,8400	±1,31	**5,71**
V	C2883G	N961K	(23)	0,0369	0,0339	±0,008	**5,34**	12,4200	±2,12	0,83	0,2261	±0,1141	1,41	0,9250	±0,27	1,09
After V	C3019A	L1007M	(2)	0,0118	0,0117	±0,0012	1,84	8,8320	±1,20	0,59	0,1955	±0,0305	1,22	0,3050	±0,15	**0,36**
After V	T3083C	I1028T	(2)	0,0112	0,0111	±0,0023	1,74	8,6550	±2,15	0,58	0,3658	±0,0070	**2,28**	0,5373	±0,16	0,63
II and I-VII	G2171A/ C2758T	S724N/ P920S	(7, 44)	0,0811	0,0737	±0,0142	**11,61**	38,0000	±2,44	**2,53**	0,3819	±0,1218	**2,38**	6,5873	±1,59	**7,77**

Note. Two independently-generated recombinant viruses were tested for each mutation. IC_{50} values are averages from at least two determinations for each of the recombinant viruses.
Boldface numbers indicate significant (i.e., at least two-fold) changes in HSV drug susceptibility.
[a]IC_{50} values of HSV recombinant mutants over parental wild-type (wt) recombinant.
[b]These mutations could not be generated.
[c]mutation originally described in the HCMV DNA polymerase (UL54) gene.
[d]mutation originally described in the HSV-2 DNA polymerase gene.

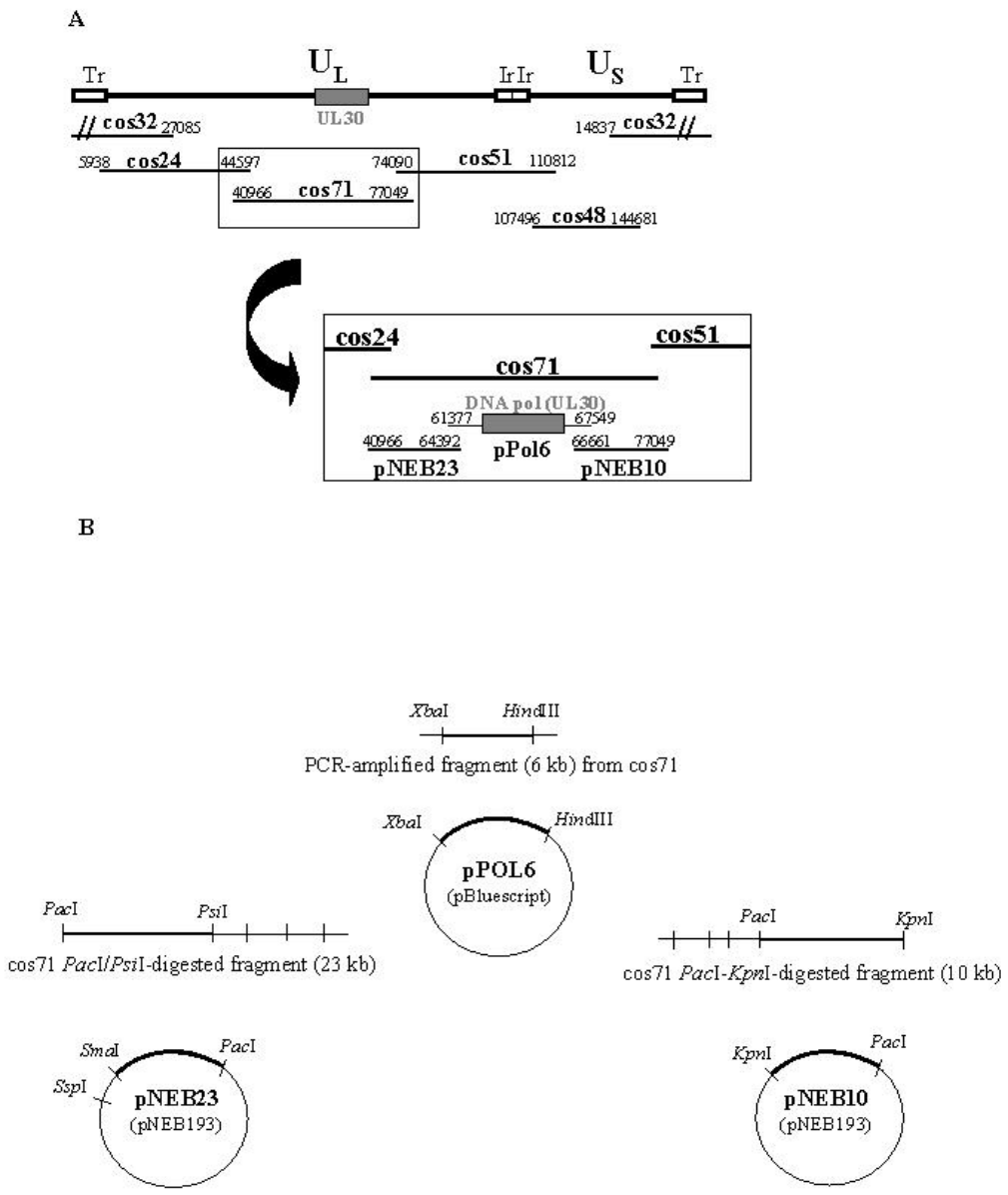

Figure 9 : **Figure 1**. Schematic representation of viral cosmids and plasmids used to generate HSV-1 recombinants.

(A) Inserts of the 5 cosmids (24, 32, 48, 51, 71) covering the complete genome of the HSV-1 strain 17 (17), along with the three plasmids (pNEB23, pPol6, and pNEB10) designed to replace cos71. (B) Construction of the pNEB23, pPol6, and pNEB10 plasmids. The nucleotide positions of inserts in the HSV strain 17 genome are indicated.

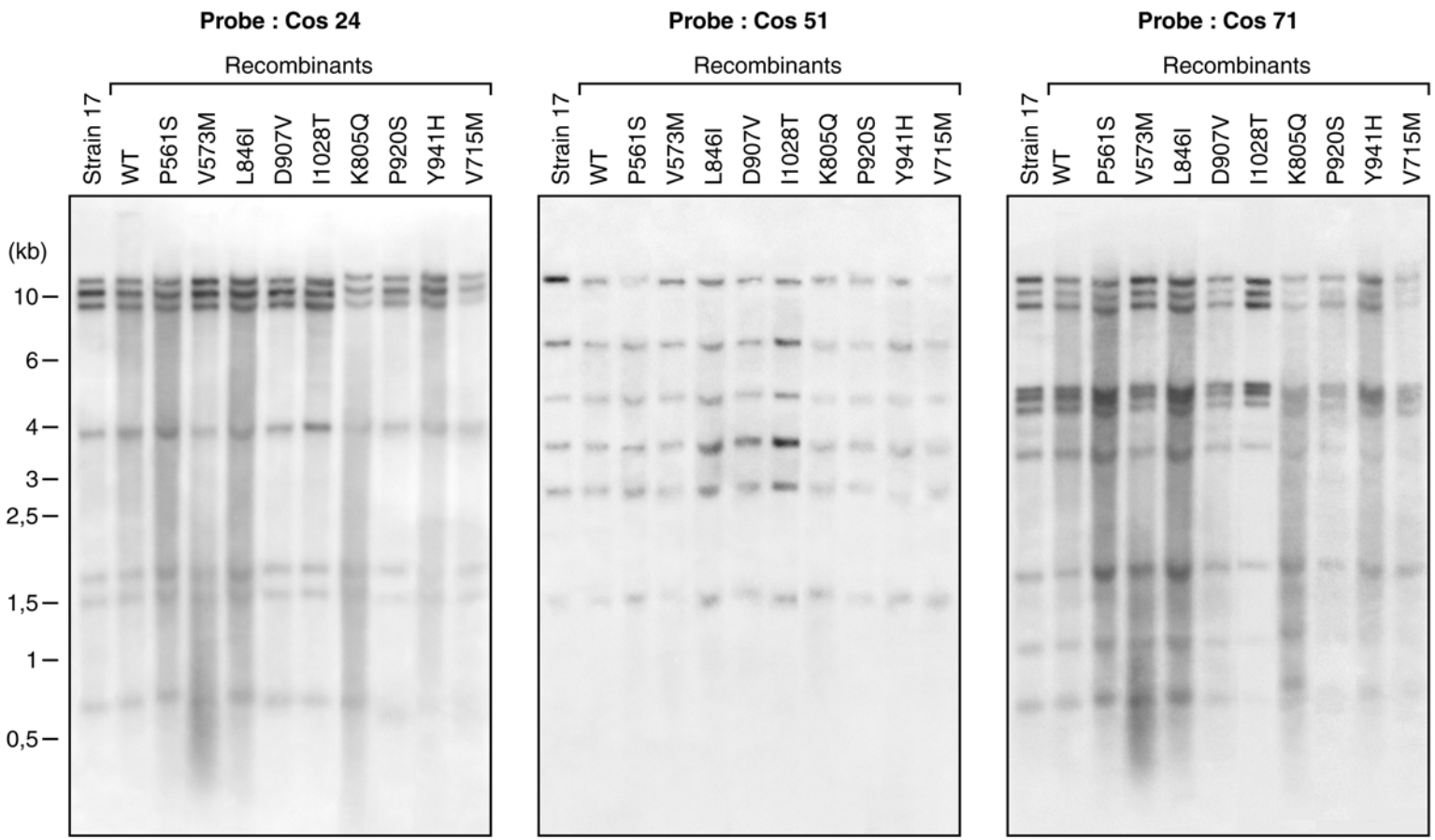

Figure 10 : **Figure 2**. Southern blot analysis of some recombinant HSV-1 wild type (wt) and mutant viruses along with the parental laboratory strain HSV 17 using some of the viral cosmids (cos 24, 51, and 71) as probes.

Numbers on the left indicate molecular sizes in kilobase pairs.

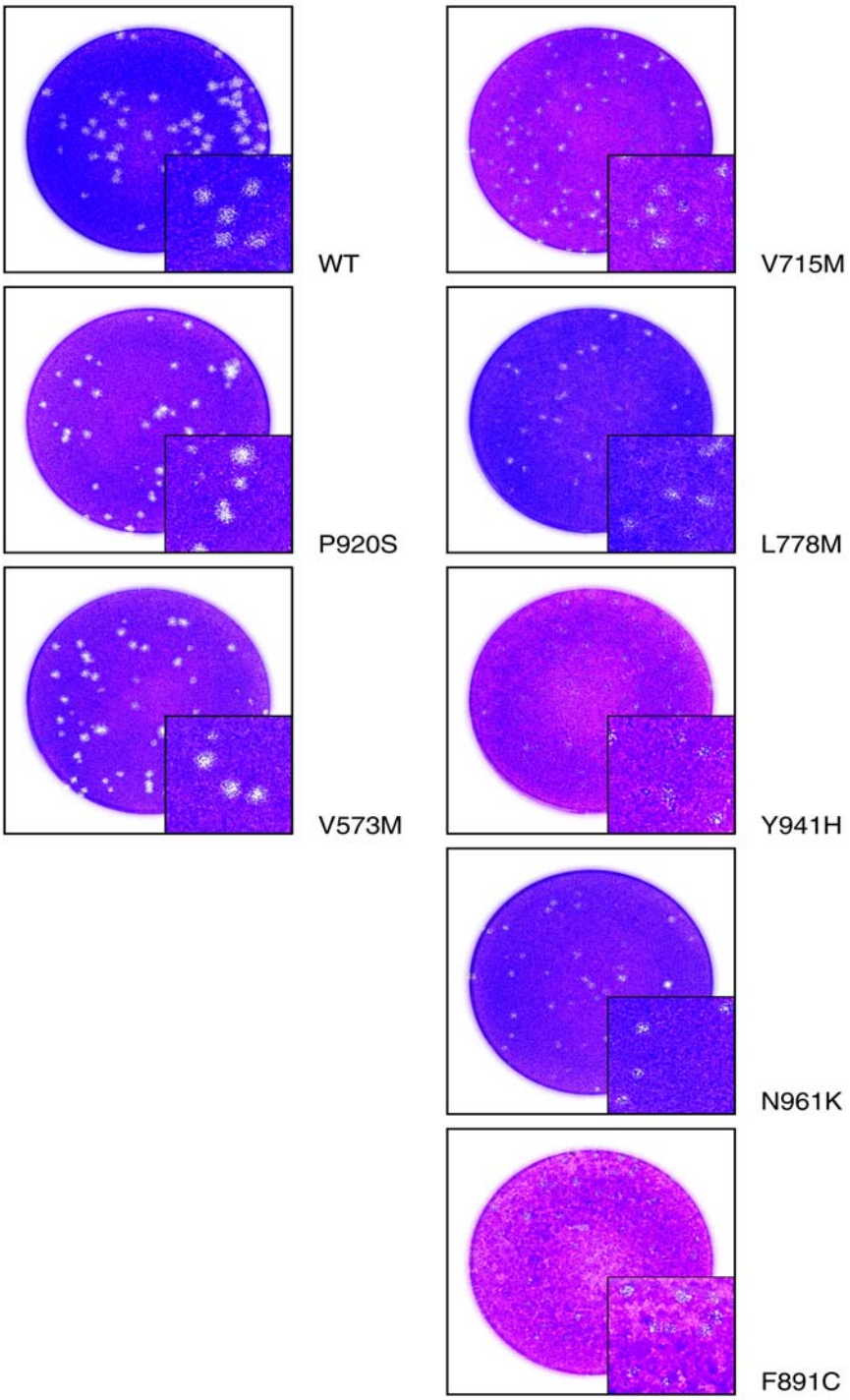

Figure 11 : **Figure 3**. Plaque morphology of some recombinant HSV-1 wild-type (wt) and mutant viruses in 24-well plates containing Vero cells.

At 96 h post infection, cells were fixed and stained. Note that viral inoculum was not necessarily the same for each recombinant viruses.

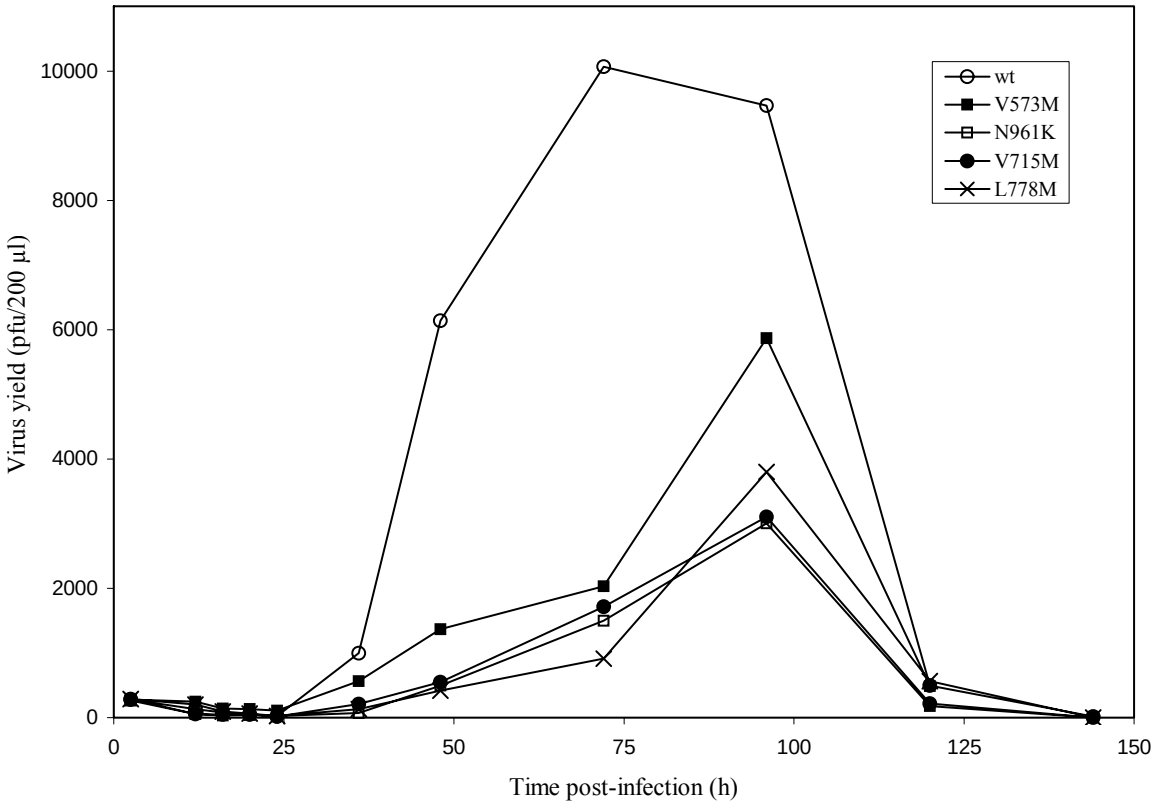

Figure 12 : **Figure 4**. Influence of DNA polymerase mutations on HSV replication capacity in single-step growth kinetics.

On day of infection, confluent Vero cells in 24-well plates were infected either with the wild-type (wt) (○), or different recombinant mutants: V573M (■), N961K (□), V715M (●), and L778M (5), at a m.o.i. of 5. Extracellular viruses were collected at different times (up to 144 h post infection) and titrated. Curves are representative of two independent experiments.

Conclusion et perspectives

La TK de même que l'ADN pol virale sont les deux enzymes virales impliquées dans le mécanisme d'action des antiviraux actuellement utilisés pour le traitement du VHS. Toute modification au sein des gènes codant pour ces deux enzymes pourrait donc avoir un effet sur la sensibilité du VHS aux antiviraux. Malgré l'utilisation extensive des analogues de nucléosides en tant que traitement de première ligne, la résistance des infections au VHS demeure un phénomène assez rare chez la plupart des patients (Bacon *et al*., 2003). Par contre, l'amélioration constante des traitements anticancéreux de même que ceux développés contre l'infection au VIH résulte en une augmentation de l'espérance de vie des patients immunosupprimés. Ces patients devront être traités de plus en plus longtemps pour des infections opportunistes telles que celles causées par les virus herpétiques. Il est donc très probable que le problème de la résistance se voit augmenter dans l'avenir. D'autre part, certaines évidences nous permettent de croire que la résistance du VHS aux antiviraux pourrait être sous-estimée, voire négligée. Tout d'abord, les isolats de VHS, particulièrement ceux isolés de patients immunosupprimés sont souvent hétérogènes ce qui peut rendre difficile la détection des virus résistants. En effet, en utilisant les techniques actuelles pour déterminer la sensibilité du VHS (i.e. MRP), une population de plus de 20% de virus résistants doit être présente parmi des virus sensibles pour pouvoir être détectée (Sarisky *et al*., 2000). De plus, certaines mutations, (spécialement dans le gène de l'ADN pol) pourraient entraîner une diminution de la capacité réplicative des virus résistant aux antiviraux et, de ce fait, limiter leur isolement dans des populations virales hétérogènes. Finalement, la présence de "variants" comprenant des mutations impliquées seulement dans le polymorphisme génétique rend difficile l'identification des mutations fonctionnelles. Une meilleure connaissance des mutations impliquées dans la résistance du VHS aux antiviraux permettrait certainement de mieux comprendre ce phénomène et finalement, d'améliorer le traitement des individus infectés.

La caractérisation précise des mutations virales responsables de la résistance du VHS est donc incomplète jusqu'à maintenant et ce, possiblement dû au manque de méthodes efficaces afin d'étudier de façon adéquate les mutations au sein des gènes viraux (TK et ADN pol) impliqués dans la résistance. L'objectif principal des recherches présentées dans

cette thèse de doctorat était donc de développer de nouveaux modèles d'expression de ces gènes afin de vérifier l'impact des mutations virales dans la résistance aux antiviraux ainsi que dans la capacité réplicative des virus mutants.

Nos travaux ont tout d'abord débuté par l'étude du gène de la TK du VHS. Une collection importante d'isolats cliniques de VHS-1 et –2 isolés de patients immunosupprimés ayant subi un échec au traitement à l'ACV et/ou au FOS était disponible dans notre laboratoire (Gaudreau *et al*., 1998, Schmit & Boivin, 1999). Les isolats cliniques de VHS ont été caractérisés phénotypiquement et génotypiquement en déterminant la CI_{50} envers l'ACV par la MRP et par le séquençage de la partie codante du gène de la TK. Des mutations ont été identifiées dans la plupart des souches résistantes à l'ACV en comparant à des souches pré-thérapie ou sauvages (Table 2-1, p.131, chapitre II). Le rôle de certaines de ces mutations, par exemple, des délétions et des insertions de nucléotides dans des homopolymères de G et de C menant à un codon d'arrêt et à la production d'une protéine tronquée, dans la résistance à l'ACV était hautement probable (Gaudreau *et al*., 1998, Sasadeusz *et al*., 1997, Schmit & Boivin, 1999) et ces types de mutants pouvaient alors servir à la validation de notre nouveau système d'expression. De plus, lorsqu'une paire d'isolats (sensible et résistante) a pu être isolée du même patient, l'identification d'une mutation présente dans la souche résistante mais non dans la souche sensible était fortement suspecte comme étant responsable de la résistance. Cependant, en pratique ce type d'isolat (pré-thérapie) est rarement disponible. D'autre part, plus d'une mutation peut être identifiée dans deux gènes différents (TK et ADN pol), comme ce fut le cas pour un de nos isolats (6b) (Bestman-Smith *et al*., 2001), ce qui rendait difficile la détermination de la contribution de chacune des mutations dans la résistance aux antiviraux. La présence d'une mutation dans une région conservée ou active du gène pouvait également être assez suspecte de la résistance. Toutefois, tant que la mutation n'a pas été prouvée de façon convenable comme entraînant la résistance et ce, particulièrement dans le cas où un assez haut niveau de polymorphisme génétique est présent dans le gène à l'étude, on ne pouvait confirmer de façon hors de tout doute son rôle fonctionnel dans la résistance aux antiviraux. La transfection et la recombinaison homologue, fréquemment utilisées à cette fin, n'avaient cependant pas été démontrées comme étant efficaces dans notre laboratoire, ce qui nous a

mené à mettre au point le nouveau système d'expression hétérologue du gène de la TK du VHS dans le parasite *Leishmania tarentolae*, normalement dépourvu d'activité TK.

Plusieurs raisons nous ont incités à sélectionner ce système. Tout d'abord, l'expression du gène de la TK en combinaison avec le GCV avait déjà été démontrée comme étant efficace en tant que gène suicide chez le parasite *Leishmania* (Muyombwe *et al*., 1998, Muyombwe *et al*., 1997). En effet, des transfectants stables exprimant la TK du VHS avait déjà été générés par Muyombwe et ses collaborateurs qui ont démontré que ces parasites sont cent fois plus sensibles au GCV que les parasites sauvages (Muyombwe *et al*., 1997). Le GCV plutôt que l'ACV doit toutefois être utilisé dans ce système puisque contrairement au GCV, l'ACV ne semble pas inhiber la croissance des transfectants *Leishmania* exprimant une activité TK. Cependant, le GCV est un analogue nucléosidique de la guanosine très similaire à l'ACV, différant uniquement par la présence d'un groupe hydroxymethyl. De plus, plusieurs études ont démontré que les souches de VHS résistantes à l'ACV à cause des mutations dans le gène de la TK sont également résistantes au GCV (Andrei *et al*., 1995, Andrei *et al*., 1997, Naesens *et al*., 1997). L'absence d'inhibition de la réplication des parasites transfectés par l'ACV est donc probablement due à la différence de conformation chimique de la molécule qui pourrait empêcher sa pénétration dans le parasite. Le genre *tarentolae* a été sélectionné puisqu'il n'est pas pathogène chez l'humain, ce qui facilitait grandement les manipulations. De plus, la croissance du parasite en culture est rapide (48 à 72 h) et celle-ci est facilement mesurable par la détermination de la densité optique (à 600 nm) des parasites en culture.

Dans le cadre de notre étude, la transfection des gènes de la TK de type sauvage des souches de références MS2 (VHS-2) et KOS (VHS-1) dans le parasite a également résulté en la sensibilité de celui-ci au GCV avec des CI_{50} de 55,91 μM et de 17,19 μM, respectivement, contrairement aux parasites sauvages n'exprimant pas de TK (CI_{50} >10 000 μM). Ces premiers résultats nous ont donc permis de valider notre système d'expression. De plus, toutes les TK des souches cliniques de VHS sensibles à l'ACV ont également résulté, une fois transfectées chez le parasite, en une sensibilité au GCV (CI_{50} <100 μM ; écarts : 11,35 à 99,4 μM). De façon intéressante, plusieurs de ces souches sensibles comportaient tout de même des mutations non silencieuses au sein du gène de la TK.

Certaines d'entre elles avaient également été identifiées dans des souches de VHS résistantes à l'ACV et nos résultats chez le parasite nous ont permis de confirmer de façon hors de tout doute qu'elles étaient seulement impliquées dans le polymorphisme génétique. Une liste de plusieurs de ces mutations polymorphiques a même pu être établie (Table 2-3, p.133, chapitre II), ce qui, à l'avenir, facilitera la distinction entre les mutations uniquement impliquées dans le polymorphisme génétique de celles qui entraînent réellement la résistance aux analogues des nucléosides.

Un autre avantage à ce nouveau système vient de la différence importante (>50 fois) entre les valeurs de CI_{50} des parasites exprimant une TK sensible de celles venant des parasites exprimant une TK menant à la résistance. En effet, dans certains cas (exemple de l'isolat 5b de notre étude (Table 2-2, p.132, chapitre II)), la sensibilité des souches de VHS à l'ACV en utilisant la MRP pouvait se situer à des valeurs à la limite de la résistance (CI_{50} de l'isolat 5b: 9,9 μM, valeur de la CI_{50} délimitant la résistance à l'ACV :≥ 8,8 μM) et la résistance de cette souche à l'ACV aurait pu être discutable. Par contre, une fois introduite dans le parasite, la TK de cet isolat a conféré un niveau de résistance au GCV incontestable (CI_{50} > 10 000 μM) comparativement à la souche sensible prélevée du même patient (5a : CI_{50} du *Leishmania* au GCV : 11,35 μM). Ainsi, ce système nous a permis de confirmer le rôle de plusieurs mutations dans le gène de la TK du VHS dans la résistance aux analogues des nucléosides. Tel qu'attendu, les TK comprenant des mutations entraînant un codon d'arrêt prématuré ont mené à la résistance des parasites transfectés au GCV (CI_{50} 6391 à > 10 000 μM) de même que plusieurs mutations identifiées dans les régions catalytiques (Cys336Tyr, Asp55Asn, Arg176Gln, Gly59Pro) ou conservées (Arg222Cys) du gène (Table 2-2, p.132, chapitre II). Un des résultats importants de notre étude a été l'identification d'une mutation (Thr131Pro, isolat 2) située hors des sites catalytiques ou conservés du gène, mais qui a tout de même été associée à la résistance du VHS à l'ACV. D'autre part, une autre mutation (Asp286Glu, isolat 4a) (Table 2-1, p.131, chapitre II), située dans une région conservée du gène de la TK (région 6), n'a pas été impliquée dans la résistance du parasite au GCV (CI_{50} du *Leishmania* au GCV : 60,0 μM) et n'est donc pas associée à la résistance du VHS à l'ACV. Ces résultats confirment donc la nécessité de démontrer le rôle fonctionnel d'une mutation dans la résistance du VHS et le système

d'expression de la TK chez le parasite *Leishmania* s'est avéré hautement efficace à cet effet.

Un autre cas pour lequel ce système s'est avéré particulièrement intéressant est lorsque des mutations sont identifiées dans les deux gènes (TK et ADN pol) impliqués dans la résistance du VHS (isolat 6b) (Table 2-2, p.132, chapitre II). En effet, la contribution de la mutation au sein du gène de la TK (délétion d'un C au nt 463) dans la résistance à l'ACV a pu être confirmée de façon certaine avec le nouveau système (CI_{50} du *Leishmania* au GCV : 6391 µM). Par contre, l'apport de la mutation Asp912Val observée dans le gène de l'ADN pol du même isolat dans la résistance à l'ACV reste à être démontré. En effet, ce système ne pouvait pas être utilisé afin d'exprimer le gène de l'ADN pol du VHS puisque l'activité polymérase endogène forcément présente chez ce parasite viendrait biaiser les résultats de sensibilité. Un autre système a donc dû être mis au point afin de vérifier le rôle de cette mutation (voir plus bas). Pour certains virus résistants (isolats 5b et 8) (Table 2-2, p.132), plus d'une mutation a été identifiée dans le gène de la TK. Malheureusement, notre système d'expression ne permet pas de déterminer le rôle respectif de chacune de ces mutations (Asp55Asn, Arg222His, Glu39Gly, délétion d'un G au nt 779 entraînant un codon stop en position 263) dans la résistance. Il serait toutefois possible, en utilisant le même vecteur d'expression, d'introduire des mutations dans le gène de la TK à l'aide de la mutagenèse dirigée, et de déterminer la sensibilité des parasites transfectés avec de telles TK au GCV. Cette méthode permettrait donc d'évaluer le rôle spécifique de chacune de ces mutations de même que le rôle d'autres mutations encore inconnues jusqu'à maintenant. Un tel système permettrait une caractérisation exhaustive des mutations dans le gène de la TK du VHS impliquées dans la résistance aux analogues des nucléosides de même que dans le polymorphisme génétique du VHS.

La résistance extrême (CI_{50} : > 5000 µM) des parasites transfectés avec des TK mutantes ne permet pas de démontrer les différents niveaux de résistance conférés par les mutations. On a vu que différents types de mutation dans ce gène peuvent entraîner la production d'une TK-, faible ou encore altérée et il est donc possible de croire que ces mutations mènent à des niveaux de résistance variés aux analogues des nucléosides. Cependant, ce phénomène a pour l'instant été peu étudié. D'autres vecteurs d'expression (pFHLTG-TK et

pTUPACTET) (Shaofeng Yana, Université de Washington, WA) qui permettent une régulation contrôlée de l'expression du gène de la TK par la tétracycline chez le parasite *Leishmania* pourraient cependant s'avérer intéressants à utiliser à cet effet. Un certain seuil d'expression du gène de la TK pourrait être établi et favoriserait la démonstration des niveaux de résistance conférés par différents types de mutations.

Finalement, notre système d'expression du gène de la TK pourrait également être utile pour déterminer la sensibilité de spécimens cliniques de VHS qui ne peuvent être isolés en culture. Par exemple, les virus causant des infections dans le SNC et présents dans le LCR sont rarement isolés en culture et pour l'instant il n'est pas possible de déterminer leur sensibilité à l'ACV. Puisque notre système ne requiert pas d'isolement du VHS en culture, et que seulement une amplification par PCR du gène de la TK est requise, il serait maintenant possible de déterminer la sensibilité de ces virus aux analogues des nucléosides. L'expression du gène de la TK d'autres virus de la famille des *herpesviridae* (VZV, HHV-8, EBV) et d'autres gènes probablement impliqués dans la phosphorylation des analogues des nucléosides, dans le cas où aucun équivalent TK n'a été identifié (CMV ; UL97, HHV-6 ; U69 et HHV-7 ; U69), serait également possible. Ce système serait alors profitable pour faciliter l'identification des mutations impliquées dans la résistance et/ou élucider le rôle de ces gènes dans le mécanisme d'action des analogues des nucléosides.

Le deuxième objectif du projet de recherche consistait en la caractérisation des mutations dans le gène de l'ADN pol du VHS impliquées dans la résistance aux antiviraux. Malgré le fait que le mécanisme de résistance du VHS à l'ACV est principalement dû à des mutations au sein du gène de la TK virale (Gilbert *et al*., 2002), des mutations dans le gène de l'ADN pol pourraient être plus problématiques puisque cette dernière enzyme est la cible ultime de tous les agents anti-herpétiques. Plusieurs études portant sur la résistance clinique à l'ACV ont été réalisées, mais peu de données existaient sur la résistance clinique au FOS et encore moins aux ANP (i.e. CDV et ADV). En effet, le manque de disponibilité d'isolats cliniques de VHS résistant au FOS et la possibilité que des mutations dans le gène de l'ADN pol entraînent une diminution de la capacité réplicative de ces virus rend difficile l'étude des VHS résistant à ces antiviraux. Le site de liaison de ceux-ci sur l'ADN pol virale n'était

donc pas jusqu'à maintenant encore bien connu de même que les profils de résistance croisée conférés par des mutations au sein de ce gène.

Nous avons tout d'abord cherché à déterminer les profils de résistance conférés par des mutations dans le gène de l'ADN pol du VHS à ces quatre antiviraux (ACV, FOS, CDV, ADV). Quatorze isolats de VHS provenant de 7 patients sidéens ayant subit un échec séquentiel au traitement à l'ACV puis au FOS ont fait l'objet de cette étude (Table 3-1, p.147, chapitre III). La mesure des CI_{50} des isolats post-FOS a permis de confirmer leur résistance *in vitro* au FOS (CI_{50} ≥100 µg/ml ou une CI_{50} 3 fois supérieur à la souche sensible prélevée du même patient (isolat pré-FOS)). Les résultats des CI_{50} à l'ADV (Table 3-1, p.147, chapitre III) ont révélé que les isolats résistant au FOS sont également moins sensibles à l'ADV (augmentation moyenne des CI_{50} : 4,6 fois; écarts : 1,2 à 8,6 fois) lorsque comparés aux souches pré-FOS prélevées du même patient ou des souches de type sauvages. Un seul isolat résistant au FOS (patient 6) possédait toujours une sensibilité à l'ADV (augmentation de la CI_{50} de 1,2 fois). La résistance croisée observée entre le FOS et l'ADV concordait également avec d'autres études effectuées chez des souches de VHS-1 et -2 dérivées en laboratoire de même que chez des CMV recombinants ADN pol mutants (Andrei *et al.*, 2000, Cihlar *et al.*, 1998a). Finalement, mis à part un isolat (isolat 1 post-FOS, augmentation de la CI_{50} de 2,7 fois par rapport à la souche sensible) aucune autre souche virale n'a démontré une diminution significative de la sensibilité au CDV.

La caractérisation génotypique de ces isolats a révélé la présence d'une seule mutation dans les régions conservées II, III, VI, et entre les régions I et VII du gène de l'ADN pol dans tous les isolats (patients 1 à 6), à l'exception des trois isolats prélevés chez le patient 7 qui comportaient tous deux mutations dans le gène de l'ADN pol (région II et entre les régions I et VII) (Table 3-1, p.147, chapitre III). D'autre part, aucune mutation dans le gène de l'ADN pol n'a pu être identifiée chez les souches pré-FOS. Il était donc grandement probable, dans le cas où une seule mutation a été identifiée, que celle-ci était bel et bien responsable du phénotype de résistance observé. De façon générale, nos résultats ont donc démontré que des mutations identifiées dans les régions conservées II, VI et entre les régions I et VII sont associées à une résistance croisée au FOS et à l'ADV, mais à la sensibilité à l'ACV et au CDV. En effet, une seule mutation (L850I, région III) présente

dans l'isolat prélevé chez le patient 6 n'a pas été associée au profil de résistance croisé au FOS et à l'ADV, ce qui pourrait suggérer que ces deux antiviraux ne partagent pas exactement les mêmes sites de liaison sur l'ADN pol du VHS. Un seul isolat (5, post-FOS) possédait également une résistance croisée à l'ACV, mais une mutation dans le gène de la TK avait simultanément été identifiée (délétion d'un C au nt 463) en combinaison avec celle du gène de l'ADN pol (D912V). Puisque le rôle de cette mutation (TK) dans la résistance à l'ACV a été confirmé par le système d'expression chez le parasite *Leishmania* (Table 2-2, p.132, chapitre II), la contribution de la mutation D912V, située entre les régions II et VII de cet isolat restait à être déterminée.

Les résultats de cette étude nous ont permis d'établir la relation étroite entre les profils de sensibilité/résistance au FOS et à l'ADV. D'un autre côté, la présence des mutations identifiées dans l'ADN pol n'a pas affecté la sensibilité du VHS au CDV, un antiviral qui fait partie de la même classe que l'ADV. L'identification de mutations impliquées dans la résistance du VHS au CDV demeurait donc inexistante et plusieurs résultats obtenus dans cette étude devaient être confirmés. Par exemple, l'absence de résistance croisée entre le FOS et l'ACV des isolats post-FOS restait à être vérifiée. En effet, certaines études effectuées avec des souches de VHS dérivées en laboratoire avaient démontré une résistance croisée entre l'ACV et le FOS conférée par des mutations dans le gène de l'ADN pol et ce, même avec une des mutations identifiées dans notre étude (S724N) (Andrei *et al*., 2000, Gibbs *et al*., 1988, Larder *et al*., 1987). Nos résultats concordaient toutefois avec ceux rapportés par d'autres équipes de recherche en ce qui concerne la sensibilité au FOS et au GCV (un composé analogue à l'ACV) chez le CMV. Ces équipes rapportaient en effet que les souches de CMV contenant des mutations dans les régions conservées II, VI et III sont généralement résistantes au FOS mais demeurent sensibles au GCV (Baldanti *et al*., 1996, Chou *et al*., 1998). Dans le cadre de notre étude, la résistance des isolats cliniques de VHS avait été déterminée par la MRP en utilisant une valeur de CI_{50} de 2 µg/ml qui est maintenant bien acceptée en tant que valeur délimitant la résistance du VHS à l'ACV (Safrin *et al*., 1994a). D'un autre côté, la comparaison des valeurs de CI_{50} entre une souche mutante et une souche sensible prélevée chez le même patient demeure un élément très important pour apprécier un changement dans la sensibilité des isolats conféré par une mutation. Les isolats pré-FOS de notre étude ne pouvaient cependant pas servir de souche

contrôle pour la mesure des CI_{50} à l'ACV, puisque qu'ils comportaient tous des mutations dans le gène de la TK, identifiées comme entraînant la résistance à l'ACV (Bestman-Smith *et al*., 2001). La non disponibilité de souches de type sauvage (sans mutation dans le gène de la TK) a également été problématique quant à l'analyse des résultats concernant la résistance au CDV. En effet, on a vu que l'absence d'activité TK du VHS pouvait possiblement entraîner une hypersensibilité de ces souches au CDV. Puisqu'aucune valeur de CI_{50} délimitant la résistance du VHS au CDV n'a pour le moment été validée, il était impossible d'associer aisément une mutation dans le gène de l'ADN pol à la résistance au CDV.

Finalement, la contribution spécifique de chacune des deux mutations identifiées dans le gène de l'ADN pol des isolats prélevés chez le patient 7 (S724N et P920S) ainsi que le rôle spécifique de la mutation D912V (isolat post-FOS du patient 5) (Table 3-1, p.147, chapitre III), située hors des régions conservées du gène, demeuraient à être évalués. Le rôle de l'ensemble des mutations identifiées dans le gène de l'ADN pol des isolats cliniques présentés dans cette étude, dans la résistance aux antiviraux, restait également à être confirmé par une méthode adéquate. C'est dans cette optique que nous avons mis au point le système de cosmides et de plasmides recombinants permettant de générer des VHS mutants afin de faciliter l'étude des mutations au sein du gène de l'ADN pol du VHS.

L'équipe du Dr Cunnigham et ses collaborateurs avaient préalablement décrit un système de 5 cosmides dont les inserts couvrent l'ADN complet de la souche du VHS-1 de type 17 (Cunningham & Davison, 1993). Puisque dans notre cas, le gène d'intérêt consistait en l'ADN pol et que ce système n'avait pas été conçu à cet effet, nous avons dû le modifier en conséquence. Le gène codant pour l'ADN pol complet du VHS a été isolé sur un plasmide (pPOL6) à partir d'un des cosmides (cos71) afin de faciliter l'introduction de mutations à l'aide de la mutagenèse dirigée. Deux autres plasmides (pNEB23 et pNEB10) devaient également être construits pour remplacer le cos71 et ainsi permettre une recombinaison efficace avec les autres cosmides (voir Figure 9, p.172, chapitre IV). La transfection des 4 cosmides et des 3 plasmides dans les cellules Véro a en effet permis la recombinaison de l'ADN et la formation de virus complets dont l'effet cytopathique a pu, de façon générale, être apprécié en l'espace de trois jours. Ainsi, à l'aide de la mutagenèse dirigée et du

plasmide pPOL6, 19 mutations simples et une double mutation ont pu être introduites dans le gène de l'ADN pol des virus recombinants. Leur rôle dans la résistance aux antiviraux et dans la réplication virale a pu être évalué par la MRP et par décompte des plages de lyse en fonction du temps, respectivement. L'ensemble des résultats obtenus avec ce nouveau système (Table 4-1, p.171, chapitre IV) nous a permis d'établir un rôle fonctionnel pour la partie centrale (régions II et VI) des régions conservées du gène de l'ADN pol dans la reconnaissance des antiviraux. En effet, la majorité des mutations introduites dans ces régions a entraîné un phénotype de résistance des virus recombinants à l'ACV, au FOS ainsi qu'à l'ADV et même, dans certains cas (mutations : S724N et L778M), une baisse significative de la sensibilité au CDV a été observée. D'un autre côté, un rôle plutôt associé à l'activité réplicative de l'enzyme a été relié aux extrémités de celle-ci (régions δ-C, I, V et VII). Les hauts niveaux de résistance à l'ACV au FOS et à l'ADV associés avec la mutation générée dans la région conservée I (F891C) (Table 4-1, p.171, chapitre IV) de même que la réduction drastique des capacités réplicatives des virus mutants (Figure 11, p.174, chapitre IV) sont venus confirmer le rôle primordial déjà démontré pour cette région dans l'activité fonctionnelle de l'enzyme (Marcy *et al*., 1990a). L'étude des mutations au sein de la région conservée III ne nous a cependant pas permis d'établir un profil de résistance spécifique, ce qui va également dans le même sens que les travaux effectués avec des CMV recombinants (Cihlar *et al*., 1998a). Des phénotypes de sensibilité, d'hypersensibilité et même de résistance aux différents antiviraux ont été obtenus avec les différentes mutations localisées dans cette région. Le rôle spécifique de la région III dans la reconnaissance des antiviraux demeure donc encore obscur, mais il est soupçonné que des mutations ponctuelles bien spécifiques pourraient être à l'origine d'un changement conformationnel de l'enzyme modifiant l'affinité de celle-ci pour ces antiviraux, ce qui expliquerait en partie les niveaux de sensibilités variables conférés par différentes mutations au sein de cette même région.

Le polymorphisme génétique de l'ADN pol était jusqu'à maintenant peu connu, et dans le but d'élargir nos connaissances à ce sujet, quelques mutations déjà rapportées ont été introduites entre les régions conservées (I et VII, et après la région V) du gène. Le rôle de deux de ces mutations (P920S, L1007M) dans la résistance antivirale a pu être exclu, alors qu'une autre (D907V), située entre les régions conservées I et VII, a été associée à une

diminution significative de la sensibilité des virus recombinants à plusieurs antiviraux (ACV, FOS et ADV). Tel que discuté préalablement, cette dernière mutation (correspondante à la mutation D912V dans l'ADN pol du VHS-2) avait simultanément été identifiée avec une autre mutation située dans le gène de la TK d'un isolat clinique de VHS-2 (isolat 5b) (Table 2-2, p.132, chapitre II), et son rôle dans la résistance à l'ACV aurait facilement pu être écarté sans confirmation précise à l'aide d'un système adéquat. Ces résultats révèlent donc encore une fois l'importance de déterminer avec précision le rôle fonctionnel des mutations virales, et ce, même si celles-ci ne semblent pas, de par leur localisation ou la présence d'autres mutations, impliquées dans la résistance aux antiviraux. D'autre part, la diversité des régions impliquées dans la reconnaissance des antiviraux dénote la complexité de ce phénomène qui doit certainement impliquer l'association de plusieurs régions conservées de même qu'une interaction possible avec les domaines situées entre celles-ci. L'analyse de la structure tridimensionnelle de l'ADN pol du VHS, telle que déjà décrite pour certaines ADN pol de type α (Franklin *et al*., 2001, Huang *et al*., 1999, Wang *et al*., 1997), permettrait de visualiser les changements de conformation de la protéine entraînés par les mutations dans ce gène. Ainsi, il serait possible d'apprécier l'interaction des antiviraux avec l'ADN pol du VHS pour finalement mieux comprendre les mécanismes de résistance du VHS aux antiviraux.

Nos travaux effectués avec les virus recombinants ont une fois de plus révélé l'importance d'obtenir des isolats de VHS prélevés avant la thérapie et isolés du même patient afin de déterminer les niveaux de résistance conférés par une mutation virale. Notre système de cosmides et de plasmides recombinants a l'avantage de permettre l'utilisation de virus recombinants de type sauvage construits à partir du même "background" génétique que les virus recombinants mutants. En effet, l'avantage principal de notre nouveau système réside dans le fait que les populations virales générées par la recombinaison des plasmides et des cosmides sont forcément homogènes. Contrairement à la méthode de transfection et de recombinaison homologue, l'étape visant à sélectionner les virus recombinants comprenant la mutation introduite avec un antiviral n'est donc plus nécessaire, et la génération possible de nouvelles mutations dans le gène d'intérêt peut être éliminée. De plus, tel que discuté préalablement (section 4.6, p.158, chapitre IV), plusieurs évidences suggèrent que la génération de mutations aux différents sites de recombinaisons est peu probable. Une

comparaison précise des sensibilités des virus recombinants mutants avec les virus de type sauvage est donc possible avec notre système, et seul l'effet de la mutation introduite dans le gène de l'ADN pol est mesuré.

Nous avons donc pu confirmer de façon définitive le rôle de plusieurs mutations préalablement décrites dans des souches cliniques de VHS ou dérivées en laboratoire de même que d'autres, initialement décrites dans le gène de l'ADN pol du CMV. Par exemple, un rôle fonctionnel dans la résistance à l'ACV a pu être décrit pour les mutations observées dans le gène de l'ADN pol des isolats cliniques de VHS de notre étude (Table 3-1, p.147, chapitre III), préalablement identifiées comme n'ayant aucun rôle spécifique à jouer dans la résistance à cet antiviral et ce, principalement dû au fait que des souches sauvages prélevées chez ces mêmes patients n'étaient pas disponibles. Les mutations impliquées dans la résistance au FOS (A719T, S724N, L778M, D780N, D907V) se sont donc également révélées comme étant associées à une réduction significative de la sensibilité à l'ACV tel que d'abord perçues par d'autres études effectuées avec des souches de VHS dérivées en laboratoire (Andrei *et al*., 2000, Gibbs *et al*., 1988, Larder *et al*., 1987). Ici, nos travaux révèlent également que pour certaines d'entre elles (S724N, L778M), une diminution significative de la sensibilité au CDV et à l'ADV peut être obtenue, confirmant l'hypothèse qu'une seule mutation dans le gène de l'ADN pol peut être à l'origine de la résistance du VHS à tous les agents anti-herpétiques actuellement disponibles. De façon importante, ces mutations ont déjà été décrites dans des souches cliniques de VHS, uniquement sélectionnées avec un traitement à l'ACV et au FOS. De plus, une de ces mutations (S724N) s'avère être la mutation la plus fréquemment sélectionnée en laboratoire de même que chez les isolats cliniques (Andrei *et al*., 2000, Gibbs *et al*., 1988, Larder *et al*., 1987, Schmit & Boivin, 1999). Les recherches pour le développement de nouvelles molécules antivirales ayant comme cible d'autres enzymes virales s'avèrent donc des plus pertinentes. De façon importante, plusieurs autres mutations (R700M, T821M et I1028T) ont pu être associées à une baisse significative de la sensibilité du VHS au CDV, ce qui permet enfin d'avoir certaines données concernant les mutations impliquées dans la résistance du VHS à cet antiviral.

Finalement, à la lumière des résultats obtenus avec nos travaux de recherche sur l'identification des mutations virales impliquées dans la résistance du VHS aux antiviraux, certaines lignes de conduite à préconiser quand au traitement des infections au VHS résistantes aux antiviraux peuvent être suggérées. Par exemple, suite à un échec au traitement avec le FOS, un retour au traitement à l'ACV pourrait ne pas s'avérer une alternative thérapeutique intéressante. En effet, nous avons pu confirmer que la majorité des virus résistant au FOS sont également résistant à l'ACV. Un essai avec le CDV pourrait toutefois être tenté avec succès, mais la possible émergence de la résistance du VHS à cet antiviral ne devrait pas être écartée. Finalement, nos résultats ont permis de confirmer que l'ADV, même en étant un analogue du CDV, ne constituerait pas une alternative pertinente dans le cas où l'infection herpétique ne répondrait pas au FOS.

Un bon nombre de mutations dans le gène de l'ADN pol du VHS a pu être caractérisé et il serait maintenant intéressant de vérifier l'implication clinique de certaines d'entre elles, i.e. leur capacité à entraîner des infections *in vivo*. En effet, la sélection de mutations virales risque également d'affecter d'autres fonctions virales, et entre autres, la pathogénicité des virus. Tel que discuté précédemment, les études effectuées sur ce sujet ont été principalement centrées sur le gène de la TK virale qui semble essentiel à la réactivation des virus de leur latence, alors que l'effet des mutations au sein du gène de l'ADN pol dans la pathogénicité chez la souris n'est pas encore très bien compris. Nos expériences en culture cellulaire nous ont permis d'avoir un aperçu de l'implication de certaines mutations (V573M, N961K, V715M, L778M, Y941H, G891C) sur la capacité réplicative des virus (Figure 11, p.174 et Figure 12, p.175, chapitre IV). Il serait donc intéressant de vérifier l'implication de ces observations sur la pathogénicité de ces souches mutantes *in vivo*.

Dans un premier temps, la pathogénicité des virus recombinants sauvages pourrait être mesurée à l'aide de deux modèles d'infection expérimentale chez la souris déjà couramment utilisés dans notre laboratoire. Le premier consiste en une encéphalite virale engendrée par l'inoculation de souris BALB/c par voie intranasale avec le VHS (Boivin *et al*., 2002). Cette technique servira à évaluer la neurovirulence des virus en observant la capacité de ceux-ci à entraîner les signes cliniques de l'encéphalite et la mort éventuelle des souris. L'autre modèle également intéressant à investiguer est basé sur le développement

d'une éruption cutanée zostériforme suite à la réactivation de virus latents des ganglions sympathiques dorsaux (Piret *et al*., 2000a, Piret *et al*., 2000b). Brièvement, des souris "hairless" sont inoculées avec du VHS suite à la scarification de la peau de la région lombaire. Des lésions herpétiques peuvent alors être observées suite à une période d'environ 5 jours post-infection. Les titres viraux de même que le potentiel virulent des souches de VHS peuvent ensuite être mesurés par la MRP à partir de biopsies de peau et par l'évaluation de l'extension de l'éruption cutanée. La capacité des virus recombinants comprenant les différentes mutations au sein du gène de l'ADN pol à engendrer les divers signes cliniques de l'infection du SNC et du SNP démontrés à l'aide de ces deux méthodes pourra donc être évaluée et comparée aux virus recombinants de type sauvage. La possibilité d'introduire toute mutation dans le gène de l'ADN pol des virus recombinants à l'aide de notre nouveau système pourra alors grandement servir à approfondir nos connaissances sur les propriétés pathogènes du VHS et ainsi identifier les mutations virales les plus susceptibles d'entraîner des infections problématiques chez l'humain.

Les résultats concluants obtenus avec notre nouveau système de cosmides et de plasmides recombinants nous permettent de croire en l'utilité de la mise au point de ces nouvelles stratégies afin de mieux caractériser les gènes viraux. Toujours dans la même optique, et dans le but d'améliorer la qualité de notre système, quelques modifications pourraient être apportées. Par exemple, pour diminuer le nombre de sites de recombinaisons et ainsi prévenir de façon plus certaine la génération de mutations aux sites de recombinaisons, le plasmide pPOL6 pourrait être modifié. Des sites de restriction enzymatique ne se retrouvant nulle part ailleurs dans le génome du VHS pourraient être introduits par mutagenèse dirigée aux extrémités de la région codant pour l'ADN pol. Un nouveau virus recombinant pourvu de ces nouveaux sites de restrictions uniques serait d'abord reconstitué par la transfection des 4 cosmides et des trois plasmides comprenant le nouveau plasmide pPOL6 modifié. Ce dernier virus recombinant servirait de souche parentale pour les expériences subséquentes. Par la suite, la génération des virus mutants pourrait simplement être effectuée par la digestion enzymatique du génome de cette nouvelle souche parentale et d'un plasmide pPOL6 muté suivi d'une recombinaison lors de la transfection dans des cellules permissives.

Un système de chromosome artificiel bactérien (BAC) pourrait également servir à générer de façon rapide des virus recombinants. Un tel système, afin de générer des virus recombinants, a déjà été décrit pour le CMV et le VHS (Borst *et al*., 1999, Horsburgh *et al*., 1999, Messerle *et al*., 1997, Stavropoulos & Strathdee, 1998, Suter *et al*., 1999). Le génome complet de ces virus est donc cloné en tant que BAC et le gène à l'étude (ADN pol et/ou TK) est inactivé. Un plasmide comprenant l'ADN pol complet ou la TK du VHS pourrait ensuite être construit et utilisé afin de permettre la mutagenèse dirigée et l'introduction de mutations spécifiques dans ces gènes. Les bactéries sont alors transformées avec le gène muté qui sera incorporé dans le BAC par recombinaison homologue. Les virus recombinants peuvent donc être facilement et rapidement générés. Cette méthode comporte également l'avantage de pouvoir générer des virus comprenant des mutations à la fois dans le gène de la TK et dans le gène de l'ADN pol, ce qui permettrait d'étudier plusieurs types de mutations à la fois. Un gène rapporteur (LUC, GFP) pourrait également être introduit dans le BAC afin d'évaluer le tropisme et la capacité réplicative des souches virales.

Les antiviraux utilisés contre les infections herpétiques demeurent parmi les meilleurs exemples de thérapie antivirale sélective, efficace et peu toxique. Malgré tout, des virus résistants sont sélectionnés par ces médicaments et réussissent à se répliquer et à entraîner des infections chez les individus immunosupprimés. Les deux nouveaux systèmes mis au point dans le cadre de mes études au doctorat de même que l'ensemble des résultats obtenus avec les isolats cliniques de VHS et présentés dans cette thèse ont permis d'éclaircir les mécanismes de résistance du VHS aux antiviraux. Une identification plus rapide et plus précise de la résistance antivirale sera maintenant possible, ce qui facilitera l'approche thérapeutique des patients infectés. De plus, ces nouveaux systèmes pourront servir à la caractérisation d'autres gènes viraux impliqués dans divers fonctions du VHS. Cela permettera certainement de faciliter l'avancement des recherches dans l'étude passionnante, mais toutefois complexe, des infections causées par les virus herpétiques.

Bibliographie de l'introduction générale

Aduma, P., Connelly, M. C., Srinivas, R. V. & Fridland, A. (1995). Metabolic diversity and antiviral activities of acyclic nucleoside phosphonates. *Mol Pharmacol* **47**, 816-22.

Ahonen, C. L., Gibson, S. J., Smith, R. M., Pederson, L. K., Lindh, J. M., Tomai, M. A. & Vasilakos, J. P. (1999). Dendritic cell maturation and subsequent enhanced T-cell stimulation induced with the novel synthetic immune response modifier R-848. *Cell Immunol* **197**, 62-72.

Alwine, J. C., Steinhart, W. L. & Hill, C. W. (1974). Transcription of herpes simplex type 1 DNA in nuclei isolated from infected HEp-2 and KB cells. *Virology* **60**, 302-7.

Amir, J., Harel, L., Smetana, Z. & Varsano, I. (1997). Treatment of herpes simplex gingivostomatitis with aciclovir in children: a randomised double blind placebo controlled study. *Bmj* **314**, 1800-3.

Anderson, B. J. (1999). The effectiveness of valacyclovir in preventing reactivation of herpes gladiatorum in wrestlers. *Clin J Sport Med* **9**, 86-90.

Andrei, G., Snoeck, R. & De Clercq, E. (1995). Susceptibilities of several drug-resistant herpes simplex virus type 1 strains to alternative antiviral compounds. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 1632-1635.

Andrei, G., Snoeck, R., De Clercq, E., Esnouf, R., Fiten, P. & Opdenakker, G. (2000). Resistance of herpes simplex virus type 1 against different phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purines and pyrimidines due to specific mutations in the viral DNA polymerase gene. *J Gen Virol* **81**, 639-648.

Andrei, G., Snoeck, R. & DeClercq, E. (1997). Differential susceptibility of several drug-resistant strains of herpes simplex virus type 2 to various antiviral compounds. *Antimicrob Agents Chemother* **8**, 457-461.

Arthur, J. L., Scarpini, C. G., Connor, V., Lachmann, R. H., Tolkovsky, A. M. & Efstathiou, S. (2001). Herpes simplex virus type 1 promoter activity during latency establishment, maintenance, and reactivation in primary dorsal root neurons in vitro. *J Virol* **75**, 3885-95.

Ashley, R. L. (2001). Sorting out the new HSV type specific antibody tests. *Sex Transm Infect* **77**, 232-7.

Ashley, R. L., Wald, A. & Eagleton, M. (2000). Premarket evaluation of the POCkit HSV-2 type-specific serologic test in culture-documented cases of genital herpes simplex virus type 2. *Sex Transm Dis* **27**, 266-9.

Auvert, B., Ballard, R., Campbell, C., Carael, M., Carton, M., Fehler, G., Gouws, E., MacPhail, C., Taljaard, D., Van Dam, J. & Williams, B. (2001). HIV infection among youth in a South African mining town is associated with herpes simplex virus-2 seropositivity and sexual behaviour. *Aids* **15**, 885-98.

Bacon, T. H., Boon, R. J., Schultz, M. & Hodges-Savola, C. (2002). Surveillance for antiviral-agent-resistant herpes simplex virus in the general population with recurrent herpes labialis. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 3042-4.

Bacon, T. H., Levin, M. J., Leary, J. J., Sarisky, R. T. & Sutton, D. (2003). Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin Microbiol Rev* **16**, 114-28.

Bader, C., Crumpacker, C. S., Schnipper, L. E., Ransil, B., Clark, J. E., Arndt, K. & Freedberg, I. M. (1978). The natural history of recurrent facial-oral infection with herpes simplex virus. *J Infect Dis* **138**, 897-905.

Balasubramaniam, N. K., Veerisetty, V. & Gentry, G. A. (1990). Herpesviral deoxythymidine kinases contain a site analogous to the phosphoryl-binding arginine-rich region of porcine adenylate kinase; comparison of secondary structure predictions and conservation. *J Gen Virol* **71**, 2979-2987.

Baldanti, F., Underwood, M. R., Stanat, S. C., Biron, K. K., Chou, S., Sarasini, A., Silini, E. & Gerna, G. (1996). Single amino acid changes in the DNA polymerase confer foscarnet resistance and slow-growth phenotype, while mutations in the UL97-encoded phosphotransferase confer ganciclovir resistance in three double-resistant human cytomegalovirus strains recovered from patients with AIDS. *J Virol* **70**, 1390-1395.

Balfour, H. H., Jr. (1999). Antiviral drugs. *N Engl J Med* **340**, 1255-68.

Balfour, H. H. J. (1988). Acyclovir. In *The antimicrobial agents annual*, pp. 345-60. Edited by P. K. Peterson & J. Verhoef. New York: Elsevier Science.

Balzarini, J., Hao, Z., Herdewijn, P., Johns, D. G. & De Clercq, E. (1991). Intracellular metabolism and mechanism of anti-retrovirus action of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, a potent anti-human immunodeficiency virus compound. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1499-503.

Batterson, W. & Roizman, B. (1983). Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes. *J Virol* **46**, 371-7.

Baumann, B., Potash, M. J. & Kohler, G. (1985). Consequences of frameshift mutations at the immunoglobulin heavy chain locus of the mouse. *EMBO-J* **4**, 351-9.

Bell, W., Chulay, J. & Feinberg, J. (1997). Manifestations resembling thrombotic microangiopathy in patients with advanced human immunodeficiency virus (HIV) disease in a cytomegalovirus prophylaxis trial (ACTG 204). *Medicine* **76**, 369-80.

Benedetti, J., Corey, L. & Ashley, R. (1994). Recurrence rates in genital herpes after symptomatic first-episode infection. *Ann Intern Med* **121**, 847-54.

Bergstrom, T. (2000). Several options for antiviral treatment trials in multiple sclerosis--but which targets should be selected? *Expert Opin Pharmacother* **1**, 1087-90.

Bernad, A., Blanco, L., Lazaro, J. M., Martin, G. & Salas, M. (1989). A conserved 3'----5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell* **59**, 219-28.

Bernad, A., Lazaro, J. M., Salas, M. & Blanco, L. (1990). The highly conserved amino acid sequence motif Tyr-Gly-Asp-Thr-Asp-Ser in alpha-like DNA polymerases is required by phage phi 29 DNA polymerase for protein-primed initiation and polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4610-4614.

Bernstein, D. I. & Stanberry, L. R. (1999). Herpes simplex virus vaccines. *Vaccine* **17**, 1681-9.

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

Bestman-Smith, J. & Boivin, G. (2003). Drug resistance patterns of recombinant herpes simplex virus DNA polymerase mutants generated with a set of overlapping cosmids and plasmids. *J Virol* **77**, 7820-9.

Bestman-Smith, J., Schmit, I., Papadopoulou, B. & Boivin, G. (2001). Highly reliable heterologous system for evaluating resistance of clinical herpes simplex virus isolates to nucleoside analogues. *J Virol* **75**, 3105-3110.

Binder, P. S. (1977). Herpes simplex keratitis. *Surv Ophthalmol* **21**, 313-31.

Biron, K. K., Stanat, S. C., Sorrell, J. B., Fyfe, J. A., Keller, P. M., Lambe, C. U. & Nelson, D. J. (1985). Metabolic activation of the nucleoside analog 9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl)guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 2473-7.

Blanco, L., Bernad, A., Blasco, M. A. & Salas, M. (1991). A general structure for DNA-dependent DNA polymerases. *Gene* **100**, 27-38.

Blanco, L., Bernad, A. & Salas, M. (1992). Evidence favouring the hypothesis of a conserved 3'-5' exonuclease active site in DNA-dependent DNA polymerases. *Gene* **112**, 139-144.

Block, T., Barney, S., Masonis, J., Maggioncalda, J., Valyi-Nagy, T. & Fraser, N. W. (1994). Long term herpes simplex virus type 1 infection of nerve growth factor-treated PC12 cells. *J Gen Virol* **75**, 2481-7.

Bodaghi, B., Mougin, C., Michelson, S., Agut, H., Dighiero, P., Offret, H. & Frau, E. (2000). Acyclovir-resistant bilateral keratitis associated with mutations in the HSV-1 thymidine kinase gene. *Exp Eye Res* **71**, 353-9.

Boivin, G., Coulombe, Z. & Rivest, S. (2002). Intranasal herpes simplex virus type 2 inoculation causes a profound thymidine kinase dependent cerebral inflammatory response in the mouse hindbrain. *Eur J Neurosci* **16**, 29-43.

Boivin, G., Edelman, C. K., Pedneault, L., Talarico, C. L., Biron, K. K. & Balfour, H. H. J. (1994). Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant varicella-zoster viruses isolated from persons with AIDS. *J Infect Dis* **170**, 68-75.

Bonneau, A. M., Kibler, P., White, P., Bousquet, C., Dansereau, N. & Cordingley, M. G. (1996). Resistance of herpes simplex virus type 1 to peptidomimetic ribonucleotide reductase inhibitors: selection and characterization of mutant isolates. *J Virol* **70**, 787-93.

Boon, R. J., Bacon, T. H., Robey, H. L., Coleman, T. J., Connolly, A., Crosson, P. & Sacks, S. L. (2000). Antiviral susceptibilities of herpes simplex virus from immunocompetent subjects with recurrent herpes labialis: a UK-based survey. *J Antimicrob Chemother* **46**, 1051.

Bork, K. & Brauninger, W. (1988). Increasing incidence of eczema herpeticum: analysis of seventy-five cases. *J Am Acad Dermatol* **19**, 1024-9.

Borst, E. M., Hahn, G., Koszinowski, U. H. & Messerle, M. (1999). Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in Escherichia coli: a new approach for construction of HCMV mutants. *J Virol* **73**, 8320-9.

Boursnell, M. E., Entwisle, C., Blakeley, D., Roberts, C., Duncan, I. A., Chisholm, S. E., Martin, G. M., Jennings, R., Ni Challanain, D., Sobek, I., Inglis, S. C. & McLean, C. S. (1997). A genetically inactivated herpes simplex virus type 2 (HSV-2) vaccine provides effective protection against primary and recurrent HSV-2 disease. *J Infect Dis* **175**, 16-25.

Boviatsis, E. J., Park, J. S., Sena-Esteves, M., Kramm, C. M., Chase, M., Efird, J. T., Wei, M. X., Breakefield, X. O. & Chiocca, E. A. (1994). Long-term survival of rats

harboring brain neoplasms treated with ganciclovir and a herpes simplex virus vector that retains an intact thymidine kinase gene. *Cancer Res.* **54**, 5745-5751.

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

Bravo, F. J., Bourne, N., Harrison, C. J., Mani, C., Stanberry, L. R., Myers, M. G. & Bernstein, D. I. (1996). Effect of antibody alone and combined with acyclovir on neonatal herpes simplex virus infection in guinea pigs. *J Infect Dis* **173**, 1-6.

Brocklehurst, P. (1998). Antenatal serum screening for genital herpes: a study of knowledge and attitudes of women at a central London hospital. *Br J Obstet Gynaecol* **105**, 125-6.

Brown, Z. A. (1998). Genital herpes complicating pregnancy. *Dermatol Clin* **16**, 805-10, xiv.

Brown, Z. A., Benedetti, J., Ashley, R., Burchett, S., Selke, S., Berry, S., Vontver, L. A. & Corey, L. (1991). Neonatal herpes simplex virus infection in relation to asymptomatic maternal infection at the time of labor. *N Engl J Med* **324**, 1247-52.

Brown, Z. A., Selke, S., Zeh, J., Kopelman, J., Maslow, A., Ashley, R. L., Watts, D. H., Berry, S., Herd, M. & Corey, L. (1997). The acquisition of herpes simplex virus during pregnancy. *N Engl J Med* **337**, 509-15.

Bryson, Y., Dillon, M., Bernstein, D. I., Radolf, J., Zakowski, P. & Garratty, E. (1993). Risk of acquisition of genital herpes simplex virus type 2 in sex partners of persons with genital herpes: a prospective couple study. *J Infect Dis* **167**, 942-6.

Bryson, Y. J., Dillon, M., Lovett, M., Acuna, G., Taylor, S., Cherry, J. D., Johnson, B. L., Wiesmeier, E., Growdon, W., Creagh-Kirk, T. & Keeney, R. (1983). Treatment of first episodes of genital herpes simplex virus infection with oral acyclovir. A randomized double-blind controlled trial in normal subjects. *N Engl J Med* **308**, 916-21.

Burke, R. L. (1992). Contemporary approaches to vaccination against herpes simplex virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **179**, 137-58.

Calistri, A., Parolin, C., Pizzato, M., Calvi, P., Giaretta, I. & Palu, G. (1999). Herpes simplex virus chronically infected human T lymphocytes are susceptible to HIV-1 superinfection and support HIV-1 pseudotyping. *J Acquir Immune Defic Syndr* **21**, 90-8.

Cannon, M. & Cesarman, E. (2000). Kaposi's sarcoma-associated herpes virus and acquired immunodeficiency syndrome-related malignancy. *Semin Oncol* **27**, 409-19.

Carter, K. L. & Roizman, B. (1996). The promoter and transcriptional unit of a novel herpes simplex virus 1 alpha gene are contained in, and encode a protein in frame with, the open reading frame of the alpha 22 gene. *J Virol* **70**, 172-8.

Caruso, M., Salomon, B., Zhang, S., Brisson, E., Clavel, F., Lowy, I. & Klatzmann, D. (1995). Expression of a Tat-inducible herpes simplex virus-thymidine kinase gene protects acyclovir-treated CD4 cells from HIV-1 spread by conditional suicide and inhibition of reverse transcription. *Virology* **206**, 495-503.

Cates, W., Jr. & Stone, K. M. (1992a). Family planning, sexually transmitted diseases and contraceptive choice: a literature update--Part I. *Fam Plann Perspect* **24**, 75-84.

Cates, W., Jr. & Stone, K. M. (1992b). Family planning, sexually transmitted diseases and contraceptive choice: a literature update--Part II. *Fam Plann Perspect* **24**, 122-8.

Chabalgoity, J. A., Khan, C. M., Nash, A. A. & Hormaeche, C. E. (1996). A Salmonella typhimurium htrA live vaccine expressing multiple copies of a peptide comprising

amino acids 8-23 of herpes simplex virus glycoprotein D as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C protects mice from herpes simplex virus infection. *Mol Microbiol* **19**, 791-801.

Chakrabarti, S., Pillay, D., Ratcliffe, D., Cane, P. A., Collingham, K. E. & Milligan, D. W. (2000). Resistance to antiviral drugs in herpes simplex virus infections among allogeneic stem cell transplant recipients: risk factors and prognostic significance. *J Infect Dis* **181**, 2055-8.

Chatis, P. A. & Crumpacker, C. S. (1991). Analysis of the thymidine kinase gene from clinically isolated acyclovir-resistant herpes simplex viruses. *Virology* **180**, 793-797.

Chen, C. Y., Ballard, R. C., Beck-Sague, C. M., Dangor, Y., Radebe, F., Schmid, S., Weiss, J. B., Tshabalala, V., Fehler, G., Htun, Y. & Morse, S. A. (2000a). Human immunodeficiency virus infection and genital ulcer disease in South Africa: the herpetic connection. *Sex Transm Dis* **27**, 21-9.

Chen, S., Cook, W., Grove, K. & Coen, D. (1998). Human thymidine kinase can functionally replace herpes simplex virus type 1 thymidine kinase for viral replication in mouse sensory ganglia and reactivation from latency upon explant. *J Virol* **72**, 6710 - 6715.

Chen, S. H., Kramer, M. F., Schaffer, P. A. & Coen, D. M. (1997). A viral function represses accumulation of transcripts from productive-cycle genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J Virol* **71**, 5878-84.

Chen, X. S., Han, G. Z., Guo, Z. P., Lu, N. Z., Chen, J. & Wang, J. B. (2000b). A comparison of topical application of penciclovir 1% cream with acyclovir 3% cream for treatment of genital herpes: a randomized, double-blind, multicentre trial. *Int J STD AIDS* **11**, 568-73.

Chen, Y., Scieux, C., Garrait, V., Socie, G., Rocha, V., Molina, J. M., Thouvenot, D., Morfin, F., Hocqueloux, L., Garderet, L., Esperou, H., Selimi, F., Devergie, A., Leleu, G., Aymard, M., Morinet, F., Gluckman, E. & Ribaud, P. (2000c). Resistant Herpes Simplex Virus Type 1 Infection: An Emerging Concern after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Clin Infect Dis* **31**, 927-935.

Cherrington, J. M., Fuller, M. D., Lamy, P. D., Miner, R., Lalezari, J. P., Nuessle, S. & Drew, W. L. (1998). In vitro antiviral susceptibilities of isolates from cytomegalovirus retinitis patients receiving first- or second-line cidofovir therapy: relationship to clinical outcome. *J Infect Dis* **178**, 1821-1825.

Chibo, D., Mijch, A., Doherty, R. & Birch, C. (2002). Novel mutations in the thymidine kinase and DNA polymerase genes of acyclovir and foscarnet resistant herpes simplex viruses infecting an immunocompromised patient. *J Clin Virol* **25**, 165-170.

Chiou, H. C., Kumura, D., Hu, A., Kerns, K. M. & Coen, D. M. (1995). Penciclovir-resistance mutations in the herpes simplex virus DNA polymerase gene. *Antiviral Chem Chemother* **6**, 281-288.

Chou, J., Kern, E. R., Whitley, R. J. & Roizman, B. (1990). Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science* **250**, 1262-6.

Chou, S., Marousek, G., Parenti, D. M., Gordon, S. M., LaVoy, A. G., Ross, J. G., Miner, R. C. & Drew, W. L. (1998). Mutation in region III of the DNA polymerase gene conferring foscarnet resistance in cytomegalovirus isolates from 3 subjects receiving prolonged antiviral therapy. *J Infect Dis* **178**, 526-30.

Chrisp, C. E., Sunstrum, J. C., Averill, D. R., Jr., Levine, M. & Glorioso, J. C. (1989). Characterization of encephalitis in adult mice induced by intracerebral inoculation of herpes simplex virus type 1 (KOS) and comparison with mutants showing decreased virulence. *Lab Invest* **60**, 822-30.

Christie, S. N., McCaughey, C., McBride, M. & Coyle, P. V. (1997). Herpes simplex type 1 and genital herpes in Northern Ireland. *Int J STD AIDS* **8**, 68-9.

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

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

Cihlar, T., Fuller, M. D., Mulato, A. S. & Cherrington, J. M. (1998b). A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene selected in vitro by cidofovir confers a slow replication phenotype in cell culture. *Virology* **248**, 382-393.

Coen, D. M., Irmiere, A. F., Jacobson, J. G. & Kerns, K. M. (1989a). Low levels of herpes simplex virus thymidine-thymidylate kinase are not limiting for sensitivity to certain antiviral drugs or for latency in a mouse model. *Virology* **168**, 221-231.

Coen, D. M., Kosz Vnenchak, M., Jacobson, J. G., Leib, D. A., Bogard, C. L., Schaffer, P. A., Tyler, K. L. & Knipe, D. M. (1989b). Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 4736-40.

Coen, D. M. & Schaffer, P. A. (1980). Two distinct loci confer resistance to acycloguanosine in herpes simplex virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2265-2269.

Cohen, J. I. (2000). Ebstein-Barr virus infection. *Medical Progress* **343**, 481-492.

Cohen, J. I., Brunell, P. A., Straus, S. E. & Krause, P. R. (1999). Recent advances in varicella-zoster virus infection. *Ann Intern Med* **130**, 922-32.

Cohen, P. R. (1994). Tests for detecting herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections. *Dermatol Clin* **12**, 51-68.

Cohen, S. M., Minkove, J. A., Zebley, J. W., 3rd & Mulholland, J. H. (1984). Severe but reversible neurotoxicity from acyclovir. *Ann Intern Med* **100**, 920.

Cohrs, R. J., Randall, J., Smith, J., Gilden, D. H., Dabrowski, C., van Der Keyl, H. & Tal-Singer, R. (2000). Analysis of individual human trigeminal ganglia for latent herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus nucleic acids using real-time PCR. *J Virol* **74**, 11464-71.

Collier, A., Schoenfeld, D. & Hirsch, M. (1998). Lack of effect on survival of high dose acyclovir and zidovudine compared with zidovudine alone for acquired immunodeficiency syndrome. *Antiviral Therapy* **3**, 25-32.

Collins, P. & Ellis, M. N. (1993). Sensitivity monitoring of clinical isolates of herpes simplex virus to acyclovir. *J Med Virol* **Suppl**, 58-66.

Collins, P., Larder, B. A., Oliver, N. M., Kemp, S., Smith, I. W. & Darby, G. (1989). Characterization of a DNA polymerase mutant of herpes simplex virus from a severely immunocompromised patient receiving acyclovir. *J Gen Virol* **70**, 375-382.

Cone, R. W., Hobson, A. C., Brown, Z., Ashley, R., Berry, S., Winter, C. & Corey, L. (1994). Frequent detection of genital herpes simplex virus DNA by polymerase chain reaction among pregnant women. *Jama* **272**, 792-6.

Corey, L. (1994). The current trend in genital herpes. Progress in prevention. *Sex Transm Dis* **21**, S38-44.

Corey, L. (2002). Challenges in genital herpes simplex virus management. *J Infect Dis* **186 Suppl 1**, S29-33.

Corey, L., Adams, H. G., Brown, Z. A. & Holmes, K. K. (1983). Genital herpes simplex virus infections: clinical manifestations, course, and complications. *Ann Intern Med* **98**, 958-72.

Corey, L. & Handsfield, H. H. (2000). Genital herpes and public health: addressing a global problem. *Jama* **283**, 791-4.

Corey, L., Nahmias, A. J., Guinan, M. E., Benedetti, J. K., Critchlow, C. W. & Holmes, K. K. (1982). A trial of topical acyclovir in genital herpes simplex virus infections. *N Engl J Med* **306**, 1313-9.

Costanzo, F., Campadelli-Fiume, G., Foa-Tomasi, L. & Cassai, E. (1977). Evidence that herpes simplex virus DNA is transcribed by cellular RNA polymerase B. *J Virol* **21**, 996-1001.

Cotarelo, M., Catalan, P., Sanchez-Carrillo, C., Menasalvas, A., Cercenado, E., Tenorio, A. & Bouza, E. (1999). Cytopathic effect inhibition assay for determining the in-vitro susceptibility of herpes simplex virus to antiviral agents. *J Antimicrob Chemother* **44**, 705-8.

Crumpacker, C. S. (1992). Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases. *Am-J-Med* **92**, 3s-7s.

Crumpacker, C. S., Schnipper, L. E., Marlowe, S. I., Kowalsky, P. N., Hershey, B. J. & Levin, M. J. (1982). Resistance to antiviral drugs of herpes simplex virus isolated from a patient treated with acyclovir. *N Engl J Med* **306**, 343-6.

Crute, J. J. & Lehman, I. R. (1989). Herpes simplex-1 DNA polymerase. Identification of an intrinsic 5'----3' exonuclease with ribonuclease H activity. *J Biol Chem* **264**, 19266-70.

Cunningham, A. L. & Merigan, T. C. (1983). gamma Interferon production appears to predict time of recurrence of herpes labialis. *J Immunol* **130**, 2397-400.

Cunningham, A. L. & Mikloska, Z. (2001). The Holy Grail: immune control of human herpes simplex virus infection and disease. *Herpes* **8 Suppl 1**, 6A-10A.

Cunningham, C. & Davison, A. J. (1993). A cosmid-based system for constructing mutants of herpes simplex virus type 1. *Virology* **197**, 116-124.

Cusini, M. & Ghislanzoni, M. (2001). The importance of diagnosing genital herpes. *J Antimicrob Chemother* **47 Suppl T1**, 9-16.

Da Costa, X. J., Bourne, N., Stanberry, L. R. & Knipe, D. M. (1997). Construction and characterization of a replication-defective herpes simplex virus 2 ICP8 mutant strain and its use in immunization studies in a guinea pig model of genital disease. *Virology* **232**, 1-12.

Da Costa, X. J., Jones, C. A. & Knipe, D. M. (1999). Immunization against genital herpes with a vaccine virus that has defects in productive and latent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6994-8.

Darby, G., Larder, B. A. & Inglis, M. M. (1986). Evidence that the "active centre" of the herpes simplex virus thymidine kinase involves an interaction between three distinct regions of the polypeptide. *J Gen Virol* **67**, 753-758.

Darougar, S., Woodland, R. M. & Walpita, P. (1987). Value and cost effectiveness of double culture tests for diagnosis of ocular viral and chlamydial infections. *Br J Ophthalmol* **71**, 673-5.

DasGupta, U. B. & Summers, W. C. (1978). Ultraviolet reactivation of herpes simplex virus is mutagenic and inducible in mammlian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2378-81.

de Bruyn Kops, A., Uprichard, S. L., Chen, M. & Knipe, D. M. (1998). Comparison of the intranuclear distributions of herpes simplex virus proteins involved in various viral functions. *Virology* **252**, 162-78.

de Miranda, P. & Blum, M. R. (1983). Pharmacokinetics of acyclovir after intravenous and oral administration. *J Antimicrob Chemother* **12 Suppl B**, 29-37.

Deiss, L. P., Chou, J. & Frenkel, N. (1986). Functional domains within the a sequence involved in the cleavage-packaging of herpes simplex virus DNA. *J Virol* **59**, 605-18.

Diaz, J. J., Dodon, M. D., Schaerer-Uthurralt, N., Simonin, D., Kindbeiter, K., Gazzolo, L. & Madjar, J. J. (1996). Post-transcriptional transactivation of human retroviral envelope glycoprotein expression by herpes simplex virus Us11 protein. *Nature* **379**, 273-7.

Diaz-Mitoma, F., Ruben, M., Sacks, S., MacPherson, P. & Caissie, G. (1996). Detection of viral DNA to evaluate outcome of antiviral treatment of patients with recurrent genital herpes. *J Clin Microbiol* **34**, 657-63.

Dixon, R. A. & Schaffer, P. A. (1980). Fine-structure mapping and functional analysis of temperature-sensitive mutants in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 immediate early protein VP175. *J Virol* **36**, 189-203.

Dorsky, D. I. & Crumpacker, C. S. (1988). Expression of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase gene by in vitro translation and effects of gene deletions on activity. *J Virol* **62**, 3224-32.

Dorsky, D. I. & Crumpacker, C. S. (1990). Site-specific mutagenesis of a highly conserved region of the herpes simplex virus type 1 DNA polymerase gene. *J Virol* **64**, 1394-1397.

Dorsky, D. I. & Plourde, C. (1993). Resistance to antiviral inhibitors caused by the mutation S889A in the highly-conserved 885-GDTDS motif of the herpes simplex virus type 1 DNA polymerase. *Virology* **195**, 831-835.

Duan, J., Liuzzi, M., Paris, W., Lambert, M., Lawetz, C., Moss, N., Jaramillo, J., Gauthier, J., Deziel, R. & Cordingley, M. G. (1998). Antiviral activity of a selective ribonucleotide reductase inhibitor against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 1629-35.

Earnshaw, D. L., Bacon, T. H., Darlison, S. J., Edmonds, K., Perkins, R. M. & Vere Hodge, R. A. (1992). Mode of antiviral action of penciclovir in MRC-5 cells infected with herpes simplex virus type 1 (HSV-1), HSV-2, and varicella-zoster virus. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 2747-57.

Eckle, T., Prix, L., Jahn, G., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Selle, B. & Hamprecht, K. (2000). Drug-resistant human cytomegalovirus infection in children after allogeneic

stem cell transplantation may have different clinical outcomes. *Blood* **96**, 3286-3289.

Edwards, S. & White, C. (1994). Genital herpes simplex virus type 1 in women. *Genitourin Med* **70**, 426.

Efstathiou, S., Kemp, S., Darby, G. & Minson, A. C. (1989). The role of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase in pathogenesis. *J Gen Virol* **70**, 869-879.

Egan, L. J., Bylander, J. M., Agerter, D. C. & Edson, R. S. (1998). Herpetic whitlow of the toe: an unusual manifestation of infection with herpes simplex virus type 2. *Clin Infect Dis* **26**, 196-7.

Embil, J. A., Stephens, R. G. & Manuel, F. R. (1975). Prevalence of recurrent herpes labialis and aphthous ulcers among young adults on six continents. *Can Med Assoc J* **113**, 627-30.

Emery, V. C., Sabin, C., Feinberg, J. E., Grywacz, M., Knight, S. & Griffiths, P. D. (1999). Quantitative effects of valacyclovir on the replication of cytomegalovirus (CMV) in persons with advanced human immunodeficiency virus disease: baseline CMV load dictates time to disease and survival. *J Infect Dis* **180**, 695-701.

Englund, J. A., Zimmerman, M. E., Swierkosz, E. M., Goodman, J. L., Scholl, D. R. & Balfour, H. H. (1990). Herpes simplex virus resistant to acyclovir: A study in a tertiary care center. *Ann Intern Med* **112**, 416-422.

Enquist, L. W., Husak, P. J., Banfield, B. W. & Smith, G. A. (1999). Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Advances Virus Research* **51**, 237-247.

Erice, A., Gil-Roda, C., Perez, J. L., Balfour, H. H., Sannerud, K. J., Hanson, M. N., Boivin, G. & Chou, S. (1997). Antiviral susceptibilities and analysis of UL97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates from immunocompromised patients. *J Infect Dis* **175**, 1087-1092.

Erlich, K. S., Jacobson, M. A., Koehler, J. E., Follansbee, S. E., Drennan, D. P., Gooze, L., Safrin, S. & Mills, J. (1989a). Foscarnet therapy for severe acyclovir-resistant herpes simplex virus type-2 infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). An uncontrolled trial. *Ann Intern Med* **110**, 710-3.

Erlich, K. S., Mills, J., Chatis, P., Mertz, G. J., Busch, D. F., Follansbee, S. E., Grant, R. M. & Crumpacker, C. S. (1989b). Acyclovir-resistant herpes simplex virus infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* **320**, 293-296.

Esmann, J. (2001). The many challenges of facial herpes simplex virus infection. *J Antimicrob Chemother* **47 Suppl T1**, 17-27.

Faber, S. W. & Wilcox, K. W. (1986). Association of the herpes simplex virus regulatory protein ICP4 with specific nucleotide sequences in DNA. *Nucleic Acids Res* **14**, 6067-83.

Farrell, H. E., McLean, C. S., Harley, C., Efstathiou, S., Inglis, S. & Minson, A. C. (1994). Vaccine potential of a herpes simplex virus type 1 mutant with an essential glycoprotein deleted. *J Virol* **68**, 927-32.

Favoreel, H. W., Nauwynck, H. J. & Pensaert, M. B. (2000). Immunological hiding of herpesvirus-infected cells. *Arch Virol* **145**, 1269-90.

Feder, H. M., Jr. & Geller, R. W. (1992). Herpetic whitlow of the great toe. *N Engl J Med* **326**, 1295-6.

Feinberg, J. E., Hurwitz, S., Cooper, D., Sattler, F. R., MacGregor, R. R., Powderly, W., Holland, G. N., Griffiths, P. D., Pollard, R. B., Youle, M., Gill, M. J., Holland, F. J., Power, M. E., Owens, S., Coakley, D., Fry, J. & Jacobson, M. A. (1998). A randomized, double-blind trial of valaciclovir prophylaxis for cytomegalovirus disease in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* **177**, 48-56.

Ferrante, P. (2000). The puzzling natural history of multiple sclerosis: a challenge for the research and care. *J Neurovirol* **6 Suppl 2**, S1-3.

Ferrante, P., Mancuso, R., Pagani, E., Guerini, F. R., Calvo, M. G., Saresella, M., Speciale, L. & Caputo, D. (2000). Molecular evidences for a role of HSV-1 in multiple sclerosis clinical acute attack. *J Neurovirol* **6 Suppl 2**, S109-14.

Fiddian, A. P., Yeo, J. M., Stubbings, R. & Dean, D. (1983). Successful treatment of herpes labialis with topical acyclovir. *Br Med J (Clin Res Ed)* **286**, 1699-701.

Field, H. J. (2001). Herpes simplex virus antiviral drug resistance--current trends and future prospects. *J Clin Virol* **21**, 261-9.

Field, H. J. & Coen, D. M. (1986). Pathogenicity of herpes simplex virus mutants containing drug resistance mutations in the viral DNA polymerase gene. *J Virol* **60**, 286-9.

Field, H. J. & Lay, E. (1984). Characterization of latent infections in mice inoculated with herpes simplex virus which is clinically resistant to acyclovir. *Antiviral Res* **4**, 43-52.

Fife, K. H., Barbarash, R. A., Rudolph, T., Degregorio, B. & Roth, R. (1997). Valaciclovir versus acyclovir in the treatment of first-episode genital herpes infection. Results of an international, multicenter, double- blind, randomized clinical trial. The Valaciclovir International Herpes Simplex Virus Study Group. *Sex Transm Dis* **24**, 481-6.

Fife, K. H., Crumpacker, C. S., Mertz, G. J., Hill, E. L. & Boone, G. S. (1994). Recurrence and resistance patterns of herpes simplex virus following cessation of > or = 6 years of chronic suppression with acyclovir. *J Infect Dis* **169**, 1338-41.

Filer, C. W., Allen, G. D., Brown, T. A., Fowles, S. E., Hollis, F. J., Mort, E. E., Prince, W. T. & Ramji, J. V. (1994). Metabolic and pharmacokinetic studies following oral administration of 14C-famciclovir to healthy subjects. *Xenobiotica* **24**, 357-68.

Fleming, D. T., McQuillan, G. M., Johnson, R. E., Nahmias, A. J., Aral, S. O., Lee, F. K. & St. Louis, M. E. (1997). Herpes simplex virus type 2 in the United States, 1976 to 1994. *N Engl J Med* **337**, 1105-11.

Focher, F., Verri, A., Spadari, S., Manservigi, R., Gambino, J. & Wright, G. E. (1993). Herpes simplex virus type 1 uracil-DNA glycosylase: isolation and selective inhibition by novel uracil derivatives. *Biochem J* **292**, 883-9.

Forrester, A., Farrell, H., Wilkinson, G., Kaye, J., Davis-Poynter, N. & Minson, T. (1992). Construction and properties of a mutant of herpes simplex virus type 1 with glycoprotein H coding sequences deleted. *J Virol* **66**, 341-8.

Foster, S. A., Cerny, J. & Cheng, Y. C. (1991). Herpes simplex virus-specified DNA polymerase is the target for the antiviral action of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *J Biol Chem* **266**, 238-244.

Franklin, M. C., Wang, J. & Steitz, T. A. (2001). Structure of the replicating complex of a pol alpha family DNA polymerase. *Cell* **105**, 657-667.

Frenkel, L. M., Garratty, E. M., Shen, J. P., Wheeler, N., Clark, O. & Bryson, Y. J. (1993). Clinical reactivation of herpes simplex virus type 2 infection in seropositive pregnant women with no history of genital herpes. *Ann Intern Med* **118**, 414-8.

Furman, P. A., St. Clair, M. H. & Spector, T. (1984). Acyclovir triphosphate is a suicide inactivator of the herpes simplex virus DNA polymerase. *J Biol Chem* **259**, 9575-9.

Furuta, Y., Fukuda, S., Chida, E., Takasu, T., Ohtani, F., Inuyama, Y. & Nagashima, K. (1998). Reactivation of herpes simplex virus type 1 in patients with Bell's palsy. *J Med Virol* **54**, 162-6.

Gallichan, W. S., Johnson, D. C., Graham, F. L. & Rosenthal, K. L. (1993). Mucosal immunity and protection after intranasal immunization with recombinant adenovirus expressing herpes simplex virus glycoprotein B. *J Infect Dis* **168**, 622-9.

Garber, D. A., Schaffer, P. A. & Knipe, D. M. (1997). A LAT-associated function reduces productive-cycle gene expression during acute infection of murine sensory neurons with herpes simplex virus type 1. *J Virol* **71**, 5885-93.

Gaudreau, A., Hill, E., Balfour, H. H., Jr., Erice, A. & Boivin, G. (1998). Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant herpes simplex viruses from immunocompromised patients. *J Infect Dis* **178**, 297-303.

Gibbs, J. S., Chiou, H. C., Bastow, K. F., Cheng, Y. C. & Coen, D. M. (1988). Identification of amino acids in herpes simplex virus DNA polymerase involved in substrate and drug recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 6672-6676.

Gibbs, J. S., Weisshart, K., Digard, P., deBruynKops, A., Knipe, D. M. & Coen, D. M. (1991). Polymerization activity of an alpha-like DNA polymerase requires a conserved 3'-5' exonuclease active site. *Mol Cell Biol* **11**, 4786-95.

Gilbert, C., Bestman-Smith, J. & Boivin, G. (2002). Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resist Updat* **5**, 88-114.

Golden, M. P., Kim, S., Hammer, S. M., Ladd, E. A., Schaffer, P. A., DeLuca, N. & Albrecht, M. A. (1992). Activation of human immunodeficiency virus by herpes simplex virus. *J Infect Dis* **166**, 494-9.

Green, J. A., Weiss, P. N., Yeh, T. J. & Spruance, S. L. (1985). Immune-specific interferon production by peripheral blood mononuclear leukocytes from patients with primary and recurrent oro-labial herpes simplex virus infections. *J Med Virol* **16**, 297-305.

Griffiths, P. D. (1996). Herpesviruses and AIDS. *J Antimicrob Chemother* **37 Suppl B**, 87-95.

Griffiths, P. D. (1998). Studies of viral co-factors for human immunodeficiency virus in vitro and in vivo. *J Gen Virol* **79**, 213-20.

Haffey, M. L., Stevens, J. T., Terry, B. J., Dorsky, D. I., Crumpacker, C. S., Wietstock, S. M., Ruyechan, W. T. & Field, A. K. (1988). Expression of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase in Saccharomyces cerevisiae and detection of virus-specific enzyme activity in cell-free lysates. *J Virol* **62**, 4493-8.

Halford, W. P., Gebhardt, B. M. & Carr, D. J. (1996). Mechanisms of herpes simplex virus type 1 reactivation. *J Virol* **70**, 5051-60.

Hall, J. D. & Almy, R. E. (1982). Evidence for control of herpes simplex virus mutagenesis by the viral DNA polymerase. *Virology* **116**, 535-43.

Hall, J. D., Coen, D. M., Fisher, B. L., Weisslitz, M., Randall, S., Almy, R. E., Gelep, P. T. & Schaffer, P. A. (1984). Generation of genetic diversity in herpes simplex virus: an antimutator phenotype maps to the DNA polymerase locus. *Virology* **132**, 26-37.

Hall, J. D., Orth, K. L., Sander, K. L., Swihart, B. M. & Senese, R. A. (1995). Mutations within conserved motifs in the 3'-5' exonuclease domain of herpes simplex virus DNA polymerase. *J Gen Virol* **76**, 2999-3008.

Hall, J. D., Wang, Y. S., Pierpont, J., Berlin, M. S., Rundlett, S. E. & Woodward, S. (1989). Aphidicolin resistance in herpes simplex virus type I reveals features of the DNA polymerase dNTP binding site. *Nucleic Acids Res* **17**, 9231-9244.

Hammer, S. M. & Inouye, R. T. (1997). Antiviral agents. In *Clinical virology*, First edn, pp. 185-250. Edited by D. D. Richman, R. J. Whitley & F. G. Hayden. New york: Churchill Livingstone.

Hardy, W. R. & Sandri-Goldin, R. M. (1994). Herpes simplex virus inhibits host cell splicing, and regulatory protein ICP27 is required for this effect. *J Virol* **68**, 7790-9.

Hashido, M., Kawana, T., Matsunaga, Y. & Inouye, S. (1999). Changes in prevalence of herpes simplex virus type 1 and 2 antibodies from 1973 to 1993 in the rural districts of Japan. *Microbiol Immunol* **43**, 177-80.

Hashido, M., Lee, F. K., Nahmias, A. J., Tsugami, H., Isomura, S., Nagata, Y., Sonoda, S. & Kawana, T. (1998). An epidemiologic study of herpes simplex virus type 1 and 2 infection in Japan based on type-specific serological assays. *Epidemiol Infect* **120**, 179-86.

Heng, M. C., Heng, S. Y. & Allen, S. G. (1994). Co-infection and synergy of human immunodeficiency virus-1 and herpes simplex virus-1. *Lancet* **343**, 255-8.

Herold, B. C., WuDunn, D., Soltys, N. & Spear, P. G. (1991). Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *J Virol* **65**, 1090-8.

Hill, E. L., Hunter, G. A. & Ellis, M. N. (1991). In vitro and in vivo characterization of herpes simplex virus clinical isolates recovered from patients infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 2322-2328.

Ho, H. T., Woods, K. L., Bronson, J. J., De Boeck, H., Martin, J. C. & Hitchcock, M. J. (1992a). Intracellular metabolism of the antiherpes agent (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine. *Mol Pharmacol* **41**, 197-202.

Ho, H. T., Woods, K. L., Bronson, J. J., De Boeck, H., Martin, J. C. & Hitchcock, M. J. (1992b). Intracellular metabolism of the antiherpes agent (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine. *Mol Pharmacol* **41**, 197-202.

Holmberg, S. D., Stewart, J. A., Gerber, A. R., Byers, R. H., Lee, F. K., O'Malley, P. M. & Nahmias, A. J. (1988). Prior herpes simplex virus type 2 infection as a risk factor for HIV infection. *Jama* **259**, 1048-50.

Honda, M., Okuda, T., Hasegawa, T., Kurokawa, M., Shiraki, K., Matsuo, K., Komatsuzaki, M. & Niimura, M. (2001). Effect of long-term, low-dose acyclovir suppressive therapy on susceptibility to acyclovir and frequency of acyclovir resistance of herpes simplex virus type 2. *Antivir Chem Chemother* **12**, 233-9.

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

Hook, E. W. d., Cannon, R. O., Nahmias, A. J., Lee, F. F., Campbell, C. H., Jr., Glasser, D. & Quinn, T. C. (1992). Herpes simplex virus infection as a risk factor for human immunodeficiency virus infection in heterosexuals. *J Infect Dis* **165**, 251-5.

Horsburgh, B. C., Chen, S. H., Hu, A., Mulamba, G. B., Burns, W. H. & Coen, D. M. (1998). Recurrent acyclovir-resistant herpes simplex in an immunocompromised

patient: can strain differences compensate for loss of thymidine kinase in pathogenesis? *J Infect Dis* **178**, 618-25.

Horsburgh, B. C., Hubinette, M. M., Qiang, D., MacDonald, M. L. & Tufaro, F. (1999). Allele replacement: an application that permits rapid manipulation of herpes simplex virus type 1 genomes. *Gene Ther* **6**, 922-30.

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

Huber, B. E., Richards, C. A. & Krenitsky, T. A. (1991). Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: an innovative approach for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 8039-8043.

Huff, J. C., Krueger, G. G., Overall, J. C., Jr., Copeland, J. & Spruance, S. L. (1981). The histopathologic evolution of recurrent herpes simplex labialis. *J Am Acad Dermatol* **5**, 550-7.

Hwang, C. B. & Chen, H. J. (1995). An altered spectrum of herpes simplex virus mutations mediated by an antimutator DNA polymerase. *Gene* **152**, 191-193.

Hwang, C. B., Ruffner, K. L. & Coen, D. M. (1992). A point mutation within a distinct conserved region of the herpes simplex virus DNA polymerase gene confers drug resistance. *J Virol* **66**, 1774-1776.

Hwang, C. B. C., Horsburgh, B., Pelosi, E., Roberts, S., Digard, P. & Coen, D. M. (1994). A net +1 frameshift permits synthesis of thymidine kinase from a drug-resistance herpes simplex virus mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 5461-5465.

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

Hwang, Y. T., Liu, B. Y., Hong, C. Y., Shillitoe, E. J. & Hwang, C. B. (1999). Effects of exonuclease activity and nucleotide selectivity of the herpes simplex virus DNA polymerase on the fidelity of DNA replication in vivo. *J Virol* **73**, 5326-32.

Hwang, Y. T., Smith, J. F., Gao, L. & Hwang, C. B. (1998). Mutations in the Exo III motif of the herpes simplex virus DNA polymerase gene can confer altered drug sensitivities. *Virology* **246**, 298-305.

Ioannidis, J. P., Collier, A. C., Cooper, D. A., Corey, L., Fiddian, A. P., Gazzard, B. G., Griffiths, P. D., Contopoulos-Ioannidis, D. G., Lau, J., Pavia, A. T., Saag, M. S., Spruance, S. L. & Youle, M. S. (1998). Clinical efficacy of high-dose acyclovir in patients with human immunodeficiency virus infection: a meta-analysis of randomized individual patient data. *J Infect Dis* **178**, 349-59.

Jabs, D. A., Enger, C., Forman, M. & Dunn, J. P. (1998). Incidence of foscarnet resistance and cidofovir resistance in patients treated for cytomegalovirus retinitis. The Cytomegalovirus Retinitis and Viral Resistance Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 2240-2244.

Jabs, W. J., Hennig, H., Kittel, M., Pethig, K., Smets, F., Bucsky, P., Kirchner, H. & Wagner, H. J. (2001). Normalized quantification by real-time PCR of Epstein-Barr virus load in patients at risk for posttransplant lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* **39**, 564-569.

Jacobs, R. F. (1998). Neonatal herpes simplex virus infections. *Semin Perinatol* **22**, 64-71.

Jacobson, J., Kramer, M., Rozenberg, F., Hu, A. & Coen, D. M. (1995). Synergistic effects on ganglionic herpes simplex virus infections by mutations or drugs that inhibits the viral polymerase and thymidine kinase. *Virology* **206**, 263-268.

Jacobson, J. G., Ruffner, K. L., Kosz Vnenchak, M., Hwang, C. B., Wobbe, K. K., Knipe, D. M. & Coen, D. M. (1993a). Herpes simplex virus thymidine kinase and specific stages of latency in murine trigeminal ganglia. *J Virol* **67**, 6903-8.

Jacobson, J. G., Ruffner, K. L., Kosz-Vnenchak, M., Hwang, C. B. C., Wobbe, K. K., Knipe, D. M. & Coen, D. M. (1993b). Herpes simplex virus thymidine kinase and specific stages of latency in murine trigeminal ganglia. *Journal of Virology* **67**, 6903-6908.

Javaly, K., Wohlfeiler, M., Kalayjian, R., Klein, T., Bryson, Y., Grafford, K., Martin-Munley, S. & Hardy, W. D. (1999). Treatment of mucocutaneous herpes simplex virus infections unresponsive to acyclovir with topical foscarnet cream in AIDS patients: a phase I/II study. *J Acquir Immune Defic Syndr* **21**, 301-6.

Jean, S., LeVan, K. M., Song, B., Levine, M. & Knipe, D. M. (2001). Herpes simplex virus 1 ICP27 is required for transcription of two viral late (gamma 2) genes in infected cells. *Virology* **283**, 273-84.

Jennings, S. R., Bonneau, R. H., Smith, P. M., Wolcott, R. M. & Chervenak, R. (1991). CD4-positive T lymphocytes are required for the generation of the primary but not the secondary CD8-positive cytolytic T lymphocyte response to herpes simplex virus in C57BL/6 mice. *Cell Immunol* **133**, 234-52.

Johnson, R. E., Nahmias, A. J., Magder, L. S., Lee, F. K., Brooks, C. A. & Snowden, C. B. (1989). A seroepidemiologic survey of the prevalence of herpes simplex virus type 2 infection in the United States. *N Engl J Med* **321**, 7-12.

Kamiyama, T., Kurokawa, M. & Shiraki, K. (2001). Characterization of the DNA polymerase gene of varicella-zoster viruses resistant to acyclovir. *J Gen Virol* **82**, 2761-5.

Kaplowitz, L. G., Baker, D., Gelb, L., Blythe, J., Hale, R., Frost, P., Crumpacker, C., Rabinovich, S., Peacock, J. E., Jr., Herndon, J. & et al. (1991). Prolonged continuous acyclovir treatment of normal adults with frequently recurring genital herpes simplex virus infection. The Acyclovir Study Group. *Jama* **265**, 747-51.

Karem, K. L., Bowen, J., Kuklin, N. & Rouse, B. T. (1997). Protective immunity against herpes simplex virus (HSV) type 1 following oral administration of recombinant Salmonella typhimurium vaccine strains expressing HSV antigens. *J Gen Virol* **78**, 427-34.

Katz, J. P., Bodin, E. T. & Coen, D. M. (1990). Quantitative polymerase chain reaction analysis of herpes simplex virus DNA in ganglia of mice infected with replication-incompetent mutants. *J Virol* **64**, 4288-95.

Kearny, B. P., Knight, W. K., Wolf, J. L., Currie, G. M., Contreras, J. M., Fry, J. & Brosgart, C. L. (2001). Pharmacokinetics of adefovir and the effect of food on the absorption of adefovir dipivoxil 10 mg. *Hepatology* **34**, 620A.

Keller, P. M., Fyfe, J. A., Beauchamp, L., Lubbers, C. M., Furman, P. A., Schaeffer, H. J. & Elion, G. B. (1981). Enzymatic phosphorylation of acyclic nucleoside analogs and correlations with antiherpetic activities. *Biochem Pharmacol* **30**, 3071-7.

Kemp, L. M., Dent, C. L. & Latchman, D. S. (1990). Octamer motif mediates transcriptional repression of HSV immediate-early genes and octamer-containing cellular promoters in neuronal cells. *Neuron* **4**, 215-22.

Kim, J. H., Park, J. B., Bae, P. K., Kim, H. S., Kim do, W., Ahn, J. K. & Lee, C. K. (2002). Establishment and use of a cell line expressing HSV-1 thymidine kinase to characterize viral thymidine kinase-dependent drug-resistance. *Antiviral Res* **54**, 163-74.

Kinghorn, G. (1999). Herpes simplex type 1 genital infections. *Herpes* **6**, 4-7.

Kit, S. (1985). Thymidine kinase. *Microbiological Sciences* **2**, 369-375.

Kit, S., Sheppard, M., Ichimura, H., Nusinoff-Lehrman, S., Nixon, E. M., Fyfe, J. A. & Otsuka, H. (1987). Nucleotide sequence changes in thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 2 clones from an isolate of a patient treated with acyclovir. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **31**, 1483-1490.

Kleymann, G., Fischer, R., Betz, U. A., Hendrix, M., Bender, W., Schneider, U., Handke, G., Eckenberg, P., Hewlett, G., Pevzner, V., Baumeister, J., Weber, O., Henninger, K., Keldenich, J., Jensen, A., Kolb, J., Bach, U., Popp, A., Maben, J., Frappa, I., Haebich, D., Lockhoff, O. & Rubsamen-Waigmann, H. (2002). New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease. *Nat Med* **8**, 392-8.

Klotz, R. W. (1990). Herpetic whitlow: an occupational hazard. *Aana J* **58**, 8-13.

Knopf, C. W. (1987). The herpes simplex virus type 1 DNA polymerase gene: site of phosphonoacetic acid resistance mutation in strain Angelotti is highly conserved. *J Gen Virol* **68**, 1429-1433.

Knopf, C. W. & Weisshart, K. (1988). The herpes simplex virus DNA polymerase: analysis of the functional domains. *Biochim Biophys Acta* **951**, 298-314.

Koelle, D. M., Abbo, H., Peck, A., Ziegweid, K. & Corey, L. (1994). Direct recovery of herpes simplex virus (HSV)-specific T lymphocyte clones from recurrent genital HSV-2 lesions. *J Infect Dis* **169**, 956-61.

Koelle, D. M., Benedetti, J., Langenberg, A. & Corey, L. (1992). Asymptomatic reactivation of herpes simplex virus in women after the first episode of genital herpes. *Ann Intern Med* **116**, 433-7.

Koelle, D. M., Frank, J. M., Johnson, M. L. & Kwok, W. W. (1998a). Recognition of herpes simplex virus type 2 tegument proteins by CD4 T cells infiltrating human genital herpes lesions. *J Virol* **72**, 7476-83.

Koelle, D. M., Posavad, C. M., Barnum, G. R., Johnson, M. L., Frank, J. M. & Corey, L. (1998b). Clearance of HSV-2 from recurrent genital lesions correlates with infiltration of HSV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest* **101**, 1500-8.

Koelle, D. M., Tigges, M. A., Burke, R. L., Symington, F. W., Riddell, S. R., Abbo, H. & Corey, L. (1993). Herpes simplex virus infection of human fibroblasts and keratinocytes inhibits recognition by cloned CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest* **91**, 961-8.

Koelle, D. M. & Wald, A. (2000). Herpes simplex virus: the importance of asymptomatic shedding. *J Antimicrob Chemother* **45 Suppl T3**, 1-8.

Kohl, S., West, M. S., Prober, C. G., Sullender, W. M., Loo, L. S. & Arvin, A. M. (1989). Neonatal antibody-dependent cellular cytoxic antibody levels are associated with the clinical presentation of neonatal herpes simplex virus infection. *J Infect Dis* **160**, 770-776.

Kopp, T., Geusau, A., Rieger, A. & Stingl, G. (2002). Successful treatment of an aciclovir-resistant herpes simplex type 2 infection with cidofovir in an AIDS patient. *Br J Dermatol* **147**, 134-138.

Kost, R. G., Hill, E. L., Tigges, M. & Straus, S. E. (1993). Brief report: recurrent acyclovir-resistant genital herpes in an immunocompetent patient. *N Engl J Med* **329**, 1777-1782.

Krause, P. R., Croen, K. D., Straus, S. E. & Ostrove, J. M. (1988). Detection and preliminary characterization of herpes simplex virus type 1 transcripts in latently infected human trigeminal ganglia. *J Virol* **62**, 4819-23.

Kreiss, J. K., Coombs, R., Plummer, F., Holmes, K. K., Nikora, B., Cameron, W., Ngugi, E., Ndinya Achola, J. O. & Corey, L. (1989). Isolation of human immunodeficiency virus from genital ulcers in Nairobi prostitutes. *J Infect Dis* **160**, 380-4.

Kristie, T. M. & Roizman, B. (1984). Separation of sequences defining basal expression from those conferring alpha gene recognition within the regulatory domains of herpes simplex virus 1 alpha genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4065-9.

Kroon, S., Whitley, R. & eds (1995). Management strategies in herpes: can we imporve management of perinatal herpes simplex virus infections? *Worthing, UK: PPS Europe*.

Kucera, L. S., Leake, E., Iyer, N., Raben, D. & Myrvik, Q. N. (1990). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and herpes simplex virus type 2 (HSV-2) can coinfect and simultaneously replicate in the same human CD4+ cell: effect of coinfection on infectious HSV-2 and HIV-1 replication. *AIDS Res Hum Retroviruses* **6**, 641-7.

Kudo, E., Shiota, H., Naito, T., Satake, K. & Itakura, M. (1998). Polymorphisms of thymidine kinase gene in herpes simplex virus type 1: analysis of clinical isolates from herpetic keratitis patients and laboratory strains. *J Med Virol* **56**, 151-158.

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

Kung, S. H., Wang, Y. C., Lin, C. H., Kuo, R. L. & Liu, W. T. (2000). Rapid diagnosis and quantification of herpes simplex virus with a green fluorescent protein reporter system. *J Virol Methods* **90**, 205-12.

Kuo, Y. C. & Lin, C. Y. (1990). Recurrent herpes simplex virus type 1 infection precipitated by the impaired production of interleukin-2, alpha-interferon, and cell-mediated cytotoxicity. *J Med Virol* **31**, 183-9.

Kussmann-Gerber, S., Kuonen, O., Folkers, G., Pilger, B. D. & Scapozza, L. (1998). Drug resistance of herpes simplex virus type 1--structural considerations at the molecular level of the thymidine kinase. *Eur J Biochem* **255**, 472-81.

Ladin, B. F., Blankenship, M. L. & Ben-Porat, T. (1980). Replication of herpesvirus DNA. V. Maturation of concatemeric DNA of pseudorabies virus to genome length is related to capsid formation. *J Virol* **33**, 1151-64.

Ladin, B. F., Ihara, S., Hampl, H. & Ben-Porat, T. (1982). Pathway of assembly of herpesvirus capsids: an analysis using DNA+ temperature-sensitive mutants of pseudorabies virus. *Virology* **116**, 544-61.

Lafferty, W. E. (2002). The changing epidemiology of HSV-1 and HSV-2 and implications for serological testing. *Herpes* **9**, 51-5.

Lafferty, W. E., Coombs, R. W., Benedetti, J., Critchlow, C. & Corey, L. (1987). Recurrences after oral and genital herpes simplex virus infection. Influence of site of infection and viral type. *N Engl J Med* **316**, 1444-9.

Laiskonis, A., Thune, T., Neldam, S. & Hiltunen-Back, E. (2002). Valacyclovir in the treatment of facial herpes simplex virus infection. *J Infect Dis* **186 Suppl 1**, S66-70.

Lakeman, F. D. & Whitley, R. J. (1995). Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *J Infect Dis* **171**, 857-63.

Lalezari, J., Schacker, T., Feinberg, J., Gathe, J., Lee, S., Cheung, T., Kramer, F., Kessler, H., Corey, L., Drew, W. L., Boggs, J., McGuire, B., Jaffe, H. S. & Safrin, S. (1997). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of cidofovir gel for the treatment of acyclovir-unresponsive mucocutaneous herpes simplex virus infection in patients with AIDS. *J Infect Dis* **176**, 892-8.

Lalezari, J. P., Drew, W. L., Glutzer, E., James, C., Miner, D., Flaherty, J., Fisher, P. E., Cundy, K., Hannigan, J., Martin, J. C. & et al. (1995). (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine (cidofovir): results of a phase I/II study of a novel antiviral nucleotide analogue. *J Infect Dis* **171**, 788-796.

Lalezari, J. P., Drew, W. L., Glutzer, E., Miner, D., Safrin, S., Owen, W. F., Jr., Davidson, J. M., Fisher, P. E. & Jaffe, H. S. (1994). Treatment with intravenous (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]-cytosine of acyclovir-resistant mucocutaneous infection with herpes simplex virus in a patient with AIDS. *J Infect Dis* **170**, 570-572.

Lamey, P. & PL, H. (1999). Changing epidemiology of herpes simplex virus type 1 infections. *herpes* **6**, 20-24.

Langeland, N., Haarr, L. & Mhalu, F. (1998). Prevalence of HSV-2 antibodies among STD clinic patients in Tanzania. *Int J STD AIDS* **9**, 104-7.

Langenberg, A., Benedetti, J., Jenkins, J., Ashley, R., Winter, C. & Corey, L. (1989). Development of clinically recognizable genital lesions among women previously identified as having asymptomatic herpes simplex virus type 2 infection. *Ann Intern Med* **110**, 882-7.

Langenberg, A. G., Corey, L., Ashley, R. L., Leong, W. P. & Straus, S. E. (1999). A prospective study of new infections with herpes simplex virus type 1 and type 2. Chiron HSV Vaccine Study Group. *N Engl J Med* **341**, 1432-8.

Langston, A. A., Redei, I., Caliendo, A. M., Somani, J., Hutcherson, D., Lonial, S., Bucur, S., Cherry, J., Allen, A. & Waller, E. K. (2002). Development of drug-resistant herpes simplex virus infection after haploidentical hematopoietic progenitor cell transplantation. *Blood* **99**, 1085-8.

Larder, B. A. & Darby, G. (1985). Selection and characterisation of acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 mutants inducing altered DNA polymerase activities. *Virology* **146**, 262-71.

Larder, B. A. & Darby, G. (1986). Susceptibility to other antiherpes drugs of pathogenic variants of herpes simplex virus selected for resistance to acyclovir. *Antimicrob Agents Chemother* **29**, 894-8.

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

Lee, N. Y., Tang, Y., Espy, M. J., Kolbert, C. P., Rys, P. N., Mitchell, P. S., Day, S. P., Henry, S. L., Persing, D. H. & Smith, T. F. (1999). Role of genotypic analysis of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus for determination of neurovirulence and resistance to acyclovir. *J Clin Microbiol* **37**, 3171-3174.

Leib, D. A., Harrison, T. E., Laslo, K. M., Machalek, M. A., Moorman, N. J. & Virgin, H. W. (1999). Interferons regulate the phenotype of wild-type and mutant herpes simplex viruses in vivo. *J Exp Med* **189**, 663-72.

Leist, T. P., Sandri-Goldin, R. M. & Stevens, J. G. (1989). Latent infections in spinal ganglia with thymidine kinase-deficient herpes simplex virus. *J Virol* **63**, 4976-8.

Leone, P. A., Trottier, S. & Miller, J. M. (2002). Valacyclovir for episodic treatment of genital herpes: a shorter 3-day treatment course compared with 5-day treatment. *Clin Infect Dis* **34**, 958-62.

Levin, M. J., Weinberg, A., Leary, J. J. & Sarisky, R. T. (2001). Development of acyclovir-resistant herpes simplex virus early during the treatment of herpes neonatorum. *Pediatr Infect Dis J* **20**, 1094-7.

Ligas, M. W. & Johnson, D. C. (1988). A herpes simplex virus mutant in which glycoprotein D sequences are replaced by beta-galactosidase sequences binds to but is unable to penetrate into cells. *J Virol* **62**, 1486-94.

Long, M. C., Leong, V., Schaffer, P. A., Spencer, C. A. & Rice, S. A. (1999). ICP22 and the UL13 protein kinase are both required for herpes simplex virus-induced modification of the large subunit of RNA polymerase II. *J Virol* **73**, 5593-604.

LoPresti, A. E., Levine, J. F., Munk, G. B., Tai, C. Y. & Mendel, D. B. (1998). Successful treatment of an acyclovir- and foscarnet-resistant herpes simplex virus type 1 lesion with intravenous cidofovir. *Clin Infect Dis* **26**, 512-513.

Loveless, M., Harris, W. & Sacks, S. (1995). Treatment of first episode genital herpes with famciclovir. In *35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Edited by A. S. f. Microbiology. San Francisco, CA, USA.

Lowance, D., Neumayer, H. H., Legendre, C. M., Squifflet, J. P., Kovarik, J., Brennan, P. J., Norman, D., Mendez, R., Keating, M. R., Coggon, G. L., Crisp, A. & Lee, I. C. (1999). Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. *N Engl J Med* **340**, 1462-70.

Lycke, E., Kristensson, K., Svennerholm, B., Vahlne, A. & Ziegler, R. (1984). Uptake and transport of herpes simplex virus in neurites of rat dorsal root ganglia cells in culture. *J Gen Virol* **65**, 55-64.

Maier, J. A., Bergman, A. & Ross, M. G. (1986). Acquired immunodeficiency syndrome manifested by chronic primary genital herpes. *Am J Obstet Gynecol* **155**, 756-8.

Manickan, E. & Rouse, B. T. (1995). Roles of different T-cell subsets in control of herpes simplex virus infection determined by using T-cell-deficient mouse-models. *J Virol* **69**, 8178-9.

Manickan, E., Rouse, R. J., Yu, Z., Wire, W. S. & Rouse, B. T. (1995). Genetic immunization against herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* **155**, 259-65.

Marcy, A. I., Hwang, C. B., Ruffner, K. L. & Coen, D. M. (1990a). Engineered herpes simplex virus DNA polymerase point mutants: the most highly conserved region shared among alpha-like DNA polymerases is involved in substrate recognition. *J. Virol.* **64**, 5883-5890.

Marcy, A. I., Olivo, P. D., Challberg, M. D. & Coen, D. M. (1990b). Enzymatic activities of overexpressed herpes simplex virus DNA polymerase purified from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Nucleic Acids Res* **18**, 1207-15.

Margolis, D. M., Rabson, A. B., Straus, S. E. & Ostrove, J. M. (1992). Transactivation of the HIV-1 LTR by HSV-1 immediate-early genes. *Virology* **186**, 788-91.

Martin, J. L., Ellis, M. N., Keller, P. M., Biron, K. K., Lehrman, S. N., Barry, D. W. & Furman, P. A. (1985). Plaque autoradiography assay for the detection and quantification of thymidine kinase-deficient and thymidine kinase-altered mutants of herpes simplex virus in clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **28**, 181-187.

Martins, T. B., Woolstenhulme, R. D., Jaskowski, T. D., Hill, H. R. & Litwin, C. M. (2001). Comparison of four enzyme immunoassays with a western blot assay for the determination of type-specific antibodies to herpes simplex virus. *Am J Clin Pathol* **115**, 272-7.

Martuza, R. L., Malick, A., Markert, J. M., Ruffner, K. L. & Coen, D. M. (1991). Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* **252**, 854-6.

Matthews, J. T., Carroll, R. D., Stevens, J. T. & Haffey, M. L. (1989). In vitro mutagenesis of the herpes simplex virus type 1 DNA polymerase gene results in altered drug sensitivity of the enzyme. *J Virol* **63**, 4913-8.

Matthews, J. T., Terry, B. J. & Field, A. K. (1993). The structure and function of the HSV DNA replication proteins: defining novel antiviral targets. *Antiviral Res* **20**, 89-114.

McClements, W. L., Armstrong, M. E., Keys, R. D. & Liu, M. A. (1996). Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11414-20.

McClements, W. L., Armstrong, M. E., Keys, R. D. & Liu, M. A. (1997). The prophylactic effect of immunization with DNA encoding herpes simplex virus glycoproteins on HSV-induced disease in guinea pigs. *Vaccine* **15**, 857-60.

Mehta, A., Maggioncalda, J., Bagasra, O., Thikkavarapu, S., Saikumari, P., Valyi-Nagy, T., Fraser, N. W. & Block, T. M. (1995). In situ DNA PCR and RNA hybridization detection of herpes simplex virus sequences in trigeminal ganglia of latently infected mice. *Virology* **206**, 633-40.

Meignier, B., Longnecker, R. & Roizman, B. (1988). In vivo behavior of genetically engineered herpes simplex viruses R7017 and R7020: construction and evaluation in rodents. *J Infect Dis* **158**, 602-14.

Meignier, B., Martin, B., Whitley, R. J. & Roizman, B. (1990). In vivo behavior of genetically engineered herpes simplex viruses R7017 and R7020. II. Studies in immunocompetent and immunosuppressed owl monkeys (Aotus trivirgatus). *J Infect Dis* **162**, 313-21.

Mellors, J. W., Rinaldo, C. R., Jr., Gupta, P., White, R. M., Todd, J. A. & Kingsley, L. A. (1996). Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* **272**, 1167-70.

Mendel, D. B., Barkhimer, D. B. & Chen, M. S. (1995). Biochemical basis for increased susceptibility to Cidofovir of herpes simplex viruses with altered or deficient thymidine kinase activity. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2120-2122.

Mercey, D. & Mindel, A. (1990). Screening pregnant women for genital herpes. *Biomed Pharmacother* **44**, 257-62.

Mertz, G. J., Benedetti, J., Ashley, R., Selke, S. A. & Corey, L. (1992). Risk factors for the sexual transmission of genital herpes. *Ann Intern Med* **116**, 197-202.

Mertz, G. J., Coombs, R. W., Ashley, R., Jourden, J., Remington, M., Winter, C., Fahnlander, A., Guinan, M., Ducey, H. & Corey, L. (1988a). Transmission of

genital herpes in couples with one symptomatic and one asymptomatic partner: a prospective study. *J Infect Dis* **157**, 1169-77.

Mertz, G. J., Critchlow, C. W., Benedetti, J., Reichman, R. C., Dolin, R., Connor, J., Redfield, D. C., Savoia, M. C., Richman, D. D., Tyrrell, D. L. & et al. (1984). Double-blind placebo-controlled trial of oral acyclovir in first- episode genital herpes simplex virus infection. *Jama* **252**, 1147-51.

Mertz, G. J., Jones, C. C., Mills, J., Fife, K. H., Lemon, S. M., Stapleton, J. T., Hill, E. L. & Davis, L. G. (1988b). Long-term acyclovir suppression of frequently recurring genital herpes simplex virus infection. A multicenter double-blind trial. *Jama* **260**, 201-6.

Mertz, G. J., Loveless, M. O., Levin, M. J., Kraus, S. J., Fowler, S. L., Goade, D. & Tyring, S. K. (1997). Oral famciclovir for suppression of recurrent genital herpes simplex virus infection in women. A multicenter, double-blind, placebo- controlled trial. Collaborative Famciclovir Genital Herpes Research Group. *Arch Intern Med* **157**, 343-9.

Messerle, M., Crnkovic, I., Hammerschmidt, W., Ziegler, H. & Koszinowski, U. H. (1997). Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14759-63.

Mikloska, Z., Danis, V. A., Adams, S., Lloyd, A. R., Adrian, D. L. & Cunningham, A. L. (1998). In vivo production of cytokines and beta (C-C) chemokines in human recurrent herpes simplex lesions--do herpes simplex virus-infected keratinocytes contribute to their production? *J Infect Dis* **177**, 827-38.

Miller, C. S., Danaher, R. J. & Jacob, R. J. (1998). Molecular aspects of herpes simplex virus I latency, reactivation, and recurrence. *Crit Rev Oral Biol Med* **9**, 541-62.

Mitchell, B. M. & Stevens, J. G. (1996). Neuroinvasive properties of herpes simplex virus type 1 glycoprotein variants are controlled by the immune response. *J Immunol* **156**, 246-55.

Mitchell, P. S., Espy, M. J., Smith, T. F., Toal, D. R., Rys, P. N., Berbari, E. F., Osmon, D. R. & Persing, D. H. (1997). Laboratory diagnosis of central nervous system infections with herpes simplex virus by PCR performed with cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol* **35**, 2873-7.

Mohler, A. (2000). Herpetic whitlow of the toe. *J Am Board Fam Pract* **13**, 213-5.

Mole, L., Ripich, S., Margolis, D. & Holodniy, M. (1997). The impact of active herpes simplex virus infection on human immunodeficiency virus load. *J Infect Dis* **176**, 766-70.

Morfin, F., Souillet, G., Bilger, K., Ooka, T., Aymard, M. & Thouvenot, D. (2000a). Genetic characterization of thymidine kinase from acyclovir-resistant and -susceptible herpes simplex virus type 1 isolated from bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis* **182**, 290-293.

Morfin, F., Thouvenot, D., Aymard, M. & Souillet, G. (2000b). Reactivation of acyclovir-resistant thymidine kinase-deficient herpes simplex virus harbouring single base insertion within a 7 Gs homopolymer repeat of the thymidine kinase gene. *J Med Virol* **62**, 247-50.

Morfin, F., Thouvenot, D., De Turenne-Tessier, M., Lina, B., Aymard, M. & Ooka, T. (1999). Phenotypic and genetic characterization of thymidine kinase from clinical strains of varicella-zoster virus resistant to acyclovir. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 2412-6.

Moriuchi, M., Moriuchi, H., Williams, R. & Straus, S. E. (2000). Herpes simplex virus infection induces replication of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* **278**, 534-40.

Morrison, A., Bell, J. B., Kunkel, T. A. & Sugino, A. (1991). Eukaryotic DNA polymerase amino acid sequence required for 3'----5' exonuclease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9473-7.

Morrison, L. A. & Knipe, D. M. (1997). Contributions of antibody and T cell subsets to protection elicited by immunization with a replication-defective mutant of herpes simplex virus type 1. *Virology* **239**, 315-26.

Mosca, J. D., Bednarik, D. P., Raj, N. B., Rosen, C. A., Sodroski, J. G., Haseltine, W. A. & Pitha, P. M. (1987). Herpes simplex virus type-1 can reactivate transcription of latent human immunodeficiency virus. *Nature* **325**, 67-70.

Mostad, S. B., Kreiss, J. K., Ryncarz, A., Chohan, B., Mandaliya, K., Ndinya-Achola, J., Bwayo, J. J. & Corey, L. (2000). Cervical shedding of herpes simplex virus and cytomegalovirus throughout the menstrual cycle in women infected with human immunodeficiency virus type 1. *Am J Obstet Gynecol* **183**, 948-55.

Muyombwe, A., Olivier, M., Harvie, P., Bergeron, M. G., Ouellette, M. & Papadopoulou, B. (1998). Protection against Leishmania major challenge infection in mice vaccinated with live recombinant parasites expressing a cytotoxic gene. *J Infect Dis* **177**, 188-195.

Muyombwe, A., Olivier, M., Ouellette, M. & Papadopoulou, B. (1997). Selective killing of Leishmania amastigotes expressing a thymidine kinase suicide gene. *Exp Parasitol* **85**, 35-42.

Naesens, L. & De Clercq, E. (2001). Recent developments in herpesvirus therapy. *Herpes* **8**, 12-6.

Naesens, L., Snoeck, R., Andrei, G., Balzarini, J., Neyts, J. & De Clercq, E. (1997). HPMPC (cidofovir), PMEA (adefovir) and related acyclic nucleoside phosphonate analogues: a review of their pharmacology and clinical potential in the treatment of viral infections. *Antivir Chem Chemother* **8**, 1-23.

Nahmias, A. J., Lee, F. K. & Beckman-Nahmias, S. (1990). Sero-epidemiological and -sociological patterns of herpes simplex virus infection in the world. *Scand J Infect Dis Suppl* **69**, 19-36.

Neyts, J. & De Clercq, E. (1999). Hydroxyurea potentiates the antiherpesvirus activities of purine and pyrimidine nucleoside and nucleoside phosphonate analogs. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 2885-92.

Noble, S. & Goa, K. L. (1999). Adefovir dipivoxil. *Drugs* **58**, 479-87; discussion 488-9.

Nugier, F., Colin, J. N., Aymard, M. & Langlois, M. (1992). Occurence and characterization of acyclovir-resistant herpes simplex virus isolates: Report on a two-year sensitivity screening survey. *Journal of medical virology* **36**, 1-12.

Ohana, B., Lipson, M., Vered, N., Srugo, I., Ahdut, M. & Morag, A. (2000). Novel approach for specific detection of herpes simplex virus type 1 and 2 antibodies and immunoglobulin G and M antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* **7**, 904-8.

Olivo, P. D. (1994). Detection of herpes simplex virus by measurement of luciferase activity in an infected-cell lysate. *J Virol Methods* **47**, 117-28.

Oram, R. J., Marcellino, D., Strauss, D., Gustafson, E., Talarico, C. L., Root, A. K., Sharma, P. L., Thompson, K., Fingeroth, J. D., Crumpacker, C. & Herold, B. C.

(2000). Characterization of an acyclovir-resistant herpes simplex virus type 2 strain isolated from a premature neonate. *J Infect Dis* **181**, 1458-61.

Ostrove, J. M., Leonard, J., Weck, K. E., Rabson, A. B. & Gendelman, H. E. (1987). Activation of the human immunodeficiency virus by herpes simplex virus type 1. *J Virol* **61**, 3726-32.

Palella, F. J., Jr., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A., Aschman, D. J. & Holmberg, S. D. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* **338**, 853-60.

Palu, G., Benetti, L. & Calistri, A. (2001). Molecular basis of the interactions between herpes simplex viruses and HIV-1. *Herpes* **8**, 50-5.

Parris, D. S. & Harrington, J. E. (1982). Herpes simplex virus variants restraint to high concentrations of acyclovir exist in clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **22**, 71-7.

Patel, N., Kauffmann, L., Baniewicz, G., Forman, M., Evans, M. & Scholl, D. (1999). Confirmation of low-titer, herpes simplex virus-positive specimen results by the enzyme-linked virus-inducible system (ELVIS) using PCR and repeat testing. *J Clin Microbiol* **37**, 3986-9.

Patel, R., Bodsworth, N. J., Woolley, P., Peters, B., Vejlsgaard, G., Saari, S., Gibb, A. & Robinson, J. (1997). Valaciclovir for the suppression of recurrent genital HSV infection: a placebo controlled study of once daily therapy. International Valaciclovir HSV Study Group. *Genitourin Med* **73**, 105-9.

Pavic, I., Hartmann, A., Zimmermann, A., Michel, D., Hampl, W., Schleyer, I. & Mertens, T. (1997). Flow cytometric analysis of herpes simplex virus type 1 susceptibility to acyclovir, ganciclovir, and foscarnet. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 2686-92.

Pechere, M., Wunderli, W., Trellu-Toutous, L., Harms, M., Saura, J. H. & Krischer, J. (1998). Treatment of acyclovir-resistant herpetic ulceration with topical foscarnet and antiviral sensitivity analysis. *Dermatology* **197**, 278-80.

Pelosi, E., Mulamba, G. B. & Coen, D. M. (1998a). Penciclovir and pathogenesis phenotypes of drug-resistant Herpes simplex virus mutants. *Antiviral Res* **37**, 17-28.

Pelosi, E., Rozenberg, F., Coen, D. M. & Tyler, K. L. (1998b). A herpes simplex virus DNA polymerase mutation that specifically attenuates neurovirulence in mice. *Virology* **252**, 364-372.

Perng, G. C., Jones, C., Ciacci-Zanella, J., Stone, M., Henderson, G., Yukht, A., Slanina, S. M., Hofman, F. M., Ghiasi, H., Nesburn, A. B. & Wechsler, S. L. (2000). Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science* **287**, 1500-3.

Picard, F. J., Dekaban, G. A., Silva, J. & Rice, G. P. (1993). Mollaret's meningitis associated with herpes simplex type 2 infection. *Neurology* **43**, 1722-7.

Pilger, B. D., Perozzo, R., Alber, F., Wurth, C., Folkers, G. & Scapozza, L. (1999). Substrate diversity of herpes simplex virus thymidine kinase. Impact Of the kinematics of the enzyme. *J Biol Chem* **274**, 31967-73.

Piret, J., Desormeaux, A., Cormier, H., Lamontagne, J., Gourde, P., Juhasz, J. & Bergeron, M. G. (2000a). Sodium lauryl sulfate increases the efficacy of a topical formulation of foscarnet against herpes simplex virus type 1 cutaneous lesions in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2263-70.

Piret, J., Desormeaux, A., Gourde, P., Juhasz, J. & Bergeron, M. G. (2000b). Efficacies of topical formulations of foscarnet and acyclovir and of 5- percent acyclovir ointment (Zovirax) in a murine model of cutaneous herpes simplex virus type 1 infection. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 30-8.

Posavad, C. M., Koelle, D. M. & Corey, L. (1996). High frequency of CD8+ cytotoxic T-lymphocyte precursors specific for herpes simplex viruses in persons with genital herpes. *J Virol* **70**, 8165-8.

Posavad, C. M., Koelle, D. M. & Corey, L. (1998). Tipping the scales of herpes simplex virus reactivation: the important responses are local. *Nat Med* **4**, 381-2.

Posavad, C. M., Koelle, D. M., Shaughnessy, M. F. & Corey, L. (1997). Severe genital herpes infections in HIV-infected individuals with impaired herpes simplex virus-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10289-94.

Pottage, J. C., Jr. & Kessler, H. A. (1995). Herpes simplex virus resistance to acyclovir: clinical relevance. *Infect Agents Dis* **4**, 115-24.

Preston, C. M. (2000). Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. *J Gen Virol* **81**, 1-19.

Prober, C. G., Corey, L., Brown, Z. A., Hensleigh, P. A., Frenkel, L. M., Bryson, Y. J., Whitley, R. J. & Arvin, A. M. (1992). The management of pregnancies complicated by genital infections with herpes simplex virus. *Clin Infect Dis* **15**, 1031-8.

Pue, M. A., Pratt, S. K., Fairless, A. J., Fowles, S., Laroche, J., Georgiou, P. & Prince, W. (1994). Linear pharmacokinetics of penciclovir following administration of single oral doses of famciclovir 125, 250, 500 and 750 mg to healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother* **33**, 119-27.

Quinlan, M. P., Chen, L. B. & Knipe, D. M. (1984). The intranuclear location of a herpes simplex virus DNA-binding protein is determined by the status of viral DNA replication. *Cell* **36**, 857-68.

Quinnan, G. V., Jr., Masur, H., Rook, A. H., Armstrong, G., Frederick, W. R., Epstein, J., Manischewitz, J. F., Macher, A. M., Jackson, L., Ames, J. & et al. (1984). Herpesvirus infections in the acquired immune deficiency syndrome. *Jama* **252**, 72-7.

Rabella, N., Otegui, M., Labeaga, R., Rodriguez, P., Margall, N., Gurgui, M. & Prats, G. (2002). Antiviral susceptibility of Herpes simplex viruses and its clinical correlates: a single center's experience. *Clin Infect Dis* **34**, 1055-1060.

Reiff-Eldridge, R., Heffner, C. R., Ephross, S. A., Tennis, P. S., White, A. D. & Andrews, E. B. (2000). Monitoring pregnancy outcomes after prenatal drug exposure through prospective pregnancy registries: a pharmaceutical company commitment. *Am J Obstet Gynecol* **182**, 159-63.

Reitano, M., Tyring, S., Lang, W., Thoming, C., Worm, A. M., Borelli, S., Chambers, L. O., Robinson, J. M. & Corey, L. (1998). Valaciclovir for the suppression of recurrent genital herpes simplex virus infection: a large-scale dose range-finding study. International Valaciclovir HSV Study Group. *J Infect Dis* **178**, 603-10.

Rock, D. L., Nesburn, A. B., Ghiasi, H., Ong, J., Lewis, T. L., Lokensgard, J. R. & Wechsler, S. L. (1987). Detection of latency-related viral RNAs in trigeminal ganglia of rabbits latently infected with herpes simplex virus type 1. *J Virol* **61**, 3820-6.

Roizman, B. & Knipe, D. M. (2001). Herpes simplex viruses and their replication. In *Fields Virology*, Fourth edn, pp. 2399-2459. Edited by P. M. H. David M. Knipe. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Wilkins.

Roizman, B. & Pellet, P. (2001). The family herpesviridae: a brief introduction. In *Fields Virology*, Fourth edn, pp. 2381-2397. Edited by P. M. H. David M. Knipe. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Wilkins.

Roizman, B. & Sears, A. E. (1996). Herpes simplex viruses and their replication. In *Fields Virology*, 3rd edn, pp. 2231-2296. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley. PA.: Lippincott-Raven.

Roizman, B. & Whitley, R. J. (2001). The nine ages of herpes simplex virus. *Herpes* **8**, 23-7.

Ross, J. D., Smith, I. W. & Elton, R. A. (1993). The epidemiology of herpes simplex types 1 and 2 infection of the genital tract in Edinburgh 1978-1991. *Genitourin Med* **69**, 381-3.

Sacks, S. L., Aoki, F. Y., Diaz-Mitoma, F., Sellors, J. & Shafran, S. D. (1996). Patient-initiated, twice-daily oral famciclovir for early recurrent genital herpes. A randomized, double-blind multicenter trial. Canadian Famciclovir Study Group. *JAMA* **276**, 44-9.

Sacks, S. L., Wanklin, R. J., Reece, D. E., Hicks, K. A., Tyler, K. L. & Coen, D. M. (1989). Progressive esophagitis from acyclovir-resistant herpes simplex. Clinical roles for DNA polymerase mutants and viral heterogeneity? *Ann Intern Med* **111**, 893-899.

Safrin, S. (1992). Treatment of acyclovir-resistant herpes simplex virus infections in patients with AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* **5**, S29-32.

Safrin, S., Ashley, R., Houlihan, C., Cusick, P. S. & Mills, J. (1991). Clinical and serologic features of herpes simplex virus infection in patients with AIDS. *Aids* **5**, 1107-10.

Safrin, S., Assaykeen, T., Follansbee, S. & Mills, J. (1990). Foscarnet therapy for acyclovir-resistant mucocutaneous herpes simplex virus infection in 26 AIDS patients: Preliminary data. *J Infect Dis* **161**, 1078-1084.

Safrin, S., Elbeik, T., Phan, L., Robinson, D., Rush, J., Elbaggari, A. & Mills, J. (1994a). Correlation between response to acyclovir and foscarnet therapy and in vitro susceptibility result for isolates of herpes simplex virus from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 1246-50.

Safrin, S., Kemmerly, S., Plotkin, B., Smith, T., Weissbach, N., De Veranez, D., Phan, L. D. & Cohn, D. (1994b). Foscarnet-resistant herpes simplex virus infection in patients with AIDS. *J Infect Dis* **169**, 193-196.

Safrin, S. & Phan, L. (1993). In vitro activity of penciclovir against clinical isolates of acyclovir-resistant and foscarnet-resistant herpes simplex virus. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 2241-3.

Sahli, R., Andrei, G., Estrade, C., Snoeck, R. & Meylan, P. R. (2000). A rapid phenotypic assay for detection of acyclovir-resistant varicella-zoster virus with mutations in the thymidine kinase open reading frame. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 873-878.

Saijo, M., Suzutani, T., Itoh, K., Hirano, Y., Murono, K., Nagamine, M., Mizuta, K., Niikura, M. & Morikawa, S. (1999). Nucleotide sequence of thymidine kinase gene of sequential acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 isolates recovered from a child with Wiskott-Aldrich syndrome: evidence for reactivation of acyclovir-resistant herpes simplex virus. *J Med Virol* **58**, 387-93.

Saijo, M., Suzutani, T., Murono, K., Hirano, Y. & Itoh, K. (1998). Recurrent aciclovir-resistant herpes simplex in a child with Wiskott-Aldrich syndrome. *British journal of dermatology* **139**, 311 - 314.

Saijo, M., Yasuda, Y., Yabe, H., Kato, S., Suzutani, T., De Clercq, E., Niikura, M., Maeda, A., Kurane, I. & Morikawa, S. (2002). Bone marrow transplantation in a child with Wiskott-Aldrich syndrome latently infected with acyclovir-resistant (ACVr) herpes simplex virus type 1: Emergence of foscarnet-resistant virus originating from the ACVr virus. *J Med Virol* **68**, 99-104.

Saint-Leger, E., Caumes, E., Breton, G., Douard, D., Saiag, P., Huraux, J. M., Bricaire, F., Agut, H. & Fillet, A. M. (2001). Clinical and virologic characterization of acyclovir-resistant varicella-zoster viruses isolated from 11 patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* **33**, 2061-7.

Sakaoka, H., Kurita, K., Iida, Y., Takada, S., Umene, K., Kim, Y. T., Ren, C. S. & Nahmias, A. J. (1994). Quantitative analysis of genomic polymorphism of herpes simplex virus type 1 strains from six countries: studies of molecular evolution and molecular epidemiology of the virus. *J Gen Virol* **75**, 513-27.

Sanna, P. P., De Logu, A., Williamson, R. A., Hom, Y. L., Straus, S. E., Bloom, F. E. & Burton, D. R. (1996). Protection of nude mice by passive immunization with a type-common human recombinant monoclonal antibody against HSV. *Virology* **215**, 101-6.

Sarisky, R. T., Bacon, T., Boon, R., Locke, L., Nguyen, T. T., Leary, J., Esser, K. & Saltzman, R. (2002a). Penciclovir susceptibilities of herpes simplex virus isolates from patients using penciclovir cream for treatment of recurrent herpes labialis. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 2848-53.

Sarisky, R. T., Crosson, P., Cano, R., Quail, M. R., Nguyen, T. T., Wittrock, R. J., Bacon, T. H., Sacks, S. L., Caspers-Velu, L., Hodinka, R. L. & Leary, J. J. (2002b). Comparison of methods for identifying resistant herpes simplex virus and measuring antiviral susceptibility. *J Clin Virol* **23**, 191-200.

Sarisky, R. T., Nguyen, T. T., Duffy, K. E., Wittrock, R. J. & Leary, J. J. (2000). Difference in incidence of spontaneous mutations between Herpes simplex virus types 1 and 2. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1524-9.

Sarisky, R. T., Quail, M. R., Clark, P. E., Nguyen, T. T., Halsey, W. S., Wittrock, R. J., O'Leary Bartus, J., Van Horn, M. M., Sathe, G. M., Van Horn, S., Kelly, M. D., Bacon, T. H. & Leary, J. J. (2001). Characterization of herpes simplex viruses selected in culture for resistance to penciclovir or acyclovir. *J Virol* **75**, 1761-1769.

Sarmiento, M., Haffey, M. & Spear, P. G. (1979). Membrane proteins specified by herpes simplex viruses. III. Role of glycoprotein VP7(B2) in virion infectivity. *J Virol* **29**, 1149-58.

Sasadeusz, J. J. & Sacks, S. L. (1996). Spontaneous reactivation of thymidine kinase-deficient, acyclovir-resistant type-2 herpes simplex virus: masked heterogeneity or reversion? *J Infect Dis* **174**, 476-482.

Sasadeusz, J. J., Tufaro, F., Safrin, S., Schubert, K., Hubinette, M. M., Cheung, P. K. & Sacks, S. L. (1997). Homopolymer mutational hot spots mediate herpes simplex virus resistance to acyclovir. *J Virol* **71**, 3872-3878.

Sawtell, N. M. (1997). Comprehensive quantification of herpes simplex virus latency at the single-cell level. *J Virol* **71**, 5423-31.

Schacker, T. (2001). The role of HSV in the transmission and progression of HIV. *Herpes* **8**, 46-9.

Schacker, T., Hu, H. L., Koelle, D. M., Zeh, J., Saltzman, R., Boon, R., Shaughnessy, M., Barnum, G. & Corey, L. (1998a). Famciclovir for the suppression of symptomatic and asymptomatic herpes simplex virus reactivation in HIV-infected persons. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* **128**, 21-8.

Schacker, T., Ryncarz, A. J., Goddard, J., Diem, K., Shaughnessy, M. & Corey, L. (1998b). Frequent recovery of HIV-1 from genital herpes simplex virus lesions in HIV-1-infected men. *JAMA* **280**, 61-6.

Schacker, T., Zeh, J., Hu, H., Shaughnessy, M. & Corey, L. (2002). Changes in Plasma Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Associated with Herpes Simplex Virus Reactivation and Suppression. *J Infect Dis* **186**, 1718-1725.

Schacker, T., Zeh, J., Hu, H. L., Hill, E. & Corey, L. (1998c). Frequency of symptomatic and asymptomatic herpes simplex virus type 2 reactivations among human immunodeficiency virus-infected men. *J Infect Dis* **178**, 1616-22.

Schafer, S. L., Vlach, J. & Pitha, P. M. (1996). Cooperation between herpes simplex virus type 1-encoded ICP0 and Tat to support transcription of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in vivo can occur in the absence of the TAR binding site. *J Virol* **70**, 6937-46.

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

Schofield, J. K., Tatnall, F. M. & Leigh, I. M. (1993). Recurrent erythema multiforme: clinical features and treatment in a large series of patients. *Br J Dermatol* **128**, 542-5.

Schomogyi, M., Wald, A. & Corey, L. (1998). Herpes simplex virus-2 infection. An emerging disease? *Infect Dis Clin North Am* **12**, 47-61.

Schulz, T. F. (2000). KSHV (HHV8) infection. *J Infect* **41**, 125-9.

Scott, D. A., Coulter, W. A. & Lamey, P. J. (1997). Oral shedding of herpes simplex virus type 1: a review. *J Oral Pathol Med* **26**, 441-7.

Scott, L. L., Sanchez, P. J., Jackson, G. L., Zeray, F. & Wendel, G. D., Jr. (1996). Acyclovir suppression to prevent cesarean delivery after first-episode genital herpes. *Obstet Gynecol* **87**, 69-73.

Sears, A. E., Hukkanen, V., Labow, M. A., Levine, A. J. & Roizman, B. (1991). Expression of the herpes simplex virus 1 alpha transinducing factor (VP16) does not induce reactivation of latent virus or prevent the establishment of latency in mice. *J Virol* **65**, 2929-35.

Sedarati, F., Margolis, T. P. & Stevens, J. G. (1993). Latent infection can be established with drastically restricted transcription and replication of the HSV-1 genome. *Virology* **192**, 687-91.

Segal, B. H., Engler, H. D., Little, R., Wilson, W. H., Freifeld, A. G. & Chanock, S. J. (1997). Early foscarnet failure in herpes simplex virus infection in a patient with AIDS. *Aids* **11**, 552-3.

Severson, J. L. & Tyring, S. K. (1999). Relation between herpes simplex viruses and human immunodeficiency virus infections. *Arch Dermatol* **135**, 1393-7.

Sheridan, J. F., Beck, M., Smith, C. C. & Aurelian, L. (1987). Reactivation of herpes simplex virus is associated with production of a low molecular weight factor that inhibits lymphokine activity in vitro. *J Immunol* **138**, 1234-9.

Shieh, M. T., WuDunn, D., Montgomery, R. I., Esko, J. D. & Spear, P. G. (1992). Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol* **116**, 1273-81.

Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N. W., Bai, X., Esko, J. D., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Rosenberg, R. D. & Spear, P. G. (1999). A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* **99**, 13-22.

Sibrack, C. D., Gutman, L. T., Wilfert, C. M., McLaren, C., St Clair, M. H., Keller, P. M. & Barry, D. W. (1982). Pathogenicity of acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 from an immunodeficient child. *J Infect Dis* **146**, 673-82.

Siegal, F. P., Lopez, C., Hammer, G. S., Brown, A. E., Kornfeld, S. J., Gold, J., Hassett, J., Hirschman, S. Z., Cunningham-Rundles, C., Adelsberg, B. R. & et al. (1981). Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N Engl J Med* **305**, 1439-44.

Siegel, J. D. & McCracken, G. H., Jr. (1981). Sepsis neonatorum. *N Engl J Med* **304**, 642-7.

Simmons, A. (2002). Clinical manifestations and treatment considerations of herpes simplex virus infection. *J Infect Dis* **186 Suppl 1**, S71-7.

Sin, J., Kim, J. J., Pachuk, C., Satishchandran, C. & Weiner, D. B. (2000). DNA vaccines encoding interleukin-8 and RANTES enhance antigen-specific Th1-type CD4(+) T-cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus type 2 in vivo. *J Virol* **74**, 11173-80.

Singh, M., Carlson, J. R., Briones, M., Ugozzoli, M., Kazzaz, J., Barackman, J., Ott, G. & O'Hagan, D. (1998). A comparison of biodegradable microparticles and MF59 as systemic adjuvants for recombinant gD from HSV-2. *Vaccine* **16**, 1822-7.

Skepper, J. N., Whiteley, A., Browne, H. & Minson, A. (2001). Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --deenvelopment --reenvelopment pathway. *J Virol* **75**, 5697-702.

Slavin, M. A., Gleaves, C. A., Schoch, H. G. & Bowden, R. A. (1992). Quantification of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage fluid after allogeneic marrow transplantation by centrifugation culture. *J Clin Microbiol* **30**, 2776-9.

Smith, I. L., Cherrington, J. M., Jiles, R. E., Fuller, M. D., Freeman, W. R. & Spector, S. A. (1997a). High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J Infect Dis* **176**, 69-77.

Smith, J. S. & Robinson, N. J. (2002). Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. *J Infect Dis* **186 Suppl 1**, S3-28.

Smith, N. A., Wood, C., Asboe, D. & Bingham, J. S. (1997b). Topical foscarnet for aciclovir-resistant mucocutaneous herpes infections in AIDS. *Aids* **11**, 254-5.

Snoeck, R., Andrei, G., De Clercq, E., Gerard, M., Clumeck, N., Tricot, G. & Sadzot-Delvaux, C. (1993). A new topical treatment for resistant herpes simplex infections [letter]. *N Engl J Med* **329**, 968-969.

Snoeck, R., Andrei, G., Gerard, M., Silverman, A., Hedderman, A., Balzarini, J., Sadzot-Delvaux, C., Tricot, G., Clumeck, N. & De Clercq, E. (1994). Successful treatment of progressive mucocutaneous infection due to acyclovir- and foscarnet-resistant

herpes simplex virus with (S)-1-(3- hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine (HPMPC). *Clin Infect Dis* **18**, 570-578.

Soul-Lawton, J., Seaber, E., On, N., Wootton, R., Rolan, P. & Posner, J. (1995). Absolute bioavailability and metabolic disposition of valaciclovir, the L-valyl ester of acyclovir, following oral administration to humans. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2759-64.

Spear, P. G., Eisenberg, R. J. & Cohen, G. H. (2000). Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* **275**, 1-8.

Spector, F. C., Kern, E. R., Palmer, J., Kaiwar, R., Cha, T. A., Brown, P. & Spaete, R. R. (1998a). Evaluation of a live attenuated recombinant virus RAV 9395 as a herpes simplex virus type 2 vaccine in guinea pigs. *J Infect Dis* **177**, 1143-54.

Spector, F. C., Liang, L., Giordano, H., Sivaraja, M. & Peterson, M. G. (1998b). Inhibition of herpes simplex virus replication by a 2-amino thiazole via interactions with the helicase component of the UL5-UL8-UL52 complex. *J Virol* **72**, 6979-87.

Spruance, S. L., Evans, T. G., McKeough, M. B., Thai, L., Araneo, B. A., Daynes, R. A., Mishkin, E. M. & Abramovitz, A. S. (1995a). Th1/Th2-like immunity and resistance to herpes simplex labialis. *Antiviral Res* **28**, 39-55.

Spruance, S. L. & Freeman, D. J. (1990). Topical treatment of cutaneous herpes simplex virus infections. *Antiviral Res* **14**, 305-21.

Spruance, S. L., Hamill, M. L., Hoge, W. S., Davis, L. G. & Mills, J. (1988). Acyclovir prevents reactivation of herpes simplex labialis in skiers. *Jama* **260**, 1597-9.

Spruance, S. L., Jones, T. M., Blatter, M. M., Vargas-Cortes, M., Barber, J., Hill, J., Goldstein, D. & Schultz, M. (2003). High-dose, short-duration, early valacyclovir therapy for episodic treatment of cold sores: results of two randomized, placebo-controlled, multicenter studies. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1072-80.

Spruance, S. L., Kriesel, J. D., Evans, T. G. & McKeough, M. B. (1995b). Susceptibility to herpes labialis following multiple experimental exposures to ultraviolet radiation. *Antiviral Res* **28**, 57-67.

Spruance, S. L., Overall, J. C., Jr., Kern, E. R., Krueger, G. G., Pliam, V. & Miller, W. (1977). The natural history of recurrent herpes simplex labialis: implications for antiviral therapy. *N Engl J Med* **297**, 69-75.

Spruance, S. L., Stewart, J. C., Rowe, N. H., McKeough, M. B., Wenerstrom, G. & Freeman, D. J. (1990). Treatment of recurrent herpes simplex labialis with oral acyclovir. *J Infect Dis* **161**, 185-90.

Spruance, S. L., Tyring, S. K., DeGregorio, B., Miller, C. & Beutner, K. (1996). A large-scale, placebo-controlled, dose-ranging trial of peroral valaciclovir for episodic treatment of recurrent herpes genitalis. Valaciclovir HSV Study Group. *Arch Intern Med* **156**, 1729-35.

Spruance, S. L., Tyring, S. K., Smith, M. H. & Meng, T. C. (2001). Application of a topical immune response modifier, resiquimod gel, to modify the recurrence rate of recurrent genital herpes: a pilot study. *J Infect Dis* **184**, 196-200.

Stabell, E. C., O'Rourke, S. R., Storch, G. A. & Olivo, P. D. (1993). Evaluation of a genetically engineered cell line and a histochemical beta-galactosidase assay to detect herpes simplex virus in clinical specimens. *J Clin Microbiol* **31**, 2796-8.

Stamm, W. E., Handsfield, H. H., Rompalo, A. M., Ashley, R. L., Roberts, P. L. & Corey, L. (1988). The association between genital ulcer disease and acquisition of HIV infection in homosexual men. *Jama* **260**, 1429-33.

Stanberry, L. R., Cunningham, A. L., Mindel, A., Scott, L. L., Spruance, S. L., Aoki, F. Y. & Lacey, C. J. (2000). Prospects for control of herpes simplex virus disease through immunization. *Clin Infect Dis* **30**, 549-66.

Stanberry, L. R., Spruance, S. L., Cunningham, A. L., Bernstein, D. I., Mindel, A., Sacks, S., Tyring, S., Aoki, F. Y., Slaoui, M., Denis, M., Vandepapeliere, P. & Dubin, G. (2002). Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med* **347**, 1652-61.

Stavropoulos, T. A. & Strathdee, C. A. (1998). An enhanced packaging system for helper-dependent herpes simplex virus vectors. *J Virol* **72**, 7137-43.

Stevens, J. G., Wagner, E. K., Devi-Rao, G. B., Cook, M. L. & Feldman, L. T. (1987). RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science* **235**, 1056-9.

Stewart, J. A., Reef, S. E., Pellett, P. E., Corey, L. & Whitley, R. J. (1995). Herpesvirus infections in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* **21 Suppl 1**, S114-20.

Stranska, R., Loon, A. M., Polman, M., Loef, C., Nienhuis, E., Beersma, M. F. C., Bredius, R. G. & Schuurman, R. (2001a). Acyclovir-resistant herpes simplex virus infections in bone marrow transplant recipients. In *International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)*. Toronto, Canada.

Stranska, R., Scholl, D. R., Jollick, J. A., Shaw, C. J., Polman, M., Van Loon, A. M. & Schuurman, R. (2001b). ELVIRA HSV-a rapid assay for antiviral resistance testing of herpes simplex virus. In *International Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)*. Chicago, USA.

Strasser, J. E., Arnold, R. L., Pachuk, C., Higgins, T. J. & Bernstein, D. I. (2000). Herpes simplex virus DNA vaccine efficacy: effect of glycoprotein D plasmid constructs. *J Infect Dis* **182**, 1304-10.

Streisinger, G. & Owen, J. (1985). Mechanisms of spontaneous and induced frameshift mutation in bacteriophage T4. *Genetics* **109**, 633-59.

Sucato, G., Wald, A., Wakabayashi, E., Vieira, J. & Corey, L. (1998). Evidence of latency and reactivation of both herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 in the genital region. *J Infect Dis* **177**, 1069-72.

Sullender, W. M., Miller, J. L., Yasukawa, L. L., Bradley, J. S., Black, S. B., Yeager, A. S. & Arvin, A. M. (1987). Humoral and cell-mediated immunity in neonates with herpes simplex virus infection. *J Infect Dis* **155**, 28-37.

Suter, M., Lew, A. M., Grob, P., Adema, G. J., Ackermann, M., Shortman, K. & Fraefel, C. (1999). BAC-VAC, a novel generation of (DNA) vaccines: A bacterial artificial chromosome (BAC) containing a replication-competent, packaging- defective virus genome induces protective immunity against herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12697-702.

Suzutani, T., Koyano, S., Takada, M., Yoshida, I. & Azuma, M. (1995). Analysis of the relationship between cellular thymidine kinase activity and virulence of thymidine kinase-negative herpes simplex virus types 1 and 2. *Microbiol Immunol* **39**, 787-94.

Suzutani, T., Saijo, M., Nagamine, M., Ogasawara, M. & Azuma, M. (2000). Rapid phenotypic characterization method for herpes simplex virus and varicella-zoster virus thymidine kinases To screen for acyclovir-resistant viral infection. *J Clin Microbiol* **38**, 1839-44.

Swain, M. A. & Galloway, D. A. (1983). Nucleotide sequence of the herpes simplex virus type 2 thymidine kinase gene. *Journal of Virology* **46**, 1045-1050.

Swetter, S. M., Hill, E. L., Kern, E. R., Koelle, D. M., Posavard, C. M., Lawrence, W. & Safrin, S. (1998). Chronic vulvar ulceration in an immunocompetent woman due to acyclovir-resistant, thymidine kinase-deficient herpes simplex virus. *J Infect Dis* **177**, 543-550.

Tabet, S. R., Krone, M. R., Paradise, M. A., Corey, L., Stamm, W. E. & Celum, C. L. (1998). Incidence of HIV and sexually transmitted diseases (STD) in a cohort of HIV-negative men who have sex with men (MSM). *Aids* **12**, 2041-8.

Takamiya, Y., Short, M. P., Moolten, F. L., Fleet, C., Mineta, T., Breakefield, X. O. & Martuza, R. L. (1993). An experimental model of retrovirus gene therapy for malignant brain tumors. *J Neurosurg* **79**, 104-110.

Tal-Singer, R., Lasner, T. M., Podrzucki, W., Skokotas, A., Leary, J. J., Berger, S. L. & Fraser, N. W. (1997). Gene expression during reactivation of herpes simplex virus type 1 from latency in the peripheral nervous system is different from that during lytic infection of tissue cultures. *J Virol* **71**, 5268-76.

Tanaka, K., Kondo, T., Torigoe, S., Okada, S., Mukai, T. & Yamanishi, K. (1994). Human herpesvirus 7: another causal agent for roseola (exanthem subitum). *J Pediatr* **125**, 1-5.

Tanaka, S., Toh, Y. & Mori, R. (1993). Molecular analysis of a neurovirulent herpes simplex virus type 2 strain with reduced thymidine kinase activity. *Arch Virol* **131**, 61-73.

Taylor, T. J., Brockman, M. A., McNamee, E. E. & Knipe, D. M. (2002). Herpes simplex virus. *Front Biosci* **7**, d752-64.

Tebas, P., Nease, R. F. & Storch, G. A. (1998). Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of herpes simplex encephalitis: a decision analysis model. *Am J Med* **105**, 287-95.

Telzak, E. E., Chiasson, M. A., Bevier, P. J., Stoneburner, R. L., Castro, K. G. & Jaffe, H. W. (1993). HIV-1 seroconversion in patients with and without genital ulcer disease. A prospective study. *Ann Intern Med* **119**, 1181-6.

Tenser, R. B. & Edris, W. A. (1987). Trigeminal ganglion infection by thymidine kinase-negative mutants of herpes simplex virus after in vivo complementation. *J Virol* **61**, 2171-4.

Tenser, R. B., Edris, W. A., Gaydos, A. & Hay, K. A. (1994). Secondary herpes simplex virus latent infection in transplanted ganglia. *J Virol* **68**, 7212-20.

Tenser, R. B., Gaydos, A. & Hay, K. A. (1996). Reactivation of thymidine kinase-defective herpes simplex virus is enhanced by nucleoside. *J Virol* **70**, 1271-6.

Tenser, R. B., Hay, K. A. & Edris, W. A. (1989). Latency-associated transcript but not reactivatable virus is present in sensory ganglion neurons after inoculation of thymidine kinase-negative mutants of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **63**, 2861-2865.

Thackray, A. M. & Field, H. J. (2000). The effects of antiviral therapy on the distribution of herpes simplex virus type 1 to ganglionic neurons and its consequences during, immediately following and several months after treatment. *J Gen Virol* **81**, 2385-96.

Thouvenot, D. & Morfin, F. (2002). Management of mucocutaneous herpes simplex virus infections in immunocompetent patients: signification and limits of antigen

detection culture methods and antibody detection. *Ann Dermatol Venereol* **129**, 609-19.

Thouvenot, D. & Najioullah, F. (1999). Herpes simplex virus types 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2). *Rev Prat* **49**, 2203-7.

Tomai, M. A., Gibson, S. J., Imbertson, L. M., Miller, R. L., Myhre, P. E., Reiter, M. J., Wagner, T. L., Tamulinas, C. B., Beaurline, J. M., Gerster, J. F. & et al. (1995). Immunomodulating and antiviral activities of the imidazoquinoline S-28463. *Antiviral Res* **28**, 253-64.

Tookey, P. & Peckham, C. S. (1996). Neonatal herpes simplex virus infection in the British Isles. *Paediatr Perinat Epidemiol* **10**, 432-42.

Tsurumi, T., Maeno, K. & Nishiyama, Y. (1987). A single-base change within the DNA polymerase locus of herpes simplex virus type 2 can confer resistance to aphidicolin. *J Virol* **61**, 388-394.

Tyring, S. K., Baker, D. & Snowden, W. (2002). Valacyclovir for herpes simplex virus infection: long-term safety and sustained efficacy after 20 years' experience with acyclovir. *J Infect Dis* **186 Suppl 1**, S40-6.

Tyring, S. K., Carlton, S. S. & Evans, T. (1998). Herpes. Atypical clinical manifestations. *Dermatol Clin* **16**, 783-8, xiii.

Uprichard, S. L. & Knipe, D. M. (1996). Herpes simplex ICP27 mutant viruses exhibit reduced expression of specific DNA replication genes. *J Virol* **70**, 1969-80.

Varmuza, S. L. & Smiley, J. R. (1985). Signals for site-specific cleavage of HSV DNA: maturation involves two separate cleavage events at sites distal to the recognition sequences. *Cell* **41**, 793-802.

Venard, V., Dauendorffer, J. N., Carret, A. S., Corsaro, D., Edert, D., Bordigoni, P. & Le Faou, A. (2001). Infection due to acyclovir resistant herpes simplex virus in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pathol Biol (Paris)* **49**, 553-8.

Verano, L. & Michalski, F. J. (1995). Comparison of a direct antigen enzyme immunoassay, Herpchek, with cell culture for detection of herpes simplex virus from clinical specimens. *J Clin Microbiol* **33**, 1378-9.

Villarreal, E. C. (2001). Current and potential therapies for the treatment of herpesvirus infections. *Prog Drug Res* **Spec**, 185-228.

Visse, B., Huraux, J. M. & Fillet, A. M. (1999). Point mutations in the varicella-zoster virus DNA polymerase gene confers resistance to foscarnet and slow growth phenotype. *J Med Virol* **59**, 84-90.

Vlach, J. & Pitha, P. M. (1992). Herpes simplex virus type 1-mediated induction of human immunodeficiency virus type 1 provirus correlates with binding of nuclear proteins to the NF-kappa B enhancer and leader sequence. *J Virol* **66**, 3616-23.

Vlach, J. & Pitha, P. M. (1993). Differential contribution of herpes simplex virus type 1 gene products and cellular factors to the activation of human immunodeficiency virus type 1 provirus. *J Virol* **67**, 4427-31.

Wade, J. C. & Meyers, J. D. (1983). Neurologic symptoms associated with parenteral acyclovir treatment after marrow transplantation. *Ann Intern Med* **98**, 921-5.

Wagner, E. K. & Bloom, D. C. (1997). Experimental investigation of herpes simplex virus latency. *Clin Microbiol Rev* **10**, 419-43.

Wald, A., Huang, ML., Carrell, D., Selke, S. & Corey, L. (2003). Polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus (HSV) DNA on mucosal surfaces: Comparison with HSV isolation in cell culture. *J Infect Dis* **188**, 1345-51.

Wald, A. & Ashley-Morrow, R. (2002). Serological testing for herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 infection. *Clin Infect Dis* **35**, S173-82.

Wald, A., Corey, L., Cone, R., Hobson, A., Davis, G. & Zeh, J. (1997). Frequent genital HSV-2 shedding in immunocompetent women. *J Clin Invest* **99**, 1092-1097.

Wald, A., Langenberg, A. G., Link, K., Izu, A. E., Ashley, R., Warren, T., Tyring, S., Douglas, J. M., Jr. & Corey, L. (2001). Effect of condoms on reducing the transmission of herpes simplex virus type 2 from men to women. *Jama* **285**, 3100-6.

Wald, A., Zeh, J., Barnum, G., Davis, L. G. & Corey, L. (1996). Suppression of subclinical shedding of herpes simplex virus type 2 with acyclovir. *Ann Intern Med* **124**, 8-15.

Wald, A., Zeh, J., Selke, S. & et, a. (1995). Virologic characteristics of subclinical and symptomatic genital herpes infection. *N Engl J Med* **333**, 770-775.

Wald, A., Zeh, J., Selke, S., Warren, T., Ashley, R. & Corey, L. (2002). Genital shedding of herpes simplex virus among men. *J Infect Dis* **186 Suppl 1**, S34-9.

Wald, A., Zeh, J., Selke, S., Warren, T., Ryncarz, A. J., Ashley, R., Krieger, J. N. & Corey, L. (2000). Reactivation of genital herpes simplex virus type 2 infection in asymptomatic seropositive persons. *N Engl J Med* **342**, 844-50.

Wang, J., Sattar, A. K., Wang, C. C., Karam, J. D., Konigsberg, W. H. & Steitz, T. A. (1997). Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69. *Cell* **89**, 1087-1099.

Wang, T. S., Wong, S. W. & Korn, D. (1989). Human DNA polymerase alpha: predicted functional domains and relationships with viral DNA polymerases. *Faseb J* **3**, 14-21.

Ward, P. L. & Roizman, B. (1994a). Herpes simplex genes: the blueprint of a successful human pathogen. *Trends Genet* **10**, 267-74.

Ward, P. L. & Roizman, B. (1994b). Herpes simplex genes: the blueprint of a successful human pathogen. *Trends Genet* **10**, 267-74.

Wasserheit, J. N. (1992). Epidemiological synergy. Interrelationships between human immunodeficiency virus infection and other sexually transmitted diseases. *Sex Transm Dis* **19**, 61-77.

Watson, R. J. & Clements, J. B. (1980). A herpes simplex virus type 1 function continuously required for early and late virus RNA synthesis. *Nature* **285**, 329-30.

Weinberg, A., Bate, B. J., Masters, H. B., Schneider, S. A., Clark, J. C., Wren, C. G., Allaman, J. A. & Levin, M. J. (1992). In vitro activities of penciclovir and acyclovir against herpes simplex virus types 1 and 2. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 2037-8.

Whitley, R. (2001). Herpes simplex viruses. In *Fields Virology*, Fourth edn, pp. 2461-2509. Edited by P. M. H. David M. Knipe. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Wilkins.

Whitley, R. J. & Gnann, J. W., Jr. (1992). Acyclovir: a decade later. *N Engl J Med* **327**, 782-9.

Whitley, R. J. & Hilliard, J. (2002). Herpes Simplex Viruses. In *Clinical Virology*, Second edn, pp. 375-401. Edited by R. J. W. a. F. G. H. Douglas D. Richman. Washington, DC: ASM Press.

Whitley, R. J., Kern, E. R., Chatterjee, S., Chou, J. & Roizman, B. (1993). Replication, establishment of latency, and induced reactivation of herpes simplex virus gamma 1 34.5 deletion mutants in rodent models. *J Clin Invest* **91**, 2837-43.

Whitley, R. J., Kimberlin, D. W. & Roizman, B. (1998). Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis* **26**, 541-53; quiz 554-5.

Whitley, R. J. & Roizman, B. (2001). Herpes simplex virus infections. *Lancet* **357**, 1513-8.

Whitley, R. J. & Roizman, B. (2002). Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable? *J Clin Invest* **110**, 145-51.

Whitley, R. J., Soong, S. J., Hirsch, M. S., Karchmer, A. W., Dolin, R., Galasso, G., Dunnick, J. K. & Alford, C. A. (1981). Herpes simplex encephalitis: vidarabine therapy and diagnostic problems. *N Engl J Med* **304**, 313-8.

Wilcox, C. L., Crnic, L. S. & Pizer, L. I. (1992). Replication, latent infection, and reactivation in neuronal culture with a herpes simplex virus thymidine kinase-negative mutant. *Virology* **187**, 348-52.

Wilcox, C. L. & Johnson, E. M., Jr. (1988). Characterization of nerve growth factor-dependent herpes simplex virus latency in neurons in vitro. *J Virol* **62**, 393-9.

Wilson, J. B., Hayday, A., Courtneidge, S. & Fried, M. (1986). A frameshift at a mutational hotspot in the polyoma virus early region generates two new proteins that define T-antigen functional domains. *Cell* **44**, 477-87.

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

Wooley, P. & Chandiok, S. (2000). Serological prevalence of herpes simplex virus type 2 amongst GUM clinic aattendees in a district general hospital setting. *Int J STD AIDS* **11**, 379-382.

WuDunn, D. & Spear, P. G. (1989). Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J Virol* **63**, 52-8.

Yamanishi, K., Okuno, T., Shiraki, K., Takahashi, M., Kondo, T., Asano, Y. & Kurata, T. (1988). Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* **1**, 1065-7.

Yeung-Yue, K. A., Brentjens, M. H., Lee, P. C. & Tyring, S. K. (2002). Herpes simplex viruses 1 and 2. *Dermatol Clin* **20**, 249-66.

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

ANNEXE

ANNEXE-I : Resistance of Herpesviruses to Antiviral Drugs: Clinical Impacts and Molecular Mechanisms

Running title: Drug-Resistant Herpesviruses.

Christian Gilbert*, Julie Bestman-Smith*, and Guy Boivin#.

Research Center in Infectious Diseases, Centre Hospitalier Universitaire de Québec and Laval University, Québec City, Canada.

Abstract count: 236
Text count: 8 594

* The first two authors contributed equally to this work.

Correspondence author:
Dr. Guy Boivin
CHUQ-CHUL, Room RC-709
2705 blvd. Laurier
Sainte-Foy, QC
Canada G1V 4G2
Tel. : (418) 654-2705
Fax : (418) 654-2715
E-mail: Guy.Boivin@crchul.ulaval.ca

Abstract

Nucleoside analogues such as acyclovir and ganciclovir have been the mainstay of therapy for alphaherpesviruses (herpes simplex virus (HSV) and varicella-zoster virus (VZV)) and cytomegalovirus (CMV) infections, respectively. Drug-resistant herpesviruses are found relatively frequently in the clinic, almost exclusively among severely immunocompromised patients receiving prolonged antiviral therapy. For instance, close to 10% of patients with AIDS receiving intravenous ganciclovir for 3 months excrete a drug-resistant CMV isolate in their blood or urine and this percentage increases with cumulative drug exposure. Many studies have reported that at least some of the drug-resistant herpesviruses retain their pathogenicity and can be associated with progressive or relapsing disease. Viral mutations conferring resistance to nucleoside analogues have been found in either the drug activating/phosphorylating genes (HSV or VZV thymidine kinase, CMV UL97 kinase) and/or in conserved regions of the viral DNA polymerase. Currently available second line agents for the treatment of herpesvirus infections – the pyrophosphate analogue foscarnet and the acyclic nucleoside phosphonate derivative cidofovir – also inhibit the viral DNA polymerase but are not dependent on prior viral-specific activation. Hence, viral DNA polymerase mutations may lead to a variety of drug resistance patterns which are not totally predictable at the moment due to insufficient information on specific drug binding sites on the polymerase. Although some CMV and HSV DNA polymerase mutants have been found to replicate less efficiently in cell cultures, further research is needed to correlate viral fitness and clinical outcome.

Introduction

The herpesviridae family includes large, DNA-containing, enveloped viruses. The eight human herpesviruses (HHV) are divided into three subfamilies: 1- the α-herpesvirinae (herpes simplex virus (HSV) type 1 and 2, varicella-zoster virus (VZV)); 2- the β-herpesvirinae (cytomegalovirus (CMV), HHV-6 and HHV-7); and 3- the γ-herpesvirinae (Epstein-Barr virus (EBV) and HHV-8). Some of those viruses, in particular members of the α-herpesvirinae subfamily are associated with significant primary and recurrent infections among immunocompetent hosts. Importantly, all HHV infections can result in severe disease among immunocompromised patients. For instance, AIDS patients may present chronic and/or disseminated cutaneous herpetic lesions[1] and they may experience frequent recurrences of localized or disseminated zoster[2]. Furthermore, CMV is the most common cause of sight-threatening infections among AIDS patients and is associated with significant morbidity and mortality among solid organ transplant (SOT) or bone marrow transplant (BMT) recipients. This review will summarize current concepts on herpesvirus resistance to antiviral agents encompassing the incidence, clinical significance, and molecular aspects of drug-resistant strains with a focus on HSV, VZV, and CMV.

1-Antiviral agents and mechanisms of action

Active compounds currently available for the treatment of herpesvirus infections include the nucleoside analogues acyclovir, penciclovir, vidarabine, and ganciclovir; the acyclic nucleoside phosphonate (ANP) derivative cidofovir ([(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine], HPMPC); the pyrophosphate analogue foscarnet as well as the CMV antisense molecule fomivirsen. More specifically, antiviral agents currently licensed for the treatment of HSV and VZV infections include acyclovir (zovirax, GlaxoSmithKline) and its valyl-ester prodrug valacyclovir (valtrex, GlaxoSmithKline), famciclovir (famvir, Novartis) which is the valyl-ester prodrug of penciclovir, and foscarnet (foscavir, Astra-Zeneca). The following agents have been licensed for the treatment of CMV infections: ganciclovir (cytovene, Hoffmann LaRoche) and its prodrug valganciclovir (valcyte, Hoffmann LaRoche), cidofovir (vistide, Gilead Sciences), foscarnet, and fomivirsen (vitravene, Novartis).

Except for the CMV antisense molecule, all compounds terminate viral DNA synthesis by inhibiting the viral DNA polymerase (pol) (Fig. 1). Acyclovir, penciclovir, and ganciclovir are deoxyguanosine analogues that must be phosphorylated to their triphosphate form to exert their antiviral activity. The thymidine kinase (TK) of HSV (UL23) and VZV (ORF36) as well as the CMV protein kinase homologue (UL97) phosphorylate these compounds to their monophosphate form.[3-5] Cellular kinases next add phosphates to form the active triphosphate compounds.[6] The triphosphate forms are competitive inhibitors of the viral DNA pol. In addition, incorporation of acyclovir triphosphate into the replicating viral DNA chain stops synthesis whereas penciclovir- and ganciclovir-triphosphate cause a slowing and eventual cessation of the viral DNA chain elongation by virtue of a 3′ hydroxyl group that can permit some chain extension.[6] In agreement with the previously described mechanisms of action, viral mutations conferring resistance to nucleoside analogues have been found in either the activating/phosphorylating genes (TK, UL97 kinase) and/or in the viral DNA pol. In contrast to the other nucleoside analogues, vidarabine is not dependent on viral-specific activation with phosphorylation entirely realized by cellular kinases.[7]

Cidofovir is an ANP (cytidine nucleotide) derivative that must be phosphorylated to its diphosphoryl derivative by cellular enzymes to exert its antiviral activity. Cidofovir diphosphate

then acts both as a potent inhibitor and an alternate substrate for the viral DNA pol.[8,9] Adefovir ([9-(2-phosphonylmethoxymethyl)adenine], PMEA) is another ANP derivative with *in vitro* activity against herpesviruses.[10] An oral prodrug, adefovir dipivoxil, is currently in phase III for the treatment of Hepatitis B infections. Resistance to ANP derivatives is conferred by mutations in the viral DNA pol as discussed below. Foscarnet (trisodium phosphonoformate) is a pyrophosphate analogue that directly inhibits the viral DNA polymerase activity without prior phosphorylation.[11] Foscarnet forms a complex with the pyrophosphate binding site of the viral DNA pol and prevents the cleavage of pyrophosphate from deoxynucleotide-triphosphates. Not surprisingly, resistance to foscarnet has been mapped to specific DNA pol mutations (see below). Finally, fomivirsen is a 21-base oligonucleotide with phosphorothioate linkages that is complementary to the CMV immediate-early-2 mRNA.[12]

The three viral products implicated in herpesvirus resistance to antiviral agents are the TK (HSV/VZV), the UL97 phosphotransferase (CMV), and the DNA pol (HSV/VZV/CMV). Their biological roles and genomic organization will be briefly described. The viral TK, which is more properly a nucleoside kinase, efficiently phosphorylates a wide variety of nucleoside analogues that are not well phosphorylated by cellular kinases.[13] This is the basis for the use of various nucleoside analogues in the treatment of herpesvirus infections. Darby et al. have proposed a model for the active center of the HSV-1 TK that includes three regions: an ATP-binding site (a.a. 51 to 63), a nucleoside-binding site (a.a. 168-176), and the a.a. 336 which would be required for the 3D configuration of the enzyme.[14] In addition, there are six highly conserved regions among human and animal TK genes.[15] The UL97 ORF of CMV encodes for a protein kinase homologue. The exact biological role of the CMV UL97 protein is not completely elucidated although recent evidences suggest that it is involved in viral DNA synthesis and encapsidation.[16] The catalytic domain of the protein kinases consist of 11 major conserved regions (I to XI).[17] There are putative regions in the CMV UL97 genome that have been associated with ATP binding (encompassing codons 460 to 520) and substrate binding (encompassing codons 590 to 607).[18] The viral DNA pol is one of the pivotal enzyme implicated in herpesvirus replication. A catalytic domain consisting of eight highly conserved regions (I to VII and δ-C) is present in the carboxyl-terminal portion of this enzyme.[19,20] Some DNA pol regions are likely to be involved in specific substrate recognition although the exact drug binding sites have not been determined.

2-Phenotypic and genotypic assays for evaluating antiviral drug susceptibility

Assessment of herpesvirus susceptibility or resistance to antiviral agents can be done using two complementary approaches: phenotypic and genotypic assays. Phenotypic assays are used to determine the concentration of an antiviral that would inhibit 50% or 90% of virus growth in culture (reported as 50% or 90% inhibitory concentration, IC_{50} or IC_{90}). Different methods have been described for measuring herpesvirus susceptibility including plaque reduction assays[21], dye-uptake assays[22], DNA:DNA hybridization assays[23], flow cytometry[24], and ELISA tests[25]. The plaque reduction assay has been considered the gold standard for determining drug susceptibility of herpesviruses although none of the previous methods has been truly standardized. A variety of factors can influence IC_{50} results obtained with current assays including the type of cells, the size of the viral inoculum, and the range of drug concentrations that ensures a valid endpoint. Different IC_{50} breakpoint values may be obtained depending on the type of assays selected.[26] The plaque reduction assay, although a very simple test, is labor-intensive and somewhat subjective when counting very small plaques. Furthermore, phenotypic assays are generally limited by the long time required before completion (up to 6 weeks for CMV). Nevertheless, an effort has recently been made to develop and validate a consensus plaque reduction assay for CMV susceptibility testing.[27]

Due to high interassay variability, IC_{50} results should be reported with caution in particular when using the plaque reduction assay. Appropriate susceptible and resistant controls should be included in each assay and, whenever possible, a baseline viral isolate from the same patient should be tested in parallel with the suspected drug-resistant isolate. *In vitro* resistance can be defined by an IC_{50} greater than a cut-off value set by testing a pool of pre-therapy viruses (the cut-off values have not been determined for all viruses against all drugs) or by showing a >3- to 5-fold increase of the IC_{50} value compared to a baseline isolate from the same patient. Another important challenge associated with phenotypic methods is their lack of sensitivity for detecting small numbers of drug-resistant viruses in a heterogeneous viral background.[26] Furthermore, there exists also the possibility of selecting viruses with a biological replicative advantage (wild-type over mutant viruses) during initial viral passages in cells in the absence of drug pressure.[28] Despite the previous limitations, phenotypic methods will still be needed in

order to evaluate viral susceptibility to new agents and to correlate IC_{50} results with specific viral mutations. The latter point is a crucial step in designing adequate genotypic assays.

Genotypic methods based on detection of viral mutations conferring drug resistance directly in biological fluids or tissues may overcome some of the bias introduced by traditional susceptibility assays. DNA sequences of specific amplified viral genes can be compared to those of a baseline specimen from the same patient or to a database of susceptible viruses. Such approach is still rather complicated for routine use in clinic since it requires PCR amplification and DNA sequencing capabilities. Furthermore, it requires a good knowledge of interstrain variability in the studied viral gene to discriminate between "variants" associated with gene polymorphism and true "mutants" associated with drug resistance.[29-31] Genotypic assays are currently used more frequently for assessing CMV than HSV resistance in part due to a better knowledge of CMV UL97[32] and DNA pol[33] gene polymorphisms and also the relatively low numbers of CMV UL97 mutations conferring ganciclovir resistance. Indeed, three UL97 mutated codons (460, 594, and 595) account for approximately 75% of ganciclovir-resistance mutations.[34,35] This has led to the development of screening assays based on restriction enzyme analysis of UL97 PCR products. In this approach, different band patterns can be seen after migration on a polyacrylamide gel due to the loss or creation of a restriction site at a specific UL97 codon.[36,37] The major advantage of such method is that a susceptibility profile based on gene analysis can be obtained in less than two days compared to approximately six weeks for the plaque reduction assay. Furthermore, such assay may detect the presence of a mixed population at a specific codon with a lower limit of detection of 10% i.e. when a mutant reaches 10% of the viral population. Obviously, a negative result does not rule out the presence of a resistant virus since other UL97 mutations (not part of the screening assay) as well as DNA pol mutations may contribute to the drug resistance phenotype. It has been difficult to design similar rapid genotypic assays for HSV or VZV TK mutations since the latter are not clustered.[38] As previously mentioned, both phenotypic and genotypic methods should be pursued at the present time for assessing herpesvirus resistance to antiviral drugs due to our incomplete knowledge of resistance-associated mutations and of levels of resistance conferred by single or multiple viral mutations.

3-HSV and VZV Resistance

A-Clinical incidence and significance.

Antiviral drugs against herpesviruses provide some of the best examples of effective and selective antiviral therapy. However, drug-resistant viruses have been rapidly selected in the laboratory and also identified in the clinic. Contrasting with CMV resistance data (see section 4-A), no extensive survey has been performed to evaluate the rate of emergence of drug-resistant HSV isolates according to the duration of antiviral therapy. Such study would be a difficult task considering that oral and topical acyclovir formulations are widely used. Moreover, no uniform agreement has been reached on a standardized method to measure HSV susceptibility to antiviral agents. Indeed, HSV resistance cut-offs to acyclovir has varied in the literature from 4,4 µM to 13,2 µM according to the method selected i.e. plaque reduction or dye uptake assays and various other factors.[1,39-42] Thus, it is difficult to compare data from different laboratories and define the true incidence of HSV resistance in specific patient populations.

In normal immunocompetent hosts, HSV resistance to acyclovir (which has been the mainstay of therapy for HSV infection) is not a clinically-important problem. Studies have shown that 0.1 to 0.6% of HSV isolates recovered from either untreated or treated immunocompetent subjects harbor a resistant phenotype to acyclovir ($IC_{50} \geq 8,8$ µM) as assessed by a plaque reduction assay, and this seems to reflect the natural occurrence of TK-deficient mutants in a viral population.[43-47] Except for two notable cases[48,49], the occasional recovery of acyclovir-resistant HSV-2 from immunocompetent hosts has not been associated with clinical failure and proved to be transient.[43] However, acyclovir-resistant HSV strains are more often isolated in immunocompromised hosts and such isolates have been associated with persistent and/or disseminated diseases.[1,40,44,50-55] In the few clinical surveys reported, the rate of acyclovir-resistant HSV isolates has varied from 4,3% to 14% among all immunocompromised groups.[40,44] More specifically, Christopher et al., reported that 6,5% of HSV isolates obtained from patients with cancer were resistant to acyclovir compared to 10% from heart or lung transplant recipients, and 6% from AIDS patients.[44] Similarly, Englund et al., showed that 7% of HSV isolates recovered from AIDS patients were resistant to acyclovir compared to 5-14% from diverse SOT and BMT recipients. In another study, 8% of allogeneic cell transplant recipients demonstrated

persistent HSV excretion despite acyclovir therapy whereas 5% of HSV isolates showed significant level of acyclovir resistance *in vitro*.[56] The severity of immunosuppression and the prolonged use of acyclovir are considered two important factors for the development of drug resistance. However, as mentioned previously, no data are available regarding the temporal emergence of resistant HSV isolates according to the duration of therapy. Sparse data are available regarding the incidence of acyclovir-resistant VZV isolates in the clinic but some studies have shown that such resistant viruses have been mainly found in AIDS patients with low CD4 cell counts who presented with atypical, disseminated or relapsing zoster lesions.[57-59] Only a few foscarnet-resistant HSV (IC_{50} ≥330 μM, or a 3-fold increase in IC_{50} value compared to the parental susceptible strain) and VZV isolates have been reported in the clinic.[2,60-64]

B-Mechanism of resistance.

Phenotypically, HSV resistance to acyclovir is related to one of the following mechanisms: i) a complete deficiency in viral TK activity (TK deficient), ii) a decreased production of viral TK (TK low producer), iii) a viral TK protein with altered substrate specificity (TK altered) i.e. the enzyme is able to phosphorylate thymidine, the natural substrate, but does not phosphorylate acyclovir, and finally iv) a viral DNA pol with altered substrate specificity (DNA pol altered). Alteration or absence of the TK protein is most frequently seen in the clinic, probably because TK is not essential for viral replication in most tissues and cultured cells.[29,38] However, several reports have demonstrated that at least some TK activity is needed for HSV reactivation from latency in neural ganglia.[65-67] The TK phenotype is best determined by the selective incorporation of iododeoxycytidine (IdC) and thymidine into infected cells using plaque autoradiography.[68] However, it can be difficult to evaluate residual TK activity in HSV isolates of immunocompromised patients in whom heterogenous populations (TK-competent/TK-deficient) may coexist.[38,69] Recently, Shali et al., have developed a rapid phenotypic assay for assessing acyclovir-resistant VZV strains following expression of the viral TK gene in a TK-deficient bacteria (*tdk* mutant).[70] VZV TK activity can thus be indirectly evaluated by reduction of colony formation in the presence of the nucleoside analogue 5-fluorodeoxyuridine (FUdR). Similarly, the HSV TK gene was expressed in the protozoan parasite *Leishmania*, normally devoid of TK activity, in order to evaluate the role of specific mutations in conferring resistance

to nucleoside analogues.[71] Although such expression systems do not allow the determination of the resistance levels conferred by a specific TK mutation, they may facilitate the discrimination between resistance-associated mutations and polymorphic alterations. Resistance to foscarnet and to the ANP derivatives cidofovir and adefovir is conferred by specific mutations within the viral DNA pol which is the ultimate target of all current antiviral drugs. At the present time, no simple phenotypic assay has been described to rapidly assess the DNA polymerase activity of alphaherpesviruses.

C-Genotypic characterization of drug-resistant viruses and impact of mutations on viral replication.

TK gene mutations

Mutations in the TK gene leading to an incomplete or deficient enzyme are principally due to addition or deletion of nucleotides in long homopolymer runs of G's and C's[29,38,72] which are commonly seen in the HSV TK gene. In fact, two studies have demonstrated that about 50% of the clinical acyclovir-resistant HSV strains contain such type of mutations[29,38], and that the other half harbors single nucleotide substitutions in conserved and non-conserved regions of the TK gene (Table 1[14,15,29,38,42,48,57-59,64,71-86]) and Fig. 2). On the other hand, the VZV TK gene has a lower GC content than HSV-1 and HSV-2 TK's (45% vs. 65% and 69%, respectively) and contains fewer homopolymer repeats of four or more G's and C's (11 vs. 24 and 23, respectively). Nevertheless, premature stop codons responsible for nucleoside analogue resistance have been found in about 50% of the acyclovir-resistant VZV strains sequenced to date (Table 1 and Fig. 2).[57-59]

Addition and deletion of nucleotides can cause a frameshift reading with the production of a truncated protein as demonstrated by immunoprecipitation of TK polypeptides and Western blot analysis of virus-infected cell extracts.[42,72] Sasadeusz et al. demonstrated the functional importance of this type of mutation by restoring TK activity following repair of a homopolymer string of G residues.[72] It has been hypothesized that these mutational "hot spots" could both serve as viral evasion mechanism during drug therapy and also as a way to regain pathogenicity by a mechanism of transcriptional frameshifting, which could explain the *de novo* emergence of TK-

deficient isolates in recurrent lesions.[49,52,69,77,87] Surprisingly, mutations identified in penciclovir-selected HSV mutants in a recent study were generally not found within homopolymeric G and C nucleotide stretches, but rather consisted of non-conservative amino acid (a.a) changes distributed throughout the TK gene.[88] However, despite the selection of different TK mutations under different drug pressure (acyclovir or penciclovir), the selected resistant mutants exhibited complete cross-resistance to both agents. These observations suggest that there may be subtle differences between penciclovir and acyclovir in their interaction with the viral TK and/or DNA pol.

Single point mutations in one or more of the three catalytic sites (ATP-binding site, nucleoside-binding site, and a.a. 336) proposed by Darby et al.[14] have also been frequently found in acyclovir-resistant HSV isolates (Table 1). Such substitutions have been associated with various phenotypes i.e. TK-deficient, TK-low producer, or TK-altered.[14,29,38,48,72,74,82,89] Several mutations have also been identified in non-catalytic and non-conserved regions of the HSV TK gene.[29,38,42,71,72,74-76,80,88] It may be difficult to ascertain the role of a specific mutation located in a non-conserved region, particularly when more than one mutation is present and no pre-therapy isolate is available from the same patient. Indeed, the TK gene has been reported to exhibit a high degree of polymorphism[29-31,71] and discrimination between "true" mutations responsible for drug resistance and those only associated with gene polymorphism ("variants") is of high importance. The previously described TK expressing systems[70,71] could thus be particularly useful to precise the role of new viral changes and to generate a data base of resistance-associated mutations.

The VZV TK is presumed to have an ATP-binding site comprised between a.a 12 to 29 and a nucleoside-binding site between a.a 129 to 145.[78] So far, mutations conferring resistance to nucleoside analogues have been found in all areas of the VZV TK gene[57-59,78], but specific regions including the ATP- and nucleoside-binding sites are considered mutagenic hot spots as well as a.a 231 which has been the most frequently mutated codon described so far (Table 1).[57]

DNA polymerase mutations

The DNA pol gene of HSV is the ultimate target for all currently available anti-HSV drugs. Therefore, a single DNA pol mutation can confer resistance to more than one agent depending on its specific location. However, there is a restricted number of sites at which changes may occur in the DNA pol gene, which would result in resistance while maintaining a functional polymerase.

The demonstration that resistance of HSV to an antiviral could occur through selection of DNA pol mutations was first observed in the laboratory by selecting resistant HSV strains following sequential passages in the presence of increasing drug (acyclovir, pyrophosphate analogues) concentrations. Mutations generated by such methods were mapped within conserved regions δ-C, II, III, and region V (Table 2[10,19,20,60,63,64,71,90-104] and Fig. 3[63,105-109]). It is clear that regions II and III contain the greatest clustering of mutations and are therefore more likely to interact with drugs and natural ligands. Mutations within these conserved regions are frequently associated with resistance to acyclovir and pyrophosphate analogues. The a.a change (Ser to Asn) at codon 724 (region II) was identified in laboratory-derived HSV-1 isolates by several groups.[10,19,20,97] In fact, the serine at this position is found in all herpesvirus DNA pol enzymes and almost every other polymerase sharing this region of sequence similarity. The Ser724Asn mutation was, in most studies, associated with resistance to acyclovir and pyrophosphate analogues.[10,19,20] However, Matthews et al. generated mutants with several a.a. changes at this position (including the Ser to Asn change) that all resulted in a different phenotype (acyclovir-resistance, phosphonoacetic acid hypersusceptibility).[97] Such discrepancy regarding the susceptibility profile to pyrophosphate analogues could be related to sequence differences between the HSV-1 strain used to generate mutants or to the presence of other mutations mapped in non-sequenced regions of the HSV-1 DNA pol gene. Two other a.a. changes in region II, at position 696 (Tyr to His)[92,99] and 700 (Arg to Met)[10], were also associated with HSV-1 susceptibility or hypersusceptibility to pyrophosphate analogues and acyclovir. However, the latter (Arg700Met) was associated with resistance to HPMP derivatives such as cidofovir (HPMPC) and HPMPA.[10] Three laboratory-derived foscarnet-resistant VZV isolates harboring mutations at positions 665, 666, 692 within conserved region II of the DNA pol gene have also been reported, although the acyclovir susceptibility phenotypes were not defined.[101] These results suggest the possibility that different mutations in the same conserved region could be

associated with different drug phenotypes. However, some conflicting results await confirmation using recombinant viruses.

Interestingly, no spontaneous HSV mutations in conserved region I have been generated *in vitro*. In fact, region I is the most conserved region among α-like polymerases[110-112], and appears to be critical for the catalytic function of the enzyme[97]. Using site-directed mutagenesis, it was indeed demonstrated that mutations near the invariant YGDTDS motif of region I were lethal for HSV, revealing the inactivation of an essential polymerase function.[91,95] On the other hand, recombinant constructs containing mutations altering less conserved residues have been generated. Viable mutations in conserved region I have been associated with phosphonoacetic acid and acyclovir resistance.[91,95] Interestingly, one laboratory-derived VZV strain selected under acyclovir pressure contained a Val to Met substitution at position 855[93], which is the same a.a change reported by Marcy et al., at codon 892 within conserved region I of an HSV-1 recombinant[95]. The VZV mutant was associated with a resistant phenotype to acyclovir and phosphonoacetic acid (similar to the HSV-1 mutant) although to a lesser extent. It was suggested that different conformations created by the variances in the non-conserved regions of the VZV and HSV-1 DNA pol genes may cause slight differences in drug susceptibility ratios.[93]

Mutations within conserved region III of laboratory-derived HSV and VZV strains have also been associated with resistance to pyrophosphate analogues and acyclovir, with the exception of a mutation at position 815, conferring susceptibility or even hypersusceptibility to phosphonoacetic acid.[20,96,97] The related mutation in the VZV DNA pol gene (N779S) was also associated with the same phenotype.[93] Interestingly, an acyclovir- and phosphonoacetic acid-resistant HSV-1 isolate with a mutation at position 842 within region III was found to be attenuated for neurovirulence in mice without obvious effects on viral replication in the brain.[98] The mechanism leading to the decreased neurovirulence potential of this mutant has not been yet characterized.

The HSV contains an intrinsic 3'-5' exonuclease activity domain with proofreading function, which maps to the N-terminal half of the polymerase enzyme.[113] The exonuclease domain contains three highly conserved motifs: Exo I, Exo II (which is included in conserved region IV), and Exo III (contained in conserved region δ-C). These motifs appear critical for the 3'-5'-

exonuclease function. Kuhn et al., performed site-directed mutagenesis and used the recombinant baculovirus technology to functionally examine the consequences of mutations on the enzymatic activities.[94] Their results showed that it was possible to generate HSV pol enzymes with an active polymerase but with no or weak exonuclease activity *in vitro*. In fact, mutations in the Exo I motif led to the strongest impairment in exonuclease activity with the acquisition of a strong mutator phenotype[94], while mutations in the Exo II motif strongly affected DNA polymerase activity and was lethal to the virus[114]. Indeed, no mutations conferring a drug resistance phenotype were mapped within the Exo II motif of the HSV or VZV DNA pol genes. On the other hand, mutations in conserved region IV located outside the critical Exo II domain have been identified within the DNA pol gene of CMV (Table 3[5,17,18,34,37,115-141]) although no data on the enzyme specific activities were available.[110]

Incorporation of Exo III mutations into the HSV genome resulted in mutant viruses displaying only modest replication defects in Vero cells despite impairement in exonuclease activity.[142] These mutations were associated with resistance to phosphonacetic acid and hypersusceptibility to nucleoside analogues.[102] Furthermore, these viruses exhibited substantial higher mutational rates since the 3'-5' exonuclease contributes substantially to the fidelity of viral DNA replication.[142] These results suggest that such mutations could lead, if selected, to a multi-drug resistance phenotype. Interestingly, a Val to Met mutation at position 573 within motif Exo III was selected *in vitro* under pressure with cidofovir (HPMPC).[10] Such mutants remained susceptible to acyclovir and, contrasting with previously described Exo III mutants, exibited hypersusceptibility to pyrophosphate analogues. However, the exonuclease activity of these mutants was not assessed.

Only a few laboratory-derived mutants have been reported in conserved region V, and none have been found in conserved regions VI and VII, although clinical isolates harboring such mutations have been reported and will be discussed later.[60,64] An HSV mutation in region V (Asn 961 to Lys) was associated with a reduced susceptibility to acyclovir and pyrophosphate analogues.[19] Interestingly, Chiu et al., found that mutation 961 was associated with hypersusceptibility to penciclovir.[90]

Mutations arising between conserved regions of HSV could also lead to antiviral resistance. Indeed, resistance to HPMP derivatives such as cidofovir (HPMPC) and HPMPA has been linked to changes in the C-terminal part of the DNA pol (L1007M and I1028T) outside conserved regions. Interestingly, these mutations did not alter the susceptibility pattern to PME derivatives such as adefovir (PMEA) and PMEDAP.[10] These results, in accordance with others[110,143], suggest that the two subclasses of ANP analogues (i.e. HPMP and PME derivatives) differ in their mode of interaction with the viral DNA pol. Moreover, most selected mutants that exhibited resistance to HPMP derivatives remained susceptible to acyclovir and to the pyrophosphate analogues. On the other hand, resistance to PME derivatives such as adefovir is generally associated with pyrophosphate analogues cross-resistance (in both laboratory-derived and clinical HSV isolates), suggesting that the PME compounds interact at a site on the DNA pol that overlaps with the pyrophosphate-binding site.[10,110,143,144] These data substantiate the possibility that cidofovir, but not adefovir, could be an efficient alternative therapy for foscarnet-resistant HSV infections.

The first two clinical HSV isolates containing a DNA pol mutation selected under prolonged acyclovir therapy contained respectively a mutation at position 841 (Gly to Ser) in conserved region III, and at position 941 (Tyr to His) in conserved region VII.[60,63,145] Both isolates exhibited resistance to acyclovir and pyrophosphate analogues as confirmed by marker transfer experiments.[20,63,98] The Tyr941His change has been associated with an attenuated HSV replication pattern in brain resulting in decreased neurovirulence in a mouse model.[98]

More recently, nine foscarnet-resistant HSV clinical isolates from HIV-infected subjects in whom acyclovir and foscarnet therapy sequentially failed have been described.[64] These isolates contained single-base substitutions in conserved regions (II, III, or VI) and in non-conserved regions (between I and VII) of the DNA pol gene. Interestingly, most of these isolates retained susceptibility or, at the most, borderline levels of susceptibility to acyclovir.[64,143] These isolates were cross-resistant to adefovir but susceptible to cidofovir.[143] Only a few VZV-infected patients with clinical failure to foscarnet therapy have been reported.[2,61,62] Genotypic data are available for only one isolate obtained from an AIDS patient who failed acyclovir and foscarnet[100]. This

isolate contained a Lys to Glu change at codon 512 (δ-region C) and showed a significant decrease in susceptibility to foscarnet. However, acyclovir susceptibility levels were not reported.

Considering the currently available data, no perfect correlation can be made between mutation in a specific DNA pol conserved region and the resulting susceptibility phenotype to DNA pol inhibitors. First, previously reported DNA pol mutants were not tested for all compounds. Second, presence of additional mutations elsewhere in the HSV genome were not necessarily excluded, especially when DNA pol mutants were generated under antiviral drug pressure. The latter point could explain some of the phenotype discrepancies reported by different groups. Identification of any single region as the unique binding site for nucleoside analogues, pyrophosphate analogues, and ANP derivatives has not been possible. Thus, interaction of these antivirals with the polymerase most probably requires the folding of several non-contiguous regions within the protein.[97] Nevertheless, certain resistance patterns have emerged from published studies. For example, cidofovir therapy (both intravenous and topical) has been shown to be clinically useful in the treatment of acyclovir- and foscarnet-resistant HSV lesions and such approach is in line with previous phenotypic and genotypic studies.[143] Further work is needed to identify more precisely the binding sites of the current antiviral agents on the DNA pol enzyme which could be useful to predict with more accuracy the resulting phenotype associated with specific mutations. New systems to generate and evaluate specific HSV mutations such as overlapping viral cosmids and plasmids allowing rapid site-directed mutagenesis as described for CMV[110] or the use of a bacterial artificial chromosome system could be of high interest in that matter.

4-CMV resistance

A-Clinical incidence and significance.

Shortly after ganciclovir received approval for its use in the treatment of CMV disease, it became evident that ganciclovir-resistant CMV strains could be responsible for treatment failures.[146] Since then, several reports have confirmed that CMV resistance to ganciclovir was associated not only with sustained excretion of the virus in the blood or in other body sites, but also with progressive disease despite antiviral therapy.[36] Spread of the virus to other body sites such as the

central nervous system (CNS) also suggests that at least some ganciclovir-resistant viruses may retain their pathogenicity.[120,147,148] Depending on the laboratory method used, ganciclovir resistance is either defined as i) IC_{50} values over 6-12 μM[34,37,115,124,129,135,139,140,149-152] or ii) a 2 to 5-fold increase in IC_{50} values for viruses isolated during therapy as compared to those of the corresponding pretherapy isolates[110,130,153].

A few well-documented studies have assessed the clinical incidence of ganciclovir resistance in patients with AIDS. The first one, presented by Drew and colleagues[150], evaluated the excretion of resistant viruses in the urine of 31 patients receiving intravenous (iv) ganciclovir for treatment of CMV retinitis. In this study, no resistant strains were isolated in patients treated for ≤ 3 months. However, among patients treated for >3 months, 38% of those excreting CMV in their urine had a resistant strain which represented about 8% of all patients treated with ganciclovir during that period. More recent studies with a greater number of patients have used either phenotypic[124,151,152] or genotypic[35] assays to estimate the rate of ganciclovir resistance. In all studies, the incidence of resistance in ganciclovir-naïve patients was a rare event, occuring in 0 to 3% of patients studied.[35,124,151,152,154] In two studies, the temporal emergence of ganciclovir-resistant strains in relation with cumulative drug exposure was documented. Jabs and colleagues studied the excretion of ganciclovir-resistant strains in blood and urine of 76 AIDS patients treated with ganciclovir for CMV retinitis. They showed that the percentage of patients excreting a ganciclovir-resistant strain in either blood or urine was increasing with time being 7, 12, and 28% of patients after 3, 6, and 9 months of ganciclovir therapy, respectively.[152] Our group, on the other hand, has assessed the emergence of specific mutations conferring ganciclovir resistance directly in blood specimens of AIDS patients treated with valganciclovir (a highly bioavailable oral prodrug of ganciclovir). We were able to detect such mutations in 2, 7, 9, 13, and 15% of patients after 3, 6, 9, 12, and 18 months of cumulative therapy.[35] Despite the use of more sensitive methods to detect ganciclovir resistance in the latter study, the lower incidence of resistance as compared to the Jabs' study might be explained either by the improvement achieved in anti-CMV maintenance therapy (better tolerance of oral medication) and/or the availability of highly active antiretroviral therapy (HAART) for patients with AIDS. In addition, no significant differences were found, in terms of incidence of ganciclovir resistance, between patients assigned

to receive oral or iv ganciclovir as maintenance therapy[151,152] or between patients receiving iv ganciclovir or oral valganciclovir as induction regimen[35].

Drug-resistant CMV strains have also been reported in SOT[125,155-159] and BMT[148,160-162] recipients, in patients with hematologic malignancies[146], as well as in children with congenital immunodeficiency syndromes[118,123] where such strains have also been associated with treatment failures and disease progression. However, well-documented prospective studies evaluating the temporal incidence of ganciclovir resistance within those populations are lacking. Three recent studies have assessed the rate of ganciclovir resistance in SOT recipients. Kruger et al. retrospectively studied 348 lung-transplant recipients.[155] Among these patients, 18 (5.2%) were found to excrete a ganciclovir-resistant strain in blood or bronchoalveolar lavage (BAL) samples after a median ganciclovir exposure time of 79 (±52) days. The authors found no significant differences in the rate of emergence of ganciclovir-resistant CMV strains between the different donor/recipient CMV-serologic groups. Limaye and colleagues recently reported a study in which 4 (9%) of 45 lung-transplant recipients were excreting a ganciclovir-resistant strain in BAL fluid or blood after a median ganciclovir treatment of 100 days.[157] In the latter study, however, the incidence of resistance among the CMV-seropositive donor (D^+)/CMV-seronegative recipient (R^-) group (27%) was much higher than among CMV-seropositive recipients (3%). Given the retrospective nature of the previous studies (in which susceptibility testing was performed only when resistance was clinically suspected), it is likely that the incidence of resistance may be even higher in lung-transplant recipients. Limaye and colleagues also studied the incidence of CMV resistance to ganciclovir in 240 various transplant recipients (liver, kidney, pancreas or kidney/pancreas) receiving oral ganciclovir as prophylaxis.[156] In this study, the incidence of ganciclovir resistance was 2.1% among all patients and 7% among the D^+/R^- group as compared to 0% in the R^+ group. Most importantly, a ganciclovir-resistant CMV strain was recovered in 20% of patients who developed CMV disease within the first year following transplantation.

The first large-scale study to assess CMV resistance to ganciclovir among BMT recipients was conducted by means of a survey in 68 european transplantation centers.[160] In this study, CMV resistance to ganciclovir was proven by phenotypic assays in only two patients but was clinically

suspected in 23 additional subjects. Of these 25 patients, 15 were switched to foscarnet therapy which resulted in clinical and virological improvement in 13 (87%). In another study reported by Nichols and colleagues[163], none of the isolates recovered from 47 BMT recipients in whom antigenemia levels were increasing despite preemptive ganciclovir therapy had phenotypic evidences of ganciclovir resistance. Similar results were obtained in another study by our group in which the presence of specific CMV UL97 mutations associated with ganciclovir resistance was investigated in a subgroup of BMT recipients exihibiting persistent or recurrent CMV antigenemia.[164] These findings suggest that CMV resistance to ganciclovir in the context of preemptive therapy among BMT recipients is not a major issue although further studies are needed.

Due to its better toxicity profile, acyclovir has also been used with some efficacy as a CMV prophylactic agent in patients with AIDS and in transplant recipients. Given the similar structures as well as mechanism of action of the two compounds[165], it has been postulated that prolonged use of acyclovir might select for ganciclovir-resistant CMV strains. This hypothesis has recently been supported by the *in vitro* selection of ganciclovir-resistant strains with acyclovir.[139] Although not extensively studied, such selection does not appear to be frequent in the clinic.[128,166-168]

CMV resistance to foscarnet (defined as IC_{50} values >300-500 μM[129,135,169,170] or a 2 to 5-fold increase in IC_{50} values as compared to control[153] or parental strains[110,171]) , cidofovir (IC_{50} values ≥2 μM[129,135,170] or a ≥2-fold increase in IC_{50} values over parental strain[110,130]), and adefovir (≥2-fold increase in IC_{50} values over parental strain[110,130]) has also been documented in limited studies of transplant recipients and patients with AIDS. As shown for ganciclovir, most studies have reported a low incidence (below 4%) of foscarnet-resistant CMV strains in untreated AIDS patients.[154,170] The rate of foscarnet resistance is also increasing with drug exposure, being estimated at 9, 26, and 37% after 3, 6, and 9 months of cumulative therapy, respectively.[170] Due to its recent introduction on the market, data regarding the incidence of CMV resistance to cidofovir are much more limited. In a study of 22 AIDS patients naïve to anti-CMV therapy, no cidofovir-resistant CMV strains were recovered after a median drug exposure of 8 weeks.[172] However, results from another study conducted among 13 AIDS patients who had never received

anti-CMV therapy showed that 29% excreted a cidofovir-resistant CMV isolate in blood or urine after 3-6 months of cumulative treatment.[170]

B-Mechanisms of resistance.

In the case of ganciclovir, two viral resistance mechanisms could be anticipated based on the drug mechanism of action (Fig. 1) and both have indeed been identified. Early studies clearly showed that the most common phenotype of resistance was the consequence of a reduced accumulation of the triphosphate (active) form of the antiviral in CMV-infected cells.[173,174] In one study, purified DNA pol enzyme from a resistant clinical isolate showed inhibition levels by ganciclovir-triphosphate comparable to those observed with the DNA pol purified from the corresponding pre-therapy isolate therefore demonstrating that impaired ganciclovir phosphorylation was entirely responsible for the resistant phenotype.[174] Unlike HSV and VZV, CMV does not encode a TK. Evidence for a role of the CMV UL97 gene product in ganciclovir phosphorylation was initially reported by two groups. The first one showed that the cloned CMV UL97 ORF product was able to induce ganciclovir phosphorylation in bacteria.[175] The second group reported that a four a.a deletion in the CMV UL97 gene (codons 590-593) was able to transfer ganciclovir resistance to the laboratory strain AD169 and was indeed responsible for the decreased ganciclovir phosphorylation levels observed in a laboratory-derived resistant-strain.[5] Since then, numerous independent studies have shown that this mechanism of ganciclovir resistance was the most frequently encountered in the clinic.[34,35,124]

The other mechanism associated with resistance to ganciclovir and also to the other available DNA pol inhibitors involves alterations in the viral DNA pol enzyme. The first evidences for this resistance mechanism came from recombinant viruses made by transferring a mutated DNA pol gene into the laboratory strain AD169[176,177] and from a clinical plaque-purified strain exibiting resistance to ganciclovir, foscarnet, cidofovir, and HPMPA[178]. These original reports documented the presence of viruses that were resistant to ganciclovir in the presence of WT-levels of ganciclovir-triphosphate. CMV, like other herpesviruses, possesses a DNA pol enzyme with both polymerase and 3'-5' exonuclease activities.[20,108,109] It has been therefore hypothesized that reduced susceptibility of the enzyme to DNA pol inhibitors could be the result of: i) a decreased affinity of the enzyme for the inhibitor, ii) a decreased selective incorporation

of the inhibitors into the elongating DNA chain, or iii) an enhanced proofreading activity of the enzyme.[110] Attempts to study these specific activities using purified enzymes from WT and mutant strains have yielded inconsistent results. Using *in vitro* polymerization and 3'-5' exonuclease assays, two groups have studied alterations (L501F and K513N) located within conserved δ-region C, near the Exo III motif that is believed to participate in the 3'-5' exonuclease function of the enzyme.[130,179] In both assays, DNA pol enzymes were purified from either infected cultures or heterologous expression systems. These purified enzymes were used to measure the enzyme-catalyzed incorporation of radiolabeled dGTP into activated calf thymus DNA (polymerization assay) or the enzyme-catalyzed release of radiolabeled dTMP from oligo(dT) attached to the 3'-end of linearized plasmid DNA (3'-5' exonuclease assay).[130] In one mutant (L501F), the alteration did not affect the DNA polymerase specific activity of the enzyme while the specific exonuclease activity was increased by 50%.[179] However, the other mutant (K513N) showed a 40-80% reduction in DNA polymerase specific activity with virtually no 3'-5' exonuclease specific activity.[130] In the latter case, however, inhibition of the K513N-mutant polymerase activity by ganciclovir-triphosphate and cidofovir-diphosphate did not differ from that observed with the WT pol enzyme despite the fact that the K513N-recombinant virus was 6- and 12-fold less susceptible to these compounds, respectively. Authors of this study have proposed that the absence of other viral proteins involved in the CMV DNA replication process when using these *in vitro* polymerization and 3'-5' exonuclease assays might account for this inconsistency.[130]

Foscarnet differs from all other previously discussed DNA pol inhibitors by virtue of the absence of competition with the natural dNTPs and its lack of incorporation into the elongating DNA molecule.[180] Thus, only one of the proposed resistance mechanisms for DNA pol inhibitors (i.e. a decreased affinity of the enzyme for the inhibitor) is expected to be involved in the foscarnet resistance phenotype. In the *in vitro* polymerization assay, the V715M mutant-enzyme specific activity was 9-fold less susceptible to inhibition by foscarnet than the WT enzyme which correlates with the 10-fold decrease in susceptibility to foscarnet of the V715M-mutant recombinant virus.[130]

C-Genotypic characterization of drug-resistant viruses and impact of mutations on viral replication.

UL97 mutations

Over the past 10 years, several groups have reported that both UL97 and DNA pol (UL54) mutations were associated with CMV resistance. As discussed earlier, the most important mechanism leading to ganciclovir resistance involves alterations within the UL97 gene product. Contrasting with HSV TK gene mutations involved in a similar drug-resistance mechanism, all CMV UL97 mutations described thus far have consisted in a.a substitutions or in-frame deletions strongly suggesting that this particular gene product plays an important role in viral replication. Indeed, a laboratory-engineered UL97-negative CMV strain was recently shown to suffer from a severe replication deficiency as compared to the WT parental strain.[181] Nevertheless, a.a substitutions[18,34,37,115,118-122,125,127,129-132,134-137,139,140,182] or deletions of 1 to 17 codons[5,34,116,117,123,124,126,133,140] potentially associated with CMV resistance to ganciclovir have been identified within the UL97 gene sequence (Table 3 and Fig. 4). With the exception of two mutations located at the 3' extremity of the gene, all mutations have been found within two clusters of codons (codons 460 to 520 and 590 to 607) spanning the proposed ATP-binding and substrate-recognition sites, respectively. Some of these mutations, namely those at codons 460, 520, 594, 595 and 603 have been reported with a high frequency[183] allowing the development of rapid and sensitive molecular detection assays.[37,119,140,184] The role of many of the reported UL97 mutations in conferring resistance to ganciclovir has been confirmed by marker transfer experiments (Table 3). A set of these mutations has been assayed for residual ganciclovir phosphorylation levels in a recombinant vaccina virus (rVV) system.[185] The authors reported that mutations M460V and H520Q were responsible for the highest decrease in residual ganciclovir phosphorylation levels (>90%) while mutations M460I, A594V, L595S, del595 were associated with a 80-90% decrease in residual ganciclovir phosphorylation levels. Finally, mutations C592G, L595F, G598S and C607Y were found to induce lower but yet significant decreases (50-70%) in residual ganciclovir phosphorylation activity.[185] In addition, other reported mutations at codons known to be involved in ganciclovir resistance (mutations M460L; A591D; C592F; A594G; L595T; E596D; K599M; C603Y; del590-600; del590-603; del600-601) are assumed to have a role in resistance as well (Table 3). The role of a few other UL97 mutations (A590T;

N597I; G598V; A606D; V665I) has not been unequivocally established since they have been reported exclusively in the presence of other UL97 mutations known to confer resistance (Table 3). Of note, some mutations whose role has been confirmed by marker transfer experiments (mutations A594V, C603W, T659I) have been also occasionally detected in susceptible isolates (Table 3) which probably reflects the lack of standardization of the currently available phenotypic assays or the presence of heterogeneous viral populations. Lastly, some UL97 "variants" have been encountered in drug-susceptible viruses.[32] Of note, one of them, D605E, has recently been found to partially restore wild-type levels of ganciclovir phosphorylation to a ganciclovir-resistant mutant (A594P) and could act as a compensatory mutation.[182]

Chou and colleagues recently reported an apparent increase in the incidence of some mutations (C592G and potentially A594T) conferring lower levels of ganciclovir resistance that might be the result of the lower plasmatic drug concentrations obtained with oral ganciclovir. They hypothesized that such low-level ganciclovir-resistance UL97 mutations could result in the accumulation of other mutations which in turn would confer higher levels of drug resistance.[140] It has also been reported that CMV UL97 mutations tend to occur after shorter duration of ganciclovir therapy and are associated with lower levels of ganciclovir resistance (IC_{50} values <30 μM) while high-levels of resistance to ganciclovir (IC_{50} values ≥30 μM) are usually, but not invariably, associated with mutations in both UL97 and UL54 genes. Such double mutants tend to emerge after longer periods of drug exposure and are often associated with resistance to cidofovir.[124,129,135]

Some UL97 mutations have been detected up to several months after cessation of ganciclovir treatment or after switching to an alternate therapy[18,186] which suggests that at least some of them are relatively stable. However, the viral fitness of different UL97 mutants has been studied only recently. Using a quantitative point mutation assay, Emery et al. demonstrated that various UL97 mutants suffer from a fitness loss (ranging from 3.5 to 13%) as compared to their WT-counterparts in the absence of ganciclovir therapy.[187,188] As expected, the UL97 mutants have a better fitness profile than the WT viruses in the presence of ganciclovir.

DNA polymerase mutations

The study of CMV DNA pol mutations involved in drug-resistance has been delayed by two factors. One of them is the high rate of polymorphism encountered in this locus.[33] The second factor is explained by the fact that many DNA pol mutants also harbor UL97 mutations.[115,121,129,130,135,141,149,171]. Taken together, these factors often imply the need to perform time-consuming and cumbersome marker transfer experiments in order to study the role of specific mutations. Nevertheless, as shown in Table 4[33,110,115,121,124,129,130,133-135,141,149,171,176,177,189,190], many UL54 mutations have been potentially linked with different drug-resistance profiles and a substantial number has been confirmed by marker transfer experiments.[115,149,171,189] Cihlar and colleagues have also generated recombinant DNA pol mutants from overlapping DNA cosmids and plasmids which has greatly improved our knowledge on the different regions involved in substrate recognition.[110,130]

A few interesting facts can be observed from the analysis of the previous studies. First, except for four mutations, all changes potentially associated with resistance to DNA pol inhibitors lie within one of the eight CMV DNA pol conserved regions. This finding is consistent with the data presented by Chou and colleagues who reported that only 2 of 48 mutations associated with baseline polymorphism of the UL54 gene were located within those conserved regions.[33] A second observation is that mutations associated with comparable drug-resistance phenotypes are generally located within defined clusters of codons. Thus, mutations located within conserved regions IV, the N-terminal extremity of δ-region C and region V are involved in ganciclovir/cidofovir resistance (Fig. 5) while only those located within the first two previous loci seem to confer adefovir hypersusceptibility (Table 4). On the other hand, mutations located within the C-terminal part of δ-region C and within conserved regions II and VI are mostly associated with resistance to foscarnet and adefovir. Finally, mutations located within or at close proximity of conserved region III seem to induce diverse resistance/hypersusceptibility phenotypes (Fig. 5 and Table 4).[110,149] Some mutations in this region (v.g. mutation V812L) are associated with a multi-drug resistance phenotype i.e. resistance to ganciclovir, cidofovir, foscarnet, and adefovir.[130] Surprisingly, the drug-resistance phenotype resulting from HSV and CMV mutations located within the same highly conserved regions of the DNA pol does not

always correlate (Fig. 3 and 5). As an example, mutations within δ-region C of the CMV pol are mostly associated with resistance to ganciclovir and cross-resistance to cidofovir while mutations within the same conserved region of HSV appear to induce a resistance phenotype to pyrophosphate analogues, sometimes associated with cross-resistance to acyclovir or cidofovir. Definitive conclusions regarding some of the discrepant HSV and CMV phenotypes will require generation of specific recombinant HSV DNA pol mutants using available technologies such as overlapping DNA cosmids[191] and bacterial artificial chromosomes (BAC)[192] systems.

Given the pivotal role of the DNA pol enzyme in CMV replication and the virtual absence of baseline variation within conserved regions of this gene, it is reasonable to hypothesize that alterations leading to drug resistance would have an influence of the ability of the virus to replicate. Indeed, two groups have evaluated the replicative properties of recombinant viruses harboring UL54 mutations. One of them reported that the UL54 mutations T700A and V715M (in conserved region II) were responsible for the slow growth phenotype of three clinical CMV isolates.[171] The other group has reported a lower yield of extracellular virion production over time for a K513N (δ-region C) UL54 recombinant mutant as compared to that of a WT-recombinant virus.[130] As immunocompromised patients, especially those with AIDS, are often coinfected with multiple CMV strains[129,193], a WT strain or any strain that is simply more fit for growth in cell culture could overgrow a UL54 mutant virus with replicative deficiency.

Conclusion

Along with the increasing number of immunocompromised subjects and the prolonged administration of antiviral agents, the problem of drug-resistance among herpesviruses is not expected to fade. Clearly, some drug-resistant mutants of HSV and CMV are pathogenic and can result in significant morbidity and mortality among severely immunocompromised patients. The two more important questions a clinician is facing are: When should I look for resistance and what can I do about it? From the data presented in this review, it is clear that drug resistance should be suspected in the case of immunocompromised patients failing high doses of intravenously-administered antiviral therapy. The two key factors in the development of resistance are the degree of immunosuppression and the prolonged use of the drug although resistance may appear rapidly following administration of poorly bioavailable agents such as oral ganciclovir in the presence of a high viral load[194]. At the present time, clinically-relevant results can be obtained by performing phenotypic and genotypic assays for detecting HSV and CMV drug-resistant mutants, respectively (see section 2), although such assays are not completely standardized and widely-vailable. In the presence of viruses resistant to first-line agents (acyclovir for HSV and ganciclovir for CMV), the treatment alternatives include cidofovir and foscarnet. The latter option should be favored when high levels of resistance to a nucleoside analogue are present due to confirmed or suspected mutations in the DNA pol gene with possible cross-resistance to cidofovir[129,135]. For viruses resistant to foscarnet, cidofovir and even nucleoside analogues can be used since the initial HSV TK of CMV UL97 mutants may no longer be present in the absence of specific therapy. However, such mutants may rapidly re-emerge under drug pressure limiting the therapeutic options.

Although considerable advances have been made during recent years in our understanding of the mechanisms of herpesvirus resistance, significant work still needs to be done to evaluate the impact of specific mutations on the virus replicating capacities (fitness) both *in vitro* and *in vivo*. It is also anticipated that a better knowledge of the molecular mechanisms of drug resistance combined to rapid laboratory methods for detecting viral mutant sequences directly in clinical samples will result in more rationale therapeutic strategies. On the other hand, since all currently available anti-herpetic agents target the viral DNA pol, there is an urgent need to develop and evaluate new antivirals with different mechanisms of action. In that regard, a few alternative

compounds with broad or selective anti-herpetic activity have been recently described although none are in late stage of development.[195-197]

References

1. Erlich KS, Mills J, Chatis P et al. Acyclovir-resistant herpes simplex virus infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 1989; 320: 293-296.

2. Safrin S, Berger TG, Gilson I et al. Foscarnet therapy in five patients with AIDS and acyclovir-resistant varicella-zoster virus infection. Ann Intern Med 1991; 115: 19-21.

3. Biron KK, Stanat SC, Sorrell JB et al. Metabolic activation of the nucleoside analog 9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl)guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 2473-2477.

4. Fyfe JA, Keller PM, Furman PA, Miller RL, Elion GB. Thymidine kinase from herpes simplex virus phosphorylates the new antiviral compound, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. J Biol Chem 1978; 253: 8721-8727.

5. Sullivan V, Talarico CL, Stanat SC, Davis M, Coen DM, Biron KK. A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. Nature 1992; 358: 162-164.

6. Balfour HH. Antiviral drugs. N Engl J Med 1999; 340: 1255-1268.

7. Hammer SM, Inouye RT. Antiviral agents. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, eds. Clinical Virology. Ney York: Churchill Livingstone, 1997:185-250

8. De Clercq E. Therapeutic potential of HPMPC as an antiviral drug. Rev Med Virol 1993; 3: 85-86.

9. Ho HT, Woods KL, Bronson JJ, De Boeck H, Martin JC, Hitchcock MJ. Intracellular metabolism of the antiherpes agent (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine. Mol Pharmacol 1992; 41: 197-202.

10. Andrei G, Snoeck R, De Clercq E, Esnouf R, Fiten P, Opdenakker G. Resistance of herpes simplex virus type 1 against different phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purines and

pyrimidines due to specific mutations in the viral DNA polymerase gene. J Gen Virol 2000; 81 Pt 3: 639-648.

11. Chrisp P, Clissold SP. Foscarnet. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with cytomegalovirus retinitis. Drugs 1991; 41: 104-129.

12. Mulamba GB, Hu A, Azad RF, Anderson KP, Coen DM. Human cytomegalovirus mutant with sequence-dependent resistance to the phosphorothioate oligonucleotide fomivirsen (ISIS 2922). Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 971-973.

13. Jamieson AT, Subak Sharpe JH. Biochemical studies on the herpes simplex virus-specified deoxypyrimidine kinase activity. J Gen Virol 1974; 24: 481-492.

14. Darby G, Larder B, Inglis M. Evidence that the "active centre" of the herpes simplex virus thymidine kinase involves an interaction between three distinct regions of the polypeptide. J Gen Virol 1986; 67: 753-758.

15. Balasubramaniam NK, Veerisetty V, Gentry GA. Herpesviral deoxythymidine kinases contain a site analogous to the phosphoryl-binding arginine-rich region of porcine adenylate kinase; comparison of secondary structure predictions and conservation. J Gen Virol 1990; 71: 2979-2987.

16. Wolf DG, Courcelle CT, Prichard MN, Mocarski ES. Distinct and separate roles for herpesvirus-conserved UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 1895-1900.

17. Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science 1988; 241: 42-52.

18. Wolf DG, Smith IL, Lee DJ, Freeman WR, Flores-Aguilar M, Spector SA. Mutations in human cytomegalovirus UL97 gene confer clinical resistance to ganciclovir and can be detected directly in patient plasma. J Clin Invest 1995; 95: 257-263.

19. Gibbs JS, Chiou HC, Bastow KF, Cheng YC, Coen DM. Identification of amino acids in herpes simplex virus DNA polymerase involved in substrate and drug recognition. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 6672-6676.

20. Larder BA, Kemp SD, Darby G. Related functional domains in virus DNA polymerases. EMBO J 1987; 6: 169-175.

21. Swierkosz EM, Hodinka RL. Antiviral agents and susceptibility tests. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, eds. Manual of clinical microbiology. 7th edition. Washington, DC: ASM Press, 1999:1624-1639

22. McLaren C, Ellis MN, Hunter GA. A colorimetric assay for the measurement of the sensitivity of herpes simplex viruses to antiviral agents. Antiviral Res 1983; 3: 223-234.

23. Swierkosz EM, Scholl DR, Brown JL, Jollick JD, Gleaves CA. Improved DNA hybridization method for detection of acyclovir-resistant herpes simplex virus. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 1465-1469.

24. Pavic I, Hartmann A, Zimmermann A et al. Flow cytometric analysis of herpes simplex virus type 1 susceptibility to acyclovir, ganciclovir, and foscarnet. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2686-2692.

25. Gerna G, Baldanti F, Zavattoni M, Sarasini A, Percivalle E, Revello MG. Monitoring of ganciclovir sensitivity of multiple human cytomegalovirus strains coinfecting blood of an AIDS patient by an immediate-early antigen plaque assay. Antiviral Res 1992; 19: 333-345.

26. Boivin G. Drug-resistant herpesviruses: should we look for them? Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17: 539-541.

27. Landry ML, Stanat S, Biron K et al. A standardized plaque reduction assay for determination of drug susceptibilities of cytomegalovirus clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 688-692.

28. Gilbert C, Handfield J, Toma E, Lalonde R, Bergeron MG, Boivin G. Emergence and prevalence of cytomegalovirus UL97 mutations associated with ganciclovir resistance in AIDS patients. AIDS 1998; 12: 125-129.

29. Morfin F, Souillet G, Bilger K, Ooka T, Aymard M, Thouvenot D. Genetic characterization of thymidine kinase from acyclovir-resistant and -susceptible herpes simplex virus type 1 isolated from bone marrow transplant recipients. J Infect Dis 2000; 182: 290-293.

30. Kudo E, Shiota H, Naito T, Satake K, Itakura M. Polymorphisms of thymidine kinase gene in herpes simplex virus type 1: analysis of clinical isolates from herpetic keratitis patients and laboratory strains. J Med Virol 1998; 56: 151-158.

31. Lee NY, Tang Y-W, Espy MJ et al. Role of genotypic analysis of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus for determination of neurovirulence and resistance to acyclovir. J Clin Microbiol 1999; 37: 3171-3174.

32. Lurain NS, Weinberg A, Crumpacker CS, Chou S. Sequencing of cytomegalovirus UL97 gene for genotypic antiviral resistance testing. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2775-2780.

33. Chou S, Lurain NS, Weinberg A, Cai GY, Sharma PL, Crumpacker CS. Interstrain variation in the human cytomegalovirus DNA polymerase sequence and its effect on genotypic diagnosis of antiviral drug resistance. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1500-1502.

34. Chou S, Guentzel S, Michels KR, Miner RC, Drew WL. Frequency of UL97 phosphotransferase mutations related to ganciclovir resistance in clinical cytomegalovirus isolates. J Infect Dis 1995; 172: 239-242.

35. Boivin G, Gilbert C, Gaudreau A, Greenfield I, Sudlow R, Roberts NA. Rate of emergence of cytomegalovirus (CMV) mutations in leukocytes of patients with acquired immunodeficiency syndrome who are receiving valganciclovir as induction and maintenance therapy for CMV retinitis. J Infect Dis 2001; 184: 1598-1602.

36. Boivin G, Chou S, Quirk MR, Erice A, Jordan MC. Detection of ganciclovir resistance mutations quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA in leukocytes of patients with fatal disseminated CMV disease. J Infect Dis 1996; 173: 523-528.

37. Chou S, Erice A, Jordan MC et al. Analysis of the UL97 phosphotransferase coding sequence in clinical cytomegalovirus isolates and identification of mutations conferring ganciclovir resistance. J Infect Dis 1995; 171: 576-583.

38. Gaudreau A, Hill E, Balfour HH, Erice A, Boivin G. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant herpes simplex viruses from immunocompromised patients. J Infect Dis 1998; 178: 297-303.

39. Collins P, Ellis MN. Sensitivity monitoring of clinical isolates of herpes simplex virus to acyclovir. J Med Virol 1993; Suppl: 58-66.

40. Englund JA, Zimmerman ME, Swierkosz EM, Goodman JL, Scholl DR, Balfour HH, Jr. Herpes simplex virus resistant to acyclovir. A study in a tertiary care center. Ann Intern Med 1990; 112: 416-422.

41. Safrin S, Kemmerly S, Plotkin B et al. Foscarnet-resistant herpes simplex virus infection in patients with AIDS. J Infect Dis 1994; 169: 193-196.

42. Chatis PA, Crumpacker CS. Analysis of the thymidine kinase gene from clinically isolated acyclovir-resistant herpes simplex viruses. Virology 1991; 180: 793-797.

43. Whitley RJ, Gnann JW, Jr. Acyclovir: a decade later. N Engl J Med 1992; 327: 782-789.

44. Christophers J, Clayton J, Craske J et al. Survey of resistance of herpes simplex virus to acyclovir in northwest England. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 868-872.

45. Fife KH, Crumpacker CS, Mertz GJ, Hill EL, Boone GS. Recurrence and resistance patterns of herpes simplex virus following cessation of > or = 6 years of chronic suppression with acyclovir. J Infect Dis 1994; 169: 1338-1341.

46. Mertz GJ, Jones CC, Mills J et al. Long-term acyclovir suppression of frequently recurring genital herpes simplex virus infection. A multicenter double-blind trial. JAMA 1988; 260: 201-206.

47. Boon RJ, Bacon TH, Robey HL et al. Antiviral susceptibilities of herpes simplex virus from immunocompetent subjects with recurrent herpes labialis: a UK-based survey. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 1051.

48. Kost RG, Hill EL, Tigges M, Straus SE. Brief report: recurrent acyclovir-resistant genital herpes in an immunocompetent patient. N Engl J Med 1993; 329: 1777-1782.

49. Swetter SM, Hill EL, Kern ER et al. Chronic vulvar ulceration in an immunocompetent woman due to acyclovir-resistant, thymidine kinase-deficient herpes simplex virus. J Infect Dis 1998; 177: 543-550.

50. Hill EL, Hunter GA, Ellis MN. In vitro and in vivo characterization of herpes simplex virus clinical isolates recovered from patients infected with human immunodeficiency virus. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 2322-2328.

51. Safrin S, Assaykeen T, Follansbee S, Mills J. Foscarnet therapy for acyclovir-resistant mucocutaneous herpes simplex virus infection in 26 AIDS patients: preliminary data. J Infect Dis 1990; 161: 1078-1084.

52. Morfin F, Thouvenot D, Aymard M, Souillet G. Reactivation of acyclovir-resistant thymidine kinase-deficient herpes simplex virus harbouring single base insertion within a 7 Gs homopolymer repeat of the thymidine kinase gene. J Med Virol 2000; 62: 247-250.

53. Wade JC, Newton B, McLaren C, Flournoy N, Keeney RE, Meyers JD. Intravenous acyclovir to treat mucocutaneous herpes simplex virus infection after marrow transplantation: a double-blind trial. Ann Intern Med 1982; 96: 265-269.

54. Boivin G, Erice A, Crane DD, Dunn DL, Balfour HH. Acyclovir susceptibilities of herpes simplex virus strains isolated from solid organ transplant recipients after acyclovir or ganciclovir prophylaxis. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 357-359.

55. Chen Y, Scieux C, Garrait V et al. Resistant Herpes Simplex Virus Type 1 Infection: An Emerging Concern after Allogeneic Stem Cell Transplantation. Clin Infect Dis 2000; 31: 927-935.

56. Chakrabarti S, Pillay D, Ratcliffe D, Cane PA, Collingham KE, Milligan DW. Resistance to antiviral drugs in herpes simplex virus infections among allogeneic stem cell transplant recipients: risk factors and prognostic significance. J Infect Dis 2000; 181: 2055-2058.

57. Morfin F, Thouvenot D, De Turenne-Tessier M, Lina B, Aymard M, Ooka T. Phenotypic and genetic characterization of thymidine kinase from clinical strains of varicella-zoster virus resistant to acyclovir. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2412-2416.

58. Boivin G, Edelman CK, Pedneault L, Talarico CL, Biron KK, Balfour HH, Jr. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant varicella-zoster viruses isolated from persons with AIDS. J Infect Dis 1994; 170: 68-75.

59. Saint-Leger E, Caumes E, Breton G et al. Clinical and virologic characterization of acyclovir-resistant varicella-zoster viruses isolated from 11 patients with acquired immunodeficiency syndrome. Clin Infect Dis 2001; 33: 2061-2067.

60. Collins P, Larder BA, Oliver NM, Kemp S, Smith IW, Darby G. Characterization of a DNA polymerase mutant of herpes simplex virus from a severely immunocompromised patient receiving acyclovir. J Gen Virol 1989; 70: 375-382.

61. Bendel AE, Gross TG, Woods WG, Edelman CK, Balfour HH, Jr. Failure of foscarnet in disseminated herpes zoster. Lancet 1993; 341: 1342.

62. Fillet AM, Visse B, Caumes E, Dumont B, Gentilini M, Huraux JM. Foscarnet-resistant multidermatomal zoster in a patient with AIDS. Clin Infect Dis 1995; 21: 1348-1349.

63. Hwang CB, Ruffner KL, Coen DM. A point mutation within a distinct conserved region of the herpes simplex virus DNA polymerase gene confers drug resistance. J Virol 1992; 66: 1774-1776.

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

65. Coen DM, Kosz-Vnenchak M, Jacobson JG et al. Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 4736-4740.

66. Tenser RB, Hay KA, Edris WA. Latency-associated transcript but not reactivatable virus is present in sensory ganglion neurons after inoculation of thymidine kinase-negative mutants of herpes simplex virus type 1. J Virol 1989; 63: 2861-2865.

67. Wilcox CL, Crnic LS, Pizer LI. Replication, latent infection, and reactivation in neuronal culture with a herpes simplex virus thymidine kinase-negative mutant. Virology 1992; 187: 348-352.

68. Martin JL, Ellis MN, Keller PM et al. Plaque autoradiography assay for the detection and quantitation of thymidine kinase-deficient and thymidine kinase-altered mutants of herpes simplex virus in clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 1985; 28: 181-187.

69. Sasadeusz JJ, Sacks SL. Spontaneous reactivation of thymidine kinase-deficient, acyclovir-resistant type-2 herpes simplex virus: masked heterogeneity or reversion? J Infect Dis 1996; 174: 476-482.

70. Sahli R, Andrei G, Estrade C, Snoeck R, Meylan PR. A rapid phenotypic assay for detection of acyclovir-resistant varicella-zoster virus with mutations in the thymidine kinase open reading frame. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 873-878.

71. Bestman-Smith J, Schmit I, Papadopoulou B, Boivin G. Highly reliable heterologous system for evaluating resistance of clinical herpes simplex virus isolates to nucleoside analogues. J Virol 2001; 75: 3105-3110.

72. Sasadeusz JJ, Tufaro F, Safrin S et al. Homopolymer mutational hot spots mediate herpes simplex virus resistance to acyclovir. J Virol 1997; 71: 3872-3878.

73. Talarico CL, Phelps WC, Biron KK. Analysis of the thymidine kinase genes from acyclovir-resistant mutants of varicella-zoster virus isolated from patients with AIDS. J Virol 1993; 67: 1024-1033.

74. Hwang CB, Chen HJ. An altered spectrum of herpes simplex virus mutations mediated by an antimutator DNA polymerase. Gene 1995; 152: 191-193.

75. Bodaghi B, Mougin C, Michelson S et al. Acyclovir-resistant bilateral keratitis associated with mutations in the HSV-1 thymidine kinase gene. Exp Eye Res 2000; 71: 353-359.

76. Kit S, Sheppard M, Ichimura H et al. Nucleotide sequence changes in thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 2 clones from an isolate of a patient treated with acyclovir. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 1483-1490.

77. Oram RJ, Marcellino D, Strauss D et al. Characterization of an acyclovir-resistant herpes simplex virus type 2 strain isolated from a premature neonate. J Infect Dis 2000; 181: 1458-1461.

78. Sawyer MH, Inchauspe G, Biron KK, Waters DJ, Straus SE, Ostrove JM. Molecular analysis of the pyrimidine deoxyribonucleoside kinase gene of wild-type and acyclovir-resistant strains of varicella-zoster virus. J Gen Virol 1988; 69: 2585-2593.

79. Snoeck R, Andrei G, De Clercq E et al. A new topical treatment for resistant herpes simplex infections. N Engl J Med 1993; 329: 968-969.

80. Tanaka S, Toh Y, Mori R. Molecular analysis of a neurovirulent herpes simplex virus type 2 strain with reduced thymidine kinase activity. Arch Virol 1993; 131: 61-73.

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

82. Rechtin TM, Black ME, Mao F, Lewis ML, Drake RR. Purification and photoaffinity labeling of herpes simplex virus type-1 thymidine kinase. J Biol Chem 1995; 270: 7055-7060.

83. Fillet AM, Dumont B, Caumes E et al. Acyclovir-resistant varicella-zoster virus: phenotypic and genetic characterization. J Med Virol 1998; 55: 250-254.

84. Saijo M, Suzutani T, Itoh K et al. Nucleotide sequence of thymidine kinase gene of sequential acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 isolates recovered from a child with Wiskott-Aldrich syndrome: evidence for reactivation of acyclovir-resistant herpes simplex virus. J Med Virol 1999; 58: 387-393.

85. Pramod NP, Thyagarajan SP, Mohan KV, Anandakannan K. Acyclovir resistance in herpes simplex virus isolates from keratitis cases: an analysis from a developing country. Microbiol Immunol 2000; 44: 241-247.

86. Palu G, Gerna G, Bevilacqua F, Marcello A. A point mutation in the thymidine kinase gene is responsible for acyclovir-resistance in herpes simplex virus type 2 sequential isolates. Virus Res 1992; 25: 133-144.

87. Safrin S, Crumpacker C, Chatis P et al. A controlled trial comparing foscarnet with vidarabine for acyclovir-resistant mucocutaneous herpes simplex in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 1991; 325: 551-555.

88. Sarisky RT, Quail MR, Clark PE et al. Characterization of herpes simplex viruses selected in culture for resistance to penciclovir or acyclovir. J Virol 2001; 75: 1761-1769.

89. Nugier F, Collins P, Larder BA, Langlois M, Aymard M, Darby G. Herpes simplex virus isolates from an immunocompromised patient who failed to respond to acyclovir treatement express thymidine kinase with altered substrate specificity. Antivir Chem Chemother 1991; 2: 295-302.

90. Chiou HC, Kumura D, Hu A, Kerns KM, Coen DM. Penciclovir-resistance mutations in the herpes simplex virus DNA polymerase gene. Antivir Chem Chemother 1995; 6: 281-288.

91. Dorsky DI, Plourde C. Resistance to antiviral inhibitors caused by the mutation S889A in the highly-conserved 885-GDTDS motif of the herpes simplex virus type 1 DNA polymerase. Virology 1993; 195: 831-835.

92. Hall JD, Wang YS, Pierpont J, Berlin MS, Rundlett SE, Woodward S. Aphidicolin resistance in herpes simplex virus type I reveals features of the DNA polymerase dNTP binding site. Nucleic Acids Res 1989; 17: 9231-9244.

93. Kamiyama T, Kurokawa M, Shiraki K. Characterization of the DNA polymerase gene of varicella-zoster viruses resistant to acyclovir. J Gen Virol 2001; 82: 2761-2765.

94. Kuhn FJ, Knopf CW. Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase. Mutational analysis of the 3'-5'-exonuclease domain. J Biol Chem 1996; 271: 29245-29254.

95. Marcy AI, Hwang CB, Ruffner KL, Coen DM. Engineered herpes simplex virus DNA polymerase point mutants: the most highly conserved region shared among alpha-like DNA polymerases is involved in substrate recognition. J Virol 1990; 64: 5883-5890.

96. Matthews JT, Carroll RD, Stevens JT, Haffey ML. In vitro mutagenesis of the herpes simplex virus type 1 DNA polymerase gene results in altered drug sensitivity of the enzyme. J Virol 1989; 63: 4913-4918.

97. Matthews JT, Terry BJ, Field AK. The structure and function of the HSV DNA replication proteins: defining novel antiviral targets. Antiviral Res 1993; 20: 89-114.

98. Pelosi E, Rozenberg F, Coen DM, Tyler KL. A herpes simplex virus DNA polymerase mutation that specifically attenuates neurovirulence in mice. Virology 1998; 252: 364-372.

99. Tsurumi T, Maeno K, Nishiyama Y. A single-base change within the DNA polymerase locus of herpes simplex virus type 2 can confer resistance to aphidicolin. J Virol 1987; 61: 388-394.

100. Visse B, Dumont B, Huraux JM, Fillet AM. Single amino acid change in DNA polymerase is associated with foscarnet resistance in a varicella-zoster virus strain recovered from a patient with AIDS. J Infect Dis 1998; 178 Suppl 1: S55-57.

101. Visse B, Huraux JM, Fillet AM. Point mutations in the varicella-zoster virus DNA polymerase gene confers resistance to foscarnet and slow growth phenotype. J Med Virol 1999; 59: 84-90.

102. Hwang YT, Smith JF, Gao L, Hwang CB. Mutations in the Exo III motif of the herpes simplex virus DNA polymerase gene can confer altered drug sensitivities. Virology 1998; 246: 298-305.

103. Knopf CW. The herpes simplex virus type 1 DNA polymerase gene: site of phosphonoacetic acid resistance mutation in strain Angelotti is highly conserved. J Gen Virol 1987; 68: 1429-1433.

104. Field HJ, Coen DM. Pathogenicity of herpes simplex virus mutants containing drug resistance mutations in the viral DNA polymerase gene. J Virol 1986; 60: 286-289.

105. Wong SW, Wahl AF, Yuan PM et al. Human DNA polymerase alpha gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases. EMBO J 1988; 7: 37-47.

106. Zhang J, Chung DW, Tan CK, Downey KM, Davie EW, So AG. Primary structure of the catalytic subunit of calf thymus DNA polymerase delta: sequence similarities with other DNA polymerases. Biochemistry 1991; 30: 11742-11750.

107. Simon M, Giot L, Faye G. The 3' to 5' exonuclease activity located in the DNA polymerase delta subunit of Saccharomyces cerevisiae is required for accurate replication. EMBO J 1991; 10: 2165-2170.

108. Blanco L, Bernad A, Blasco MA, Salas M. A general structure for DNA-dependent DNA polymerases. Gene 1991; 100: 27-38.

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

110. Cihlar T, Fuller MD, Cherrington JM. Characterization of drug resistance-associated mutations in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene by using recombinant mutant viruses generated from overlapping DNA fragments. J Virol 1998; 72: 5927-5936.

111. Earl PL, Jones EV, Moss B. Homology between DNA polymerases of poxviruses, herpesviruses, and adenoviruses: nucleotide sequence of the vaccinia virus DNA polymerase gene. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 3659-3663.

112. Gibbs JS, Chiou HC, Hall JD et al. Sequence and mapping analyses of the herpes simplex virus DNA polymerase gene predict a C-terminal substrate binding domain. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 7969-7973.

113. Knopf KW. Properties of herpes simplex virus DNA polymerase and characterization of its associated exonuclease activity. Eur J Biochem 1979; 98: 231-244.

114. Gibbs JS, Weisshart K, Digard P, deBruynKops A, Knipe DM, Coen DM. Polymerization activity of an alpha-like DNA polymerase requires a conserved 3'-5' exonuclease active site. Mol Cell Biol 1991; 11: 4786-4795.

115. Chou S, Marousek G, Guentzel S et al. Evolution of mutations conferring multidrug resistance during prophylaxis and therapy for cytomegalovirus disease. J Infect Dis 1997; 176: 786-789.

116. Mendez JC, Sia IG, Tau KR et al. Novel mutation in the CMV UL97 gene associated with resistance to ganciclovir therapy. Transplantation 1999; 67: 755-757.

117. Chou S, Meichsner CL. A nine-codon deletion mutation in the cytomegalovirus UL97 phosphotransferase gene confers resistance to ganciclovir. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 183-185.

118. Wolf DG, Yaniv I, Honigman A, Kassis I, Schonfeld T, Ashkenazi S. Early emergence of ganciclovir-resistant human cytomegalovirus strains in children with primary combined immunodeficiency. J Infect Dis 1998; 178: 535-538.

119. Hanson MN, Preheim LC, Chou S, Talarico CL, Biron KK, Erice A. Novel mutation in the UL97 gene of a clinical cytomegalovirus strain conferring resistance to ganciclovir. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1204-1205.

120. Wolf DG, Lee DJ, Spector SA. Detection of human cytomegalovirus mutations associated with ganciclovir resistance in cerebrospinal fluid of AIDS patients with central nervous system disease. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 2552-2554.

121. Baldanti F, Sarasini A, Silini E et al. Four dually resistant human cytomegalovirus strains from AIDS patients: single mutations in UL97 and UL54 open reading frames are responsible for ganciclovir- and foscarnet-specific resistance, respectively. Scand J Infect Dis Suppl 1995; 99: 103-104.

122. Spector SA, Hsia K, Wolf D, Shinkai M, Smith I. Molecular detection of human cytomegalovirus and determination of genotypic ganciclovir resistance in clinical specimens. Clin Infect Dis 1995; 21 Suppl 2: S170-173.

123. Wolf DG, Yaniv I, Ashkenazi S, Honigman A. Emergence of multiple human cytomegalovirus ganciclovir-resistant mutants with deletions and substitutions within the UL97 gene in a patient with severe combined immunodeficiency. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 593-595.

124. Jabs DA, Martin BK, Forman MS et al. Mutations conferring ganciclovir resistance in a cohort of patients with acquired immunodeficiency syndrome and cytomegalovirus retinitis. J Infect Dis 2001; 183: 333-337.

125. Baldanti F, Simoncini L, Sarasini A et al. Ganciclovir resistance as a result of oral ganciclovir in a heart transplant recipient with multiple human cytomegalovirus strains in blood. Transplantation 1998; 66: 324-329.

126. Baldanti F, Silini E, Sarasini A et al. A three-nucleotide deletion in the UL97 open reading frame is responsible for the ganciclovir resistance of a human cytomegalovirus clinical isolate. J Virol 1995; 69: 796-800.

127. Baldanti F, Underwood MR, Talarico CL et al. The Cys607-->Tyr change in the UL97 phosphotransferase confers ganciclovir resistance to two human cytomegalovirus strains recovered from two immunocompromised patients. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 444-446.

128. Erice A, Borrell N, Li W, Miller WJ, Balfour HH. Ganciclovir susceptibilities and analysis of UL97 region in cytomegalovirus (CMV) isolates from bone marrow recipients with CMV disease after antiviral prophylaxis. J Infect Dis 1998; 178: 531-534.

129. Erice A, Gil-Roda C, Perez JL et al. Antiviral susceptibilities and analysis of UL97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates from immunocompromised patients. J Infect Dis 1997; 175: 1087-1092.

130. Cihlar T, Fuller MD, Mulato AS, Cherrington JM. A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene selected in vitro by cidofovir confers a slow replication phenotype in cell culture. Virology 1998; 248: 382-393.

131. Baldanti F, Simoncini L, Talarico CL, Sarasini A, Biron KK, Gerna G. Emergence of a ganciclovir-resistant human cytomegalovirus strain with a new UL97 mutation in an AIDS patient. AIDS 1998; 12: 816-818.

132. Lurain NS, Spafford LE, Thompson KD. Mutation in the UL97 open reading frame of human cytomegalovirus strains resistant to ganciclovir. J Virol 1994; 68: 4427-4431.

133. Bowen EF, Cherrington JM, Lamy PD, Griffiths PD, Johnson MA, Emery VC. Quantitative changes in cytomegalovirus DNAemia and genetic analysis of the UL97 and UL54 genes in AIDS patients receiving cidofovir following ganciclovir therapy. J Med Virol 1999; 58: 402-407.

134. Cherrington JM, Fuller MD, Lamy PD et al. In vitro antiviral susceptibilities of isolates from cytomegalovirus retinitis patients receiving first- or second-line cidofovir therapy: relationship to clinical outcome. J Infect Dis 1998; 178: 1821-1825.

135. Smith IL, Cherrington JM, Jiles RE, Fuller MD, Freeman WR, Spector SA. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. J Infect Dis 1997; 176: 69-77.

136. Alain S, Mazeron MC, Pepin JM et al. Value of a new rapid non-radioactive sequencing method for analysis of the cytomegalovirus UL97 gene in ganciclovir-resistant strains. J Virol Methods 1995; 51: 241-251.

137. Faizi Khan R, Mori S, Eizuru Y, Kumura Ishii K, Minamishima Y. Genetic analysis of a ganciclovir-resistant human cytomegalovirus mutant. Antiviral Res 1998; 40: 95-103.

138. Bourgeois C, Sixt N, Bour JB, Pothier P. Value of a ligase chain reaction assay for detection of ganciclovir resistance-related mutation 594 in UL97 gene of human cytomegalovirus. J Virol Methods 1997; 67: 167-175.

139. Michel D, Hohn S, Haller T, Jun D, Mertens T. Aciclovir selects for ganciclovir-cross-resistance of human cytomegalovirus in vitro that is only in part explained by known mutations in the UL97 protein. J Med Virol 2001; 65: 70-76.

140. Chou S, Waldemer RH, Senters AE et al. Cytomegalovirus UL97 phosphotransferase mutations that affect susceptibility to ganciclovir. J Infect Dis 2002; 185: 162-169.

141. Eckle T, Prix L, Jahn G et al. Drug-resistant human cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation may have different clinical outcomes. Blood 2000; 96: 3286-3289.

142. Hwang YT, Liu BY, Coen DM, Hwang CB. Effects of mutations in the Exo III motif of the herpes simplex virus DNA polymerase gene on enzyme activities, viral replication, and replication fidelity. J Virol 1997; 71: 7791-7798.

143. Bestman-Smith J, Boivin G. Herpes simplex virus isolates with reduced adefovir susceptibility selected in vivo by foscarnet therapy. J Med Virol 2002; : In press.

144. Andrei G, Snoeck R, De Clercq E. Differential susceptibility of several drug-resistant strains of herpes simplex virus type 2 to various antiviral compounds. Antivir Chem Chemother 1997; 8: 457-461.

145. Sacks SL, Wanklin RJ, Reece DE, Hicks KA, Tyler KL, Coen DM. Progressive esophagitis from acyclovir-resistant herpes simplex. Clinical roles for DNA polymerase mutants and viral heterogeneity? Ann Intern Med 1989; 111: 893-899.

146. Erice A, Chou S, Biron KK, Stanat SC, Balfour HH, Jordan MC. Progressive disease due to ganciclovir-resistant cytomegalovirus in immunocompromised patients. N Engl J Med 1989; 320: 289-293.

147. Smith IL, Shinkai M, Freeman WR, Spector SA. Polyradiculopathy associated with ganciclovir-resistant cytomegalovirus in an AIDS patient: phenotypic and genotypic characterization of sequential virus isolates. J Infect Dis 1996; 173: 1481-1484.

148. Seo SK, Regan A, Cihlar T et al. Cytomegalovirus ventriculoencephalitis in a bone marrow transplant recipient receiving antiviral maintenance: clinical and molecular evidence of drug resistance. Clin Infect Dis 2001; 33: E105-108.

149. Chou S, Marousek G, Parenti DM et al. Mutation in region III of the DNA polymerase gene conferring foscarnet resistance in cytomegalovirus isolates from 3 subjects receiving prolonged antiviral therapy. J Infect Dis 1998; 178: 526-530.

150. Drew WL, Miner RC, Busch DF et al. Prevalence of resistance in patients receiving ganciclovir for serious cytomegalovirus infection. J Infect Dis 1991; 163: 716-719.

151. Drew WL, Stempien MJ, Andrews J et al. Cytomegalovirus (CMV) resistance in patients with CMV retinitis and AIDS treated with oral or intravenous ganciclovir. J Infect Dis 1999; 179: 1352-1355.

152. Jabs DA, Enger C, Dunn JP, Forman M. Cytomegalovirus retinitis and viral resistance: ganciclovir resistance. J Infect Dis 1998; 177: 770-773.

153. Sarasini A, Baldanti F, Furione M et al. Double resistance to ganciclovir and foscarnet of four human cytomegalovirus strains recovered from AIDS patients. J Med Virol 1995; 47: 237-244.

154. Jabs DA, Dunn JP, Enger C, Forman M, Bressler N, Charache P. Cytomegalovirus retinitis and viral resistance. Prevalence of resistance at diagnosis, 1994. Arch Ophthalmol 1996; 114: 809-814.

155. Kruger RM, Shannon WD, Arens MQ, Lynch JP, Storch GA, Trulock EP. The impact of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection after lung transplantation. Transplantation 1999; 68: 1272-1279.

156. Limaye AP, Corey L, Koelle DM, Davis CL, Boeckh M. Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants. Lancet 2000; 356: 645-649.

157. Limaye AP, Raghu G, Koelle DM, Ferrenberg J, Huang M-L, Boeckh M. High incidence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection among lung transplant recipients receiving preemptive therapy. J Infect Dis 2002; 185: 20-27.

158. Lurain NS, Ammons HC, Kapell KS, Yeldandi VV, Garrity ER, O'Keefe JP. Molecular analysis of human cytomegalovirus strains from two lung transplant recipients with the same donor. Transplantation 1996; 62: 497-502.

159. Rosen HR, Benner KG, Flora KD et al. Development of ganciclovir resistance during treatment of primary cytomegalovirus infection after liver transplantation. Transplantation 1997; 63: 476-478.

160. Reusser P, Cordonnier C, Einsele H et al. European survey of herpesvirus resistance to antiviral drugs in bone marrow transplant recipients. Bone Marrow Transplant 1996; 17: 813-817.

161. Drobyski WR, Knox KK, Carrigan DR, Ash RC. Foscarnet therapy of ganciclovir-resistant cytomegalovirus in marrow transplantation. Transplantation 1991; 52: 155-157.

162. Slavin MA, Bindra RR, Gleaves CA, Pettinger MB, Bowden RA. Ganciclovir sensitivity of cytomegalovirus at diagnosis and during treatment of cytomegalovirus pneumonia in marrow transplant recipients. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 1360-1363.

163. Nichols WG, Corey L, Gooley T et al. Rising pp65 antigenemia during preemptive anticytomegalovirus therapy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, correlation with DNA load, and outcomes. Blood 2001; 97: 867-874.

164. Gilbert C, Roy J, Belanger R et al. Lack of emergence of cytomegalovirus UL97 mutations conferring ganciclovir (GCV) resistance following preemptive GCV therapy in allogenic stem cell transplant recipients. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 3669-3671.

165. Talarico CL, Burnette TC, Miller WH et al. Acyclovir is phosphorylated by the human cytomegalovirus UL97 protein. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1941-1946.

166. Boivin G, Erice A, Crane DD, Dunn DL, Balfour HH. Ganciclovir susceptibilities of cytomegalovirus (CMV) isolates from solid organ transplant recipients with CMV viremia after antiviral prophylaxis. J Infect Dis 1993; 168: 332-335.

167. Drew WL, Anderson R, Lang W, Miner RC, Davis G, Lalezari J. Failure of high-dose oral acyclovir to suppress CMV viruria or induce ganciclovir-resistant CMV in HIV antibody positive patients. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 1995; 8: 289-291.

168. Rubin RH, Kemmerly SA, Conti D et al. Prevention of primary cytomegalovirus disease in organ transplant recipients with oral ganciclovir or oral acyclovir prophylaxis. Transpl Infect Dis 2000; 2: 112-117.

169. Flores-Aguilar M, Kuppermann BD, Quiceno JI et al. Pathophysiology and treatment of clinically resistant cytomegalovirus retinitis. Ophthalmology 1993; 100: 1022-1031.

170. Jabs DA, Enger C, Forman M, Dunn JP. Incidence of foscarnet resistance and cidofovir resistance in patients treated for cytomegalovirus retinitis. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2240-2244.

171. Baldanti F, Underwood MR, Stanat SC et al. Single amino acid changes in the DNA polymerase confer foscarnet resistance and slow-growth phenotype, while mutations in the UL97-encoded phosphotransferase confer ganciclovir resistance in three double-resistant human cytomegalovirus strains recovered from patients with AIDS. J Virol 1996; 70: 1390-1395.

172. Cherrington JM, Miner R, Hitchcock MJ, Lalezari JP, Drew WL. Susceptibility of human cytomegalovirus to cidofovir is unchanged after limited in vivo exposure to various regimens of drug. J Infect Dis 1996; 173: 987-992.

173. Biron KK, Fyfe JA, Stanat SC et al. A human cytomegalovirus mutant resistant to the nucleoside analog 9-([2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl)guanine (BW B759U) induces reduced levels of BW B759U triphosphate. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 8769-8773.

174. Stanat SC, Reardon JE, Erice A, Jordan MC, Drew WL, Biron KK. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus clinical isolates: mode of resistance to ganciclovir. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 2191-2197.

175. Littler E, Stuart AD, Chee MS. Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. Nature 1992; 358: 160-162.

176. Lurain NS, Thompson KD, Holmes EW, Read GS. Point mutations in the DNA polymerase gene of human cytomegalovirus that result in resistance to antiviral agents. J Virol 1992; 66: 7146-7152.

177. Sullivan V, Biron KK, Talarico C et al. A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene confers resistance to ganciclovir and phosphonylmethoxyalkyl derivatives. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 19-25.

178. Tatarowicz WA, Lurain NS, Thompson KD. A ganciclovir-resistant clinical isolate of human cytomegalovirus exhibiting cross-resistance to other DNA polymerase inhibitors. J Infect Dis 1992; 166: 904-907.

179. Kariya M, Mori S, Eizuru Y. Comparison of human cytomegalovirus DNA polymerase activity for ganciclovir-resistant and -sensitive clinical strains. Antiviral Res 2000; 45: 115-122.

180. Crumpacker CS. Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases. Am J Med 1992; 92: 3S-7S.

181. Prichard MN, Gao N, Jairath S et al. A recombinant human cytomegalovirus with a large deletion in UL97 has a severe replication deficiency. J Virol 1999; 73: 5663-5670.

182. Ijichi O, Michel D, Mertens T, Miyata K, Eizuru Y. GCV resistance due to the mutation A594P in the cytomegalovirus protein UL97 is partially reconstituted by a second mutation at D605E. Antiviral Res 2002; 53: 135-142.

183. Erice A. Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 286-297.

184. Prix L, Hamprecht K, Holzhuter B, Handgretinger R, Klingebiel T, Jahn G. Comprehensive restriction analysis of the UL97 region allows early detection of ganciclovir-resistant human cytomegalovirus in an immunocompromised child. J Infect Dis 1999; 180: 491-495.

185. Baldanti F, Michel D, Simoncini L et al. Mutations in the UL97 ORF of ganciclovir-resistant clinical cytomegalovirus isolates differentially affect GCV phosphorylation as determined in a recombinant vaccinia virus system. Antiviral Res 2002; 54: 59-67.

186. Boivin G, Gilbert C, Morissette M, Handfield J, Goyette N, Bergeron MG. A case of ganciclovir-resistant cytomegalovirus (CMV) retinitis in a patient with AIDS: longitudinal molecular analysis of the CMV viral load and viral mutations in blood compartments. AIDS 1997; 11: 867-873.

187. Emery VC, Griffiths PD. Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 8039-8044.

188. Emery VC, Cope AV, Bowen EF, Gor D, Griffiths PD. The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. J Exp Med 1999; 190: 177-182.

189. Chou S, Miner RC, Drew WL. A deletion mutation in region V of the cytomegalovirus DNA polymerase sequence confers multidrug resistance. J Infect Dis 2000; 182: 1765-1768.

190. Harada K, Eizuru Y, Isashiki Y, Ihara S, Minamishima Y. Genetic analysis of a clinical isolate of human cytomegalovirus exhibiting resistance against both ganciclovir and cidofovir. Arch Virol 1997; 142: 215-225.

191. Cunningham C, Davison AJ. A cosmid-based system for constructing mutants of herpes simplex virus type 1. Virology 1993; 197: 116-124.

192. Horsburgh BC, Hubinette MM, Qiang D, MacDonald ML, Tufaro F. Allele replacement: an application that permits rapid manipulation of herpes simplex virus type 1 genomes. Gene Therapy 1999; 6: 922-930.

193. Baldanti F, Sarasini A, Furione M et al. Coinfection of the immunocompromised but not the immunocompetent host by multiple human cytomegalovirus strains. Arch Virol 1998; 143: 1701-1709.

194. Gilbert C, LeBlanc M-H, Boivin G. Rapid Selection of a Cytomegalovirus UL97 Mutant in a Heart Transplant Recipient on Preemptive Ganciclovir Therapy. Herpes 2001; :

195. Duan J, Liuzzi M, Paris W et al. Antiviral activity of a selective ribonucleotide reductase inhibitor against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 in vivo. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 1629-1635.

196. Liuzzi M, Deziel R, Moss N et al. A potent peptidomimetic inhibitor of HSV ribonucleotide reductase with antiviral activity in vivo. Nature 1994; 372: 695-698.

197. McSharry JJ, McDonough A, Olson B et al. Susceptibilities of human cytomegalovirus clinical isolates to bay38-4766, bay43-9695, and ganciclovir. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2925-2927.

Table 1: HSV and VZV TK mutations associated with ACV resistance.

HSV or VZV	Amino acid changes	Lab-derived	Clinical strain	Marker transfer	TK phenotype	References
Amino acid substitutions						
ATP binding site						
VZV	G24E		X		TK-	58
VZV	K25R		X		TK alt	73
HSV-1	R51W	X	X		ND	29,74
HSV-2	D55N		X	X	ND	71
HSV-1	P57H		X		TK low/alt	38
HSV-2	G59P		X		ND	64
HSV-1	K62N		X		Tk low/alt	38
HSV-1	T63I		X		TK-	38
Nucleoside binding site						
VZV	D129N		X		TK-	73
VZV	R130Q		X		ND	78
VZV	C138R+S242F		X		TK-	73
VZV	R143G		X		TK alt	73
VZV	R143K		X		TK alt	73
VZV	R143G		X		TK-	57
HSV-1	A168T	X			TK alt	14
HSV-1	A175V		X		ND	29
HSV-1	R176Q	X	X		TK low/alt	14,38,81
HSV-2	R177W		X		TK alt	48
C-terminal active region						
HSV-1	C336Y	X	X		TK alt/low	14,38,74,82
HSV-2	C337Y		X		TK alt/low	38,72
VZV	L332P		X		ND	59
Other conserved regions						
HSV-1	R216C		X		TK low/alt	38
HSV-2	R217H +E39G		X		TK-	72
HSV-1	R222C		X		TK low/alt	38
HSV-1	R222H		X	X	ND	71
HSV-2	T287M		X		TK-	38
Non conserved regions						
HSV-2	E39G+Stop 263		X	X	ND	71
VZV	E48G		X		TK-	57
VZV	E59G		X	X	TK alt	80
HSV-1	E83K		X		ND	29
HSV-1	Q104H		X		TK-	38

HSV-1	Q104Stop	X		ND	29
HSV-2	Q105P	X		TK-	42
HSV-1	H105P	X		ND	29
HSV-2	T131P	X	X	TK low/alt	38,71
VZV	C138R+E308Q	X		TK-	58
HSV-1	G144N	X		ND	75
VZV	L154P	X		ND	78
VZV	V172C+S179I+Stop217	X		TK-	57
HSV-2	S182DR	X		TK ultra low	80
HSV-1	T201P	X		TK-	38
HSV-2	R223H	X		TK alt	76
VZV	W225Stop	X		ND	78
HSV-2	R271V	X		TK-	38
HSV-2	P272S	X		TK-	38
HSV-2	D273R	X		TK-	38
HSV-1	R281Stop	X		ND	38
HSV-1	L297S	X		TK-	38
VZV	Q303Stop	X		ND	59,83
Additions or Deletions					
VZV	873-nt del. (del. a.a.14-303)	X		ND	79
VZV	del. nt 47-50 (Stop a.a. 37)	X		TK-	73
VZV	del. A nt 72 (Stop a.a. 38)	X		TK-	58
VZV	add. A nt 72 (Stop a.a. 54)	X		TK-	58
VZV	del. A nt 72 (Stop a.a. 38)	X		TK-	73
HSV-2	del. G nt 180 (Stop a.a. 69)	X		ND	71
HSV-1	del. A nt 184 (Stop a.a. 85)	X		TK-	38
HSV-2	del. C nt 215 (Stop a.a. 86)	X		TK-	76
HSV-1	del. A nt 227 (Stop a.a. 85)	X		ND	85
HSV-1	add. G nt 430 (Stop a.a. 304)	X	X	TK low/alt	29,38
HSV-2	add. G nt 433 (Stop a.a 227)	X		TK-	38,64,72
HSV-2	add. 2 G nt 433 (Stop a.a 183)	X		TK-	38,72
HSV-1	del. C nt 460 (Stop a.a 182)	X		TK-	38
HSV-2	del. C nt 463 (Stop a.a 183)	X		ND	64
VZV	del. C nt 493 (Stop a.a 171)	X		TK-	58
VZV	add. C nt 493 (Stop a.a 194)	X		TK-	58
VZV	add. C nt 493 (Stop a.a. 206)	X		Tk low/alt	57
HSV-2	del. C nt 519 (Stop a.a 183)	X		TK-	86
VZV	del. nt 535-539 (Stop a.a 183)	X		ND	59
HSV-1	del. C nt 548 (Stop a.a 408)	X		TK low/alt	38
HSV-2	del./add. C nt 551 (Stop a.a 223)	X		TK-	72
HSV-2	del. C nt 551 (Stop a.a 263)	X		ND	64
HSV-1	del. C nt 666 (Stop a.a 408)	X		TK-	38
VZV	del. nt 677-678 (Stop a.a 231)	X		TK-	58

VZV	del. nt 681-682 (Stop a.a 231)	X		TK-	73
VZV	del. nt 682-683 (Stop a.a 231)	X		TK-	58
HSV-2	del. G nt 779 (Stop a.a 263)	X	X	ND	71
VZV	add. T+C nt 889 (Stop a.a 298)	X		TK-	58
VZV	add. G+3A nt 987 (Stop a.a 333)	X		TK alt	58
HSV-2	del. T nt 920 (Stop a.a 348)			ND	77
HSV-1	del. C nt 1061 (Stop a.a 408)	X		TK alt	84
HSV-1	del. A nt 1065 (Stop a.a 375)	X	X	ND	71
HSV-2	17-nt del. (Stop 37 or 39)	X		TK-	72

Note: Conserved regions as described by Darby et al.[14] and Balasubramaniam et al.[15]. TK-, TK deficient; TK+, TK competent; TK low, TK low producer; TK alt, TK altered substrate specificity; nt, nucleotide; a.a, amino acid; del., deletion; add., addition.

Table 2: HSV and VZV DNA polymerase mutations associated with specific drug resistance phenotypes.

HSV or VZV	Conserved region	Amino acid changes	Drug phenotype					Lab-derived	Clinical strain	Marker transfer	References	Comments
			ACV	PAA	FOS	CDV	ADV					
VZV	δ-C	E512K			R				X		100	
HSV-1	δ-C	Y557S		R						X	94	Impaired exonuclease activity
HSV-1	δ-C (Exo III)	V573M	S	S/HS	S/HS	R	S				10	Reduced neurovirulence
HSV-1	δ-C (Exo III)	Y577H	HS	R				X		X	102	Impaired exonuclease activity, reduced replication *in vitro*
HSV-1	δ-C (Exo III)	D581A	HS	R				X		X	102	Impaired exonuclease activity
HSV-1	δ-C	E597K/D	R	B				X		X	19,20	Possibility of additional mutations for E597K
HSV-1	δ-C	A605V	R	R				X		X	19	
HSV-1	II	Y696H	S	HS				X		X	92,97,99	Mutation D531N restores susceptibility to PAA
HSV-2	II	Y701H		HS				X		X	99	Position 696 in HSV-1
HSV-1	II	R700M	S	S/HS	S/HS	R	S	X			10	Reduced neurovirulence
HSV-1	II	R700G	R	R				X		X	19	
VZV	II	R665G			R			X			101	Position 700 in HSV-1. Reduced replication capacity *in vitro*
VZV	II	V666L			R			X			101	Reduced replication capacity *in vitro*
HSV-1	II	A719V	R	R				X		X	20,103	
HSV-2	II	A724T	S		R	S	R		X		64,71	Position 719 in HSV-1
HSV-1	II	S724N	S/R	R	R	S	R	X	X	X	10,19,20,64, 71	
HSV-1	II	S724N/D/Q/E/A/K/T/H	R	HS				X		X	97	
HSV-2	II	S729N	B		R	S	B		X		64,71	Position 724 in HSV-1
VZV	II	Q692R			R			X			101	Reduced replication capacity

												in vitro
HSV-2	VI	L783M	S		R	R	R		X		64,71	
HSV-2	VI	D785N	S		R	S	B		X		64,71	
HSV-1	VI-III	P797T	R	R				X		X	19	
HSV-1	III	V813M	R	R				X		X	19	
HSV-1	III	N815S/T	R	S/HS				X		X	20,96	
HSV-1	III	N815Q	R	S				X		X	97	
HSV-1	III	N815L/V/Y/E	S	HS				X		X	97	
VZV	III	N779S	R	S				X			93	Position 815 in HSV-1
HSV-1	III	Y818C		R				X		X	92	
HSV-1	III	G841S	R	B				X	X	X	20,60	
HSV-1	III	G841C	R		R			X		X	90	Resistance to PCV
VZV	III	G805C	R	R				X			93	Position 841 in HSV-1
HSV-1	III	R842S	R	R				X		X	19,98,104	Reduced neurovirulence
VZV	III	R806S			R			X			101	Reduced replication capacity *in vitro*. Position 842 in HSV-1
VZV	III	L809S			R			X			101	Reduced replication capacity *in vitro*. Position 850 in HSV-2
HSV-2	III	L850I	S		R	S	S		X		64,71	
HSV-1	I	S889A	R	R						X	91	
HSV-1	I	F891C	R	R						X	95	
HSV-1	I	F891Y	B	B						X	95	
HSV-1	I	V892M	B	B						X	95	
VZV	I	V855M	R	R				X			93	
HSV-2	I-VII	D912V/A	R	R		S	R		X		64,71	

HSV-1	I-VII	P920S	S		R	B	R		X		64,71	Presence of mutation S724N
HSV-1	VII	Y941H	R		R				X	X	63,98	Reduced replication in brain and reduced neurovirulence
HSV-1	V	N961K	R	B				X		X	19	Possibility of additional mutations. HS to PCV[90]
HSV-1	After V	L1007M	S	S	S	R	S	X			10	
HSV-1	After V	I1028T	S	S	S	R	S	X			10	Reduced neurovirulence

Note: Conserved regions are presented in Figure 3. ACV, acyclovir; PAA, phosphonoacetic acid; FOS, foscarnet; CDV, cidofovir; ADV, adefovir; δ-C, δ-region C; HS, hypersusceptible; S, susceptible; R, resistant; B, borderline level of resistance.

Table 3 : CMV UL97 mutations associated with ganciclovir resistance

Conserved Region	Amino acid changes	Lab-derived	Clinical strain	Marker transfer	References	Comments
Amino acid substitutions						
VI	M460L		X		118	
VI	M460V	X	X	X	37,130	
VI	M460I	X	X	X	18,34,120,121,132	
VII-IX	H520Q		X	X	34,119	
IX	A590T		X		118	Multiple UL97 mutations
IX	A591V		X	X	18,120,140	
IX	A591D		X		118	Multiple UL97 mutations
IX	C592G		X	X	34,136,140	
IX	C592F	X			139	
IX	A594T		X	X	129,140	
IX	A594V		X	X	37,121,136	Rarely found in susceptible isolates[18,128]
IX	A594G		X		138	
IX	A594P		X	X	182	Marker transfer achieved in a rVV heterologous system.
IX	L595S		X	X	18,37,121,122	
IX	L595F		X	X	18,37,122	
IX	L595W		X	X	34,140	
IX	L595T		X		135	
IX-XI	E596G		X	X	34,134,135,140	
IX-XI	E596D		X		118	Multiple UL97 mutations
IX-XI	N597I		X		118	Multiple UL97 mutations
IX-XI	G598S		X		185	Shown to decrease GCV phosphorylation in a rVV system.
IX-XI	G598V		X		118	Multiple UL97 mutations

IX-XI	K599T	X		X	137	
IX-XI	K599M	X	X		118,139	
IX-XI	C603W		X	X	115,134	Also found in a susceptible isolate[18]
IX-XI	C603Y		X		118	Multiple UL97 mutations
IX-XI	A606D		X		118	Multiple UL97 mutations
IX-XI	C607Y		X	X	121,125,127,131	
IX-XI	C607F		X	X	140	
XI	T659I		X	X	122	Found in a susceptible isolate[18]
XI	V665I		X		18	UL97 mutation L595S also present
Amino acid deletions						
IX	590-593	X		X	5	
IX + IX-XI	590-600		X		123	
IX + IX-XI	590-603		X		133	
IX	591-594		X	X	34,140	
IX	591-607			X	140	
IX	595		X	X	126	
IX + IX-XI	595-603		X	X	116,117	
IX-XI	600		X	X	140	
IX-XI	600-601		X		124	Another UL97 mutation also present

Note: Conserved regions as described by Hanks et al.[17] rVV, recombinant vaccina virus. A mutation P521L (next to H520Q) was identified in a CSF sample also containing potential UL54 drug-resistance mutations from a patient failing ganciclovir therapy but no isolate was recovered.[141]

Table 4 : CMV DNA polymerase (UL54) mutations associated with specific drug-resistance phenotypes.

Conserved region	Amino acid changes	Drug Phenotype				Lab-derived	Clinical strain	Marker transfer	References	Comments
		GCV	CDV	FOS	ADV					
Amino acid substitutions										
Exo I	C304S	R	R	R			X		134	Multiple (4) UL54 mutations
IV	M393R	R	R	R			X		134	Multiple (4) UL54 mutations
IV	M393K	R	R	R			X		134	Multiple (4) UL54 mutations
IV (Exo II)	N408D	R	R	S	HS		X	X	110,129,135	
IV (Exo II)	F412V	R	R	S	HS	X		X	110,176	
IV (Exo II)	F412C	R	R	S	HS		X	X	110,115,134,135	
IV (Exo II)	D413E	R	R	S			X		129	UL97 mutation
δ-C	L501I	R	R	S	HS	X	X	X	110,135,176	
δ-C	L501F	R	R	S			X		129,190	
δ-C	T503I	R	R	S			X		135	UL97 mutation
δ-C	K513R	R	R	S			X		135	UL97 mutation
δ-C	K513E	R	R	S	HS		X	X	110,135	
δ-C	K513N	R	R	S	HS	X		X	130	
δ-C	D515E	R	R	R			X		141	UL97+UL54 (L516M; I521T; L802M) mutations. Mutation D515G associated with baseline variation[33]
δ-C	L516M	R	R	R			X		141	UL97+UL54 (D515E; I521T; L802M) mutations

δ-C	I521T	R	R	R			X		141	UL97+UL54 (D515E; L516M; L802M) mutations
δ-C	P522A	R	R	S			X		129	UL97+UL54 (G841A) mutations
δ-C	P522S	R	R	S	HS		X	X	110,124	
δ-C (Exo III)	L545S	R	R	S	HS		X	X	110,134	
δ-C	D588E	S	S	R	R		X	X	110,135	
II	T700A	S	S	R	R		X	X	110,121,129,171	Found in a GCV/CDV-R ; FOS-S isolate[129]
II	V715M	S	S	R	R		X	X	110,121,171	
II	I722V	R	R	S			X		135	UL97 mutation
II-VI	Y751H	R	R	S			X		135	UL97+UL54 (L501I) mutations
VI	V781I	S	S	R	R		X	X	110,121,135	
VI-III	L802M	S/R	S	R	R		X	X	110,115,134,135,141	
III	K805Q	S	R	HS	HS		X	X	110,135	
III	A809V	R	S	R			X	X	149	
III	V812L	R	R	R	R	X	X	X	130,134	
III	T821I	R	S	R	R		X	X	110,135	
III	G841A	R	R	S			X		129	UL97+UL54 (P522A) mutations

III-I	S897P	R	R	R			X		135	UL97+UL54 (N408D) mutations. Mutation S897L associated with baseline variation[33]
V	A987G	R	R	S	S	X	X	X	110,124,177	
After V	R1052C	R	R	R			X		135	UL97+UL54 (V781I) mutations
Amino acid deletions										
V	981-982	R	R	R			X	X	189	

Note: Conserved regions are presented in Figure 5. GCV, ganciclovir; CDV, cidofovir; FOS, foscarnet; ADV, adefovir; R, resistant; S, susceptible; HS, hypersusceptible; δ-C, δ-region C. A mutation C830F in conserved region III in association with UL54 mutation P522S was identified in a clinical sample but no susceptibility results were reported.[133]

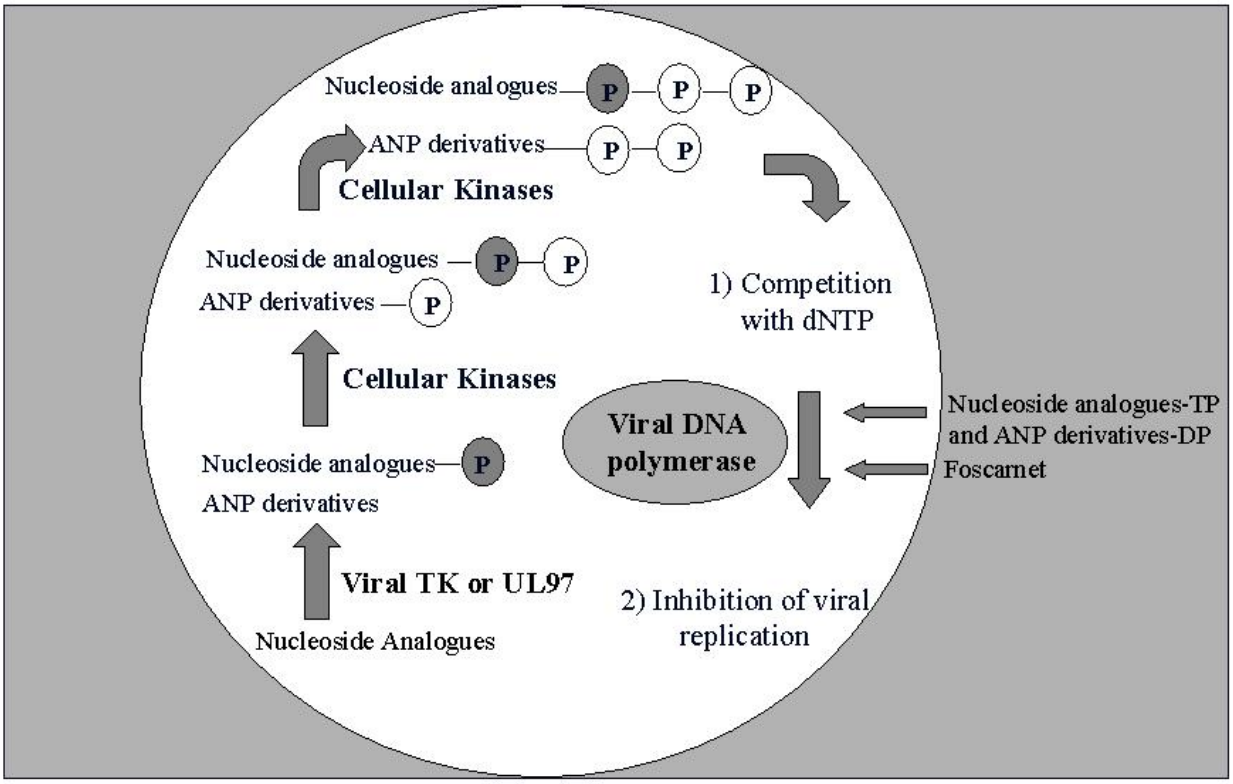

Figure 1: Mechanisms of action of currently available antiviral agents with activity against herpesviruses. TK, thymidine kinase; ANP, acyclic nucleoside phosphonate; P, phosphate; DP, diphosphate; TP, triphosphate; dNTP, deoxynucleotide-triphosphate.

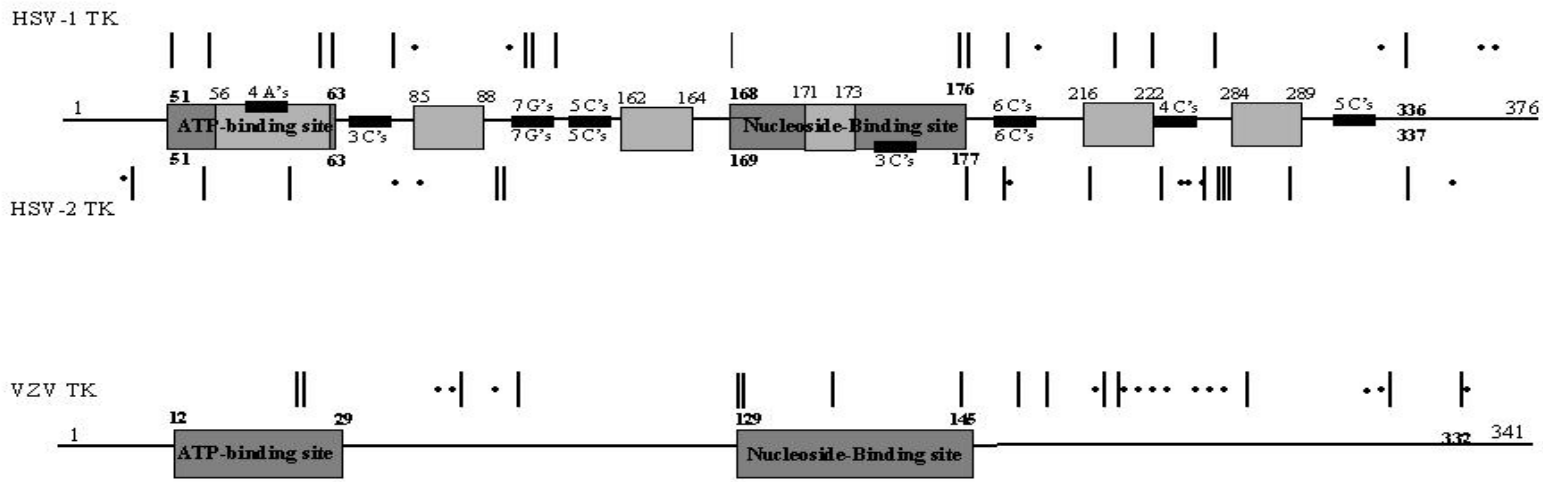

Figure 2: HSV and VZV thymidine kinase mutations conferring drug resistance. HSV and VZV TK active regions[14] and conserved regions[15] are reprented by shaded boxes. Numbers under/over the boxes indicate the position (codons no.) of these regions. Bars indicate amino acids substitutions while dots denote position of stop codons. Note that nucleotide deletions/additions are not indicated.

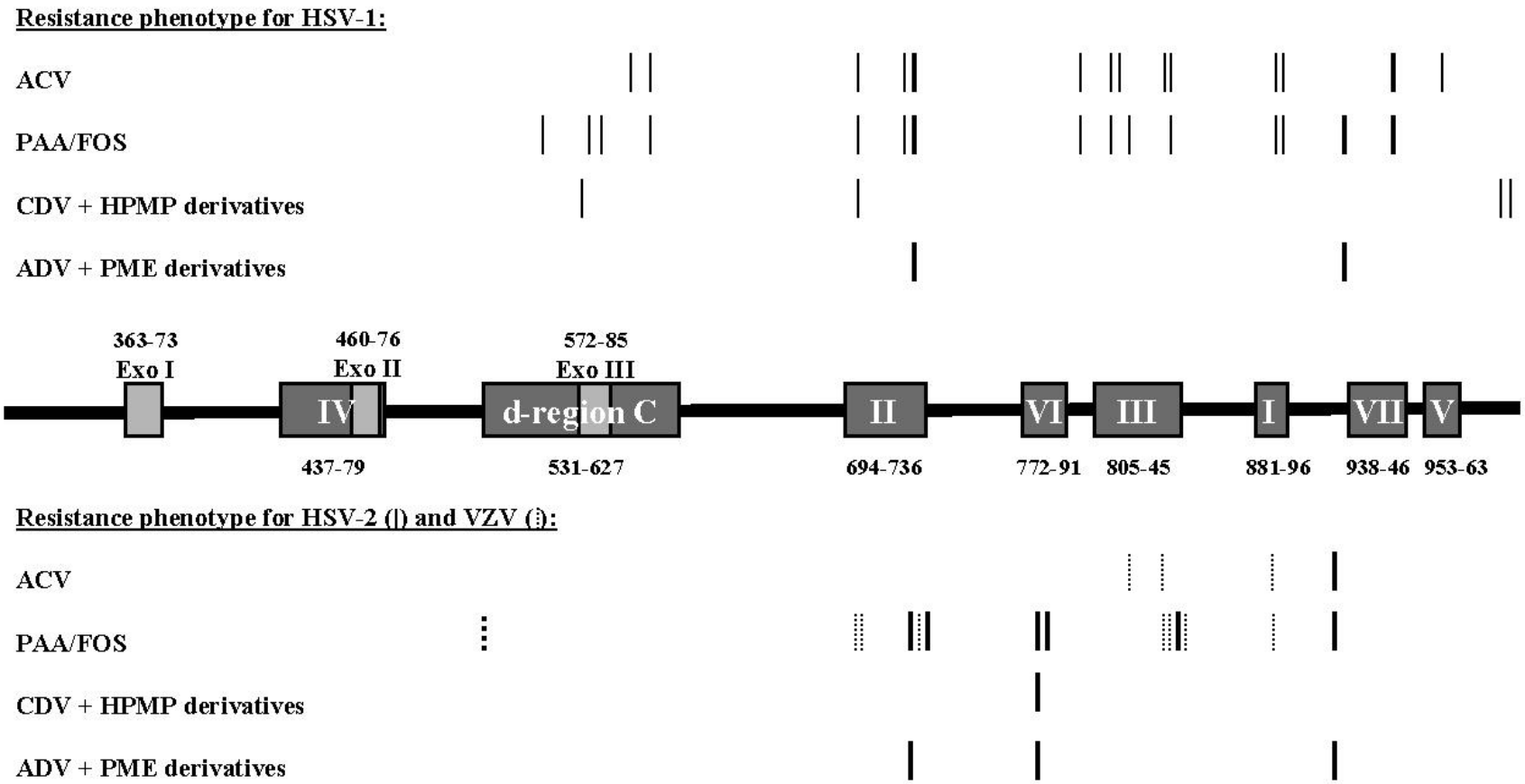

Figure 3: HSV and VZV DNA polymerase mutations conferring drug resistance. HSV DNA polymerase conserved regions are represented by shaded boxes. Numbers under/over the boxes indicate the position (codons no.) of these conserved regions for HSV-1.[63,105-109] Note that resistant strains containing reported mutations were not necessarily tested for all antivirals listed. Bars in bold indicate clinical isolates. ACV, acyclovir; PAA, phosphonoacetic acid; FOS, foscarnet; CDV, cidofovir; HPMP, [(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)]; ADV, adefovir; PME, [9-(2-phosphonylmethoxymethyl)].

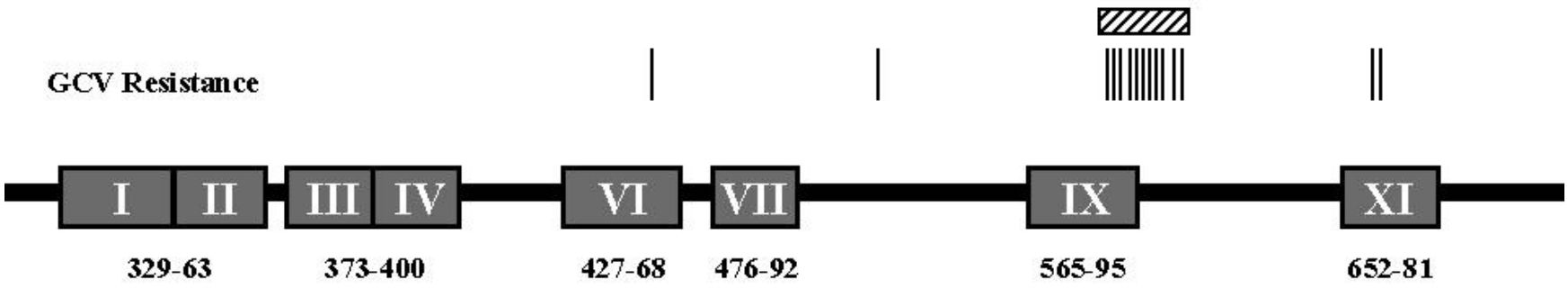

Figure 4: CMV UL97 mutations conferring drug resistance. CMV UL97 conserved regions are represented by shaded boxes. Numbers under the boxes indicate the position (codons no.) of these conserved regions.[17] Vertical bars indicate the presence of amino acids substitutions while the box indicates a region (codons 590 to 607) in which diverse codons deletions (from 1 to 17 codons) have been reported. Note that mutations at all codons represented, except del590-593 and del591-607 (see Table 3), have been identified in clinical isolates. GCV, ganciclovir.

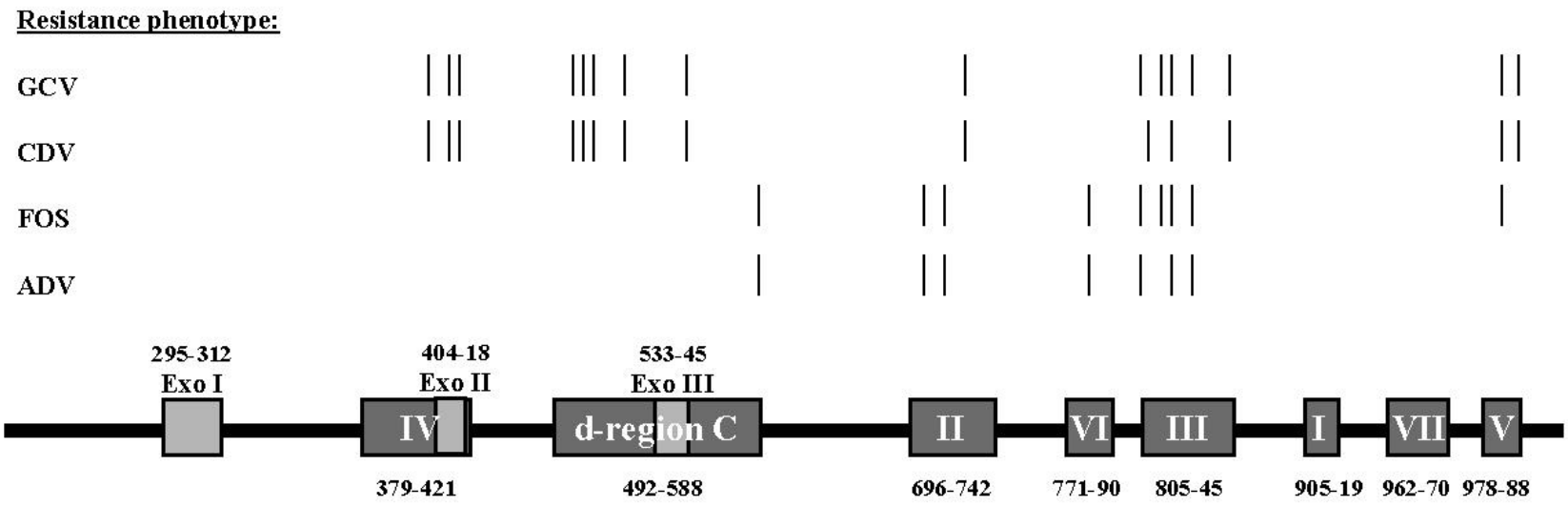

Figure 5: CMV DNA polymerase mutations conferring drug resistance. CMV DNA polymerase conserved regions are represented by shaded boxes. Numbers under/over the boxes indicate the position (codons no.) of these conserved regions.[63,105-109] Note that resistant strains containing reported mutations were not necessarily tested for all antivirals listed. All mutations, with the exception of mutations F412V and K513N, have been identified in clinical isolates. GCV, ganciclovir; CDV, cidofovir; FOS, foscarnet; ADV, adefovir.