



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE

Travail effectué dans le laboratoire de virologie de l'Institut des Agents Infectieux
Sous la direction de Mme FROBERT Emilie

Soutenu devant le jury interrégional le mardi 30 octobre 2018

Par M. LABRUNIE Thibault Franck

Né le 21 janvier 1986 à Lyon (8^{ème})

Conformément aux dispositions du décret n° 90-810 du 10 septembre 1990

Tient lieu de thèse

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

TITRE DU MEMOIRE

CARACTERISATION DES GENES *UL23*, *UL30* ET *UL5* DES VIRUS HERPES SIMPLEX TYPE 1
DETECTES CHEZ LES PATIENTS DES SERVICES D'ONCO-HEMATOLOGIE DES HOSPICES
CIVILS DE LYON

JURY

PRESIDENTE : Mme MORFIN SHERPA Florence, Professeur

MEMBRES : M. LINA Bruno, Professeur
Mme FROBERT Emilie, Maître de Conférences
Mme FOSSARD Gaëlle, Assistante Chef de Clinique

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président de l'Université
- Présidence du Conseil Académique
- Vice-Président du Conseil d'Administration
- Vice-Président de la Commission Recherche
- Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire

Frédéric FLEURY
Hamda BEN HADID
Didier REVEL
Fabrice VALLEE
Philippe CHEVALIER

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : Gilles RODE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directrice : Carole BURILLON
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Christine VINCIGUERRA
UFR d'Odontologie	Directrice : Dominique SEUX
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation (ISTR)	Directeur : Xavier PERROT
Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Directrice : Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. Fabien DE MARCHI
UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Polytech Lyon	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE
Observatoire des Sciences de l'Univers	Directrice : Mme Isabelle DANIEL

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHEMIE ET PHARMACIE GALENIQUE

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Madame Anne DENUZIERE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
Madame Christelle MACHON (MCU-PH)
Monsieur Waël ZEINYEH (MCU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDY-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Madame Giovanna LOLLO (MCU)
Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)
Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)

- **BIOPHYSIQUE**

Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU-PH-HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (Pr)
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAQUI MOUMJID (MCU - HDR)
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)
Madame Claire GAILLARD (MCU)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
Monsieur Thierry LOMBERGET (Pr)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**
Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)
Madame Catherine RIOUFOL (PU- PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)
Madame Florence RANCHON (MCU-PH)
Monsieur Teddy NOVAIS (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**
Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Madame Léa PAYEN (PU-PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH-HDR)

- **PHYSIOLOGIE**
Monsieur Christian BARRES (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)
- **PHARMACOLOGIE**
Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)
- **COMMUNICATION**
Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)
- **ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES**
Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)
Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Monsieur Sébastien VIEL (MCU-PH)
Madame Morgane GOSSEZ (AHU)
- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**
Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Madame Sarah HUET (AHU)
Monsieur Yohann JOURDY (AHU)
- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**
Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)
- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU-PAST)
Madame Valérie VOIRON (MCU-PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques (AHU)**

Monsieur Alexandre JANIN

- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Madame Camille ROZIER

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel



Serment des Pharmaciens Au moment d'être reçu Docteur en Pharmacie,

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances*
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement*
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité*
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession*
- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens*
- De coopérer avec les autres professionnels de santé*

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

REMERCIEMENTS

Aux membres du Jury

A Florence Morfin pour son aide dans la finalisation de l'article
A Emilie Frobert pour sa patience et son encadrement attentif
A Bruno Lina pour m'avoir accueilli au sein de son service de virologie
A Gaëlle pour son expertise clinique et réussir à supporter Pierre

A ma famille

A Maman pour son amour, sa douceur et son soutien indéfectible
A Papa pour avoir été mon modèle
A Diane pour avoir été aussi chiant qu'attachante
A Blandine pour me supporter depuis plus de 25 ans
A Grand-mère pour sa compagnie précieuse la semaine du concours
A Grand-père pour m'avoir transmis son sens de la pitrerie et de l'humour
A Papou pour m'avoir transmis son goût des bonnes choses de la vie
A Pierre Lou pour être une sacrée tête d'ampoule
A Laurence pour avoir fait du bois cadet une demeure magnifique

A mes proches et amis

A Stéphane Prozac pour être le frère « papillote » que je n'ai jamais eu
A Dido pour ta science et ton kyste
A Kapo pour ta fiabilité et ton sens du rythme inimitable
A Chamo pour ta sauce et ton optimisme
A Raziel de Bruxelles pour avoir bouffer d'innombrables rockets dans ta face
A Joe Bill pour ton savoureux crâne
A Rusty pour ton esprit vif et ton amitié sans faille
A Poulpillou pour Ibizernore, le camion de Marlboro et les kinito
A Jean Cook pour les shoots arc-en-ciel et les pièces dans l'oreille
A Casa del Casito pour ta folie
A Bambino pour avoir été le meilleur co-interne, les BKFC et la complicité
A Sarah et Corentin pour le mojo des gels d'électrophorèse
A Gleizou et LPi pour votre soutien et votre joie de vivre
A Laurine pour m'avoir donné du baume au cœur dans le sprint final
A Eric Prydz, Maceo Plex et Laurent Garnier pour les évasions sonores
A tous les saucés du 36 : MaxlaMenace, Kapotte, Pao, Hadro, André, Clap's
A toutes mes excellentes co-internes : Alexia, Amy, Jaegy, Pauline, Kali, Horti, Cam² ...
A tous mes excellents co-internes : Lulu, Gonsal, Rémi, Kev'le 5AHU, Pierro, Sushi ...

A Mamoune, à qui je dédie ce travail... Tu étais persuadée que je serais Président de la République... Mais docteur en biologie médicale c'est quand même pas mal nan ?

ABRÉVIATIONS

ACV: Aciclovir

AA: Acide Aminé

ADNpol: ADN polymérase

AMM: Autorisation de Mise sur le Marché

AMV: Aménamévir

ATU: Autorisation Temporaire d'Utilisation

CE50 : Concentration Efficace 50

CDV: Cidofovir

CHLS : Centre Hospitalier Lyon Sud

CHU: Centre Hospitalier Universitaire

CMV: Cytomégalovirus

EBV : Epstein Barr Virus

FOS: Foscarnet

CSH: Cellules Souches Hématopoïétique

GVH: Greffon Versus Hôte

HP: Hélicase Primase

HSCT: Hematopoietic Stem Cell Transplant

HSV: Herpes Simplex Virus

HSV1: Herpes Simplex Virus type 1

HSV2: Herpes Simplex Virus type 2

IHOP: Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique

NGS: Next Generation Sequencing

PCR: Polymerase Chain Reaction

PTV: Pritélivir

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

TK: Thymidine Kinase

UL: Unique Length

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

VZV: Virus Varicelle Zona

TABLE DES MATIÈRES

PROLOGUE.....	10
INTRODUCTION.....	11
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
1. <i>Epidémiologie des infections résistantes aux antiviraux</i>	13
2. <i>Clinique des infections résistantes aux antiviraux</i>	15
3. <i>L'aciclovir</i>	16
4. <i>Traitements de 2^{ème} intention : foscarnet et cidofovir</i>	18
5. <i>Les inhibiteurs de l'hélicase primase</i>	19
6. <i>Nouvelles approches thérapeutiques</i>	20
7. <i>Mécanismes de résistance aux antiviraux</i>	21
8. <i>Détection de la résistance aux antiviraux</i>	25
ARTICLE.....	28
TABLES ET FIGURES.....	42
DISCUSSION.....	45
CONCLUSION.....	51
ANNEXES.....	52
REFERENCES.....	55

PROLOGUE

Contrairement à ce que l'on peut penser, le choix d'un sujet pour la soutenance d'une thèse d'exercice ne nécessite pas toujours une mûre réflexion. Il s'est même avéré pour moi assez instinctif. En effet, après avoir passé deux ans d'internat aux Hospices Civils de Lyon et découvert le milieu de la biologie médicale hospitalière, la microbiologie s'est manifestée comme la spécialité la plus stimulante à mes yeux. A ma grande surprise je dois l'admettre car sur les bancs des amphithéâtres de la faculté de pharmacie de Toulouse cela n'a jamais été le cas.

Après six mois hautement enrichissant passés dans le service de bactériologie du Dr Sylvestre Tigaud, j'ai donc décidé d'aller m'expatrier quelques étages au-dessus pour faire éclore un projet de thèse d'exercice. Dans la maquette du DES de l'internat en biologie médicale le passage dans un service de virologie n'est que facultatif et le nombre de semestre est limité. Travailler dans le service de virologie de l'Institut des Agents Infectieux me permettait donc à la fois de satisfaire ma curiosité dans cette spécialité tout en restant dans le spectre de ma toute fraîche affection pour la microbiologie, et à la fois de profiter de ce temps pour m'astreindre à l'édification de ce travail très symbolique qu'est la thèse.

Affectionnant également l'immunologie, la virologie me semblait être la discipline microbiologique s'en rapprochant le plus. Me destinant à un exercice futur non exclusivement spécialisé et non hospitalier, j'ai voulu profiter du temps imparti par l'internat pour m'initier à la recherche médicale en sachant que l'occasion ne se représenterait très certainement plus. La chance d'avoir à disposition un laboratoire expert, maîtrisant la culture virale ne pouvait se laisser passer. Au choix aléatoire des virus cultivables, je suis tombé sur l'HSV1. Cette décision me permettant au final d'allier une formation en biologie moléculaire et la possibilité valorisante de rédiger ce travail sous forme d'un article scientifique actuellement en cours de soumission à la revue « Antiviral Research ».

INTRODUCTION

L'émergence de virus Herpes simplex de type 1 (HSV1) résistant aux antiviraux reste une problématique majeure pour les patients immunodéprimés, en particulier dans les services d'hématologie clinique. La prévalence peut atteindre notamment jusqu'à 30% chez les patients allogreffés de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

L'aciclovir (ACV) reste le traitement de première intention au regard de son efficacité et de sa bonne tolérance. Cette molécule nécessite une étape de phosphorylation par la thymidine kinase virale codée par le gène *UL23*, pour être actif puis va inhiber l'ADN polymérase virale codée par le gène *UL30*. Le foscarnet (FOS) et le cidofovir (CDV) peuvent être utilisés en seconde intention dans le traitement des infections à virus résistant à l'ACV.

Plus de 90% des cas de résistance à l'ACV impliquent le gène *UL23*. Dans le reste des cas, c'est le gène *UL30* qui est muté, induisant potentiellement une résistance croisée à l'ACV et au FOS voire même une multi-résistance au CDV. Une nouvelle classe thérapeutique, les inhibiteurs de l'hélicase primase (HP), qui est codée par le gène *UL5*, représente une alternative prometteuse dans le traitement des infections à herpès résistant.

Actuellement, la détection de la résistance aux antiviraux est réalisée au moyen de méthodes phénotypiques longues et coûteuses basées sur la culture virale. La détection génotypique de la résistance est encore pour l'instant réservée à un petit nombre de laboratoires experts. L'implémentation en routine dans les laboratoires de méthodes de détection génotypiques pourrait permettre de sauver un temps précieux et ainsi d'améliorer la prise en charge des patients, à l'instar de ce qui existe déjà pour d'autres virus comme le VHB ou le VIH. Le recueil de données concernant le polymorphisme génétique et les mutations induisant une résistance aux antiviraux semble ainsi un prérequis essentiel pour la mise en place de ces approches génotypiques.

Les connaissances sur le génome du virus HSV1 ont été améliorées ces dernières années. Mais des explorations sont encore nécessaires, notamment sur les gènes impliqués dans l'activité des molécules antivirales. A l'heure actuelle, environ 58%, 21% et 3% des acides aminés de l'*UL23*, l'*UL30* et l'*UL5* ont été caractérisés comme étant sujet à la substitution nucléotidique.

C'est dans ce contexte que nous avons voulu explorer les gènes *UL23*, *UL30* et *UL5* de 239 souches de virus HSV1 détectées de 2012 à 2016 au laboratoire de Virologie de l'Institut des Agents Infectieux. Ces virus HSV1 provenaient de patients hospitalisés dans l'un des trois centres d'oncohématologie de Lyon, à savoir les services du pavillon Marcel Bérard du CHLS, du centre Léon Bérard et de l'Institut d'Hématologie et d'Oncologie Pédiatrique. Les objectifs de ce travail étaient donc double, avec prioritairement améliorer les connaissances sur le polymorphisme naturel et les mutations en lien avec la résistance aux antiviraux ; et secondairement de réévaluer la fréquence de la résistance aux antiviraux au sein des services d'oncohématologie et chez les patients greffés de cellules souches hématopoïétiques tout particulièrement.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Epidémiologie des infections résistantes aux antiviraux

Le virus Herpes simplex (HSV) est un virus strictement humain qui existe sous deux types : l'HSV1 qui provoque préférentiellement des atteintes orofaciales, oculaires et cérébrales et l'HSV2 qui lui provoque majoritairement des atteintes génitales, anales et néonatales. Les infections qu'ils provoquent font partie des maladies humaines les plus répandues dans le monde. Il a été rapporté au niveau mondial en 2012, 3,7 milliards d'individus de moins de 50 ans (67%) infectés par le virus HSV1, et 417 millions de personnes âgées de 15 à 49 ans par le virus HSV2 (1,2). En France, une étude épidémiologique datant de 2002 rapporte une séroprévalence estimée à 67% pour l'HSV1 et 17,2% pour l'HSV2 (3).

Les infections résistantes aux antiviraux concernent majoritairement les patients immunodéprimés. Il existe dans tout isolat clinique une population minoritaire en proportion variable, de 0,01% à 0,15%, de virus naturellement résistants à l'ACV en lien avec la survenue de mutations aléatoires spontanées (4). Sous pression de sélection par un antiviral, ces souches minoritaires acquièrent un avantage sélectif et répliatif induisant un potentiel échec thérapeutique. Chez les individus immunocompétents, la probabilité de sélection de mutants résistants est moins grande car ces virions sont éliminés rapidement par le système immunitaire. En revanche, chez les patients immunodéprimés qui présentent un déficit de la réponse immunitaire cellulaire spécifique, la clairance virale est diminuée alors que la réplication du virus et la durée de son excrétion sont prolongées. La reconstitution immunitaire est nécessaire pour éradiquer une infection à HSV1 et le risque de réactivation virale est intrinsèquement lié au taux de lymphocytes T (5). Ainsi, une altération fonctionnelle et/ou un déficit quantitatif de ces effecteurs favorisent les infections par un virus résistant muté, même si son fitness est diminué.

La prévalence des virus résistants aux antiviraux diffère ainsi grandement selon le statut immunitaire des patients. La prévalence de la résistance à l'ACV est relativement basse et estimée entre 0,1% et 0,7% chez les sujet immunocompétent (6,7) sans qu'aucune élévation significative depuis les années 1980 ne puisse être observée (8). Il s'agit majoritairement de patients diagnostiqués avec des récurrences d'herpès génital ou des kératites, en effet une prévalence plus élevée de 6,4% a été rapportée chez des patients immunocompétents atteints de kératites (9,10). L'hypothèse dominante est que la localisation anatomique de la cornée et sa faible vascularisation ne permettent pas une réponse immunitaire adéquate pour inhiber convenablement la réplication virale.

Chez le sujet immunodéprimé la prévalence des infections à virus HSV résistant s'élève en moyenne entre 3.5% et 10% (7,11). Pour les patients VIH positifs cette prévalence s'échelonne entre 3,5% et 7% et est due principalement au virus HSV2 ; pour les patients transplantés d'organe solide, la fréquence de la résistance est décrite entre 2,5% et 10% (12). Mais c'est chez les patients greffées de CSH que ces infections à HSV résistantes à l'aciclovir sont plus fréquentes, avec une prévalence évaluée entre 4,1% et 10,9% (12–14). Quelle que soit le type de greffe, autologue ou allogénique, l'incidence d'une infection à HSV est rapportée à 9% (15). Alors que les cas de virus résistant restent anecdotiques en cas de greffe autologue, en cas de greffe allogénique la prévalence de la résistance s'élève jusqu'à 30-36% (8,15,16). Ceci est expliqué par le fait que les protocoles de radiothérapie et chimiothérapie pré-transplantation sont bien plus agressifs à l'encontre du système immunitaire du receveur en cas de greffe allogénique. De plus, il a été rapporté comme facteur de risque de développement d'une résistance à l'ACV une incompatibilité HLA entre le receveur et le greffon (16). La survenue d'une maladie du greffon contre l'hôte (GVH) a également été identifiée comme un facteur favorisant le phénomène de résistance (17–19). En revanche, il a été rapporté que chez les patients greffés de CSH, le statut sérologique du CMV du patient receveur impliquant une exposition prolongée au ganciclovir en prophylaxie, diminuerait la survenue d'HSV résistant à l'ACV (17).

Le phénomène de résistance aux antiviraux de l'HSV impacte majoritairement l'ACV. Néanmoins, des cas de résistance au FOS ont été observés après traitement prolongé chez des patients VIH et des patients greffés de CSH (13,20,21). On estime ainsi à 3% les cas de résistance au FOS chez les greffés de CSH (13). Une étude rapporte une fréquence bien supérieure : en effet, parmi 22 patients greffés de CSH excréant un virus HSV résistant à l'ACV et traités par FOS, 14 d'entre eux ont développé une résistance au FOS (12). La résistance au CDV existe, avec un certain nombre d'études réalisées *in vitro*, bien qu'un cas de résistance *in vivo* ait été rapporté en 2005 (22).

2. Clinique des infections résistantes aux antiviraux

Chez l'individu immunodéprimé, les conséquences d'une infection à HSV sont importantes et graves. En effet chez ces patients, les infections à HSV sont beaucoup plus sévères et prolongées et sont plus aisément disséminées. La virémie facilitée par la baisse de la réponse immunitaire cellulaire spécifique, permet dès lors au virus d'atteindre de nombreux organes pour y provoquer des atteintes multiples (23). La sévérité de ces atteintes est intrinsèquement liée à la profondeur du déficit immunitaire. Les manifestations cliniques peuvent être atypiques. Les immunodéprimés sont notamment plus à risque de développer une encéphalite aiguë (24). Les atteintes cutanées et orofaciales sont bien plus extensives, ulcératives et aisément nécrotiques, formant ainsi un socle propice aux surinfections bactériennes (25). La survenue de récurrence chez ces patients peut atteindre des localisations inhabituelles comme l'œsophage, la muqueuse intestinale et le tractus respiratoire (8,26,27). Des cas de pneumopathies et d'hépatites à HSV1 sont rapportés chez l'immunodéprimé (28–30). Ces infections sont fortement associées à un sur-risque de morbidité (31). Le taux de mortalité des patients greffés de CSH est plus important chez ceux excréant un virus HSV1 et même plus important chez ceux excréant une souche résistante (19). Une étude rapporte en effet 40% de risque de mortalité chez des patients hospitalisés en soins intensifs pour lesquels un virus HSV est isolé dans un lavage broncho-alvéolaire (32). La survie à 3 ans de patients greffés de CSH a été décrite passant de 66,6% à 46,4% si un virus HSV1 est détecté au niveau

oral (33). Malgré ces chiffres, la fréquence de décès en lien direct avec une infection généralisée et spécifique à HSV1 résistant reste anecdotique (34). La mortalité de ces patients est à mettre sur le compte de bactériémie ou de défaillance viscérale que l'infection à HSV résistant et sa prise en charge viennent aggraver. L'apparition d'un mutant résistant pourrait dès lors être considérée comme un marqueur de l'intensité du déficit immunitaire chez les patients greffés de CSH.

3. *L'aciclovir*

Toutes les molécules antivirales utilisées dans le traitement des infections herpétiques actuellement sur le marché ciblent l'ADN polymérase virale. L'aciclovir (ACV) découvert en 1974 et mis sur le marché en 1982 reste encore actuellement le traitement de première intention (35). L'ACV est un analogue nucléosidique de la guanosine qui existe sous forme de pro-médicament : le valaciclovir (VACV), ester de valine de l'ACV. La biodisponibilité orale de l'ACV étant faible, de 10 à 20%, le valaciclovir, permet d'obtenir une biodisponibilité proche de 55%. L'utilisation topique de l'ACV est indiquée dans les infections cutanéomuqueuses labiales et génitales ainsi que pour les kératites herpétiques. L'administration per os est adaptée pour le traitement des gingivostomatites herpétiques, des infections oculaires superficielles, la voie intraveineuse étant réservée au traitement des infections sévères comme l'herpès néonatal, l'encéphalite herpétique et les infections de l'immunodéprimé. Cet antiviral est notamment utilisé en traitement prophylactique des réactivations chez le patient immunodéprimé. En dehors de rares troubles neurologiques et d'atteintes rénales observées lors d'injection intraveineuse haute-dose, les effets indésirables restent anecdotiques et réversibles.

L'ACV doit être phosphorylé par la thymidine kinase (TK) virale de l'HSV, codée par le gène *UL23*, puis être phosphorylée deux fois par des kinases cellulaires pour être converti en forme triphosphate. Cette forme triphosphate va entrer en compétition avec les désoxynucléotides triphosphates endogènes pour s'incorporer dans la chaîne d'ADN viral en cours de réplication. L'incorporation de cet analogue dépourvu de OH en 3' agit comme terminateur de chaîne et interrompt donc la réplication du virus.

L'ACV est environ cent fois plus sélectif pour l'ADN polymérase de l'HSV que pour l'ADN polymérase alpha humaine (36).

L'administration prolongée ou discontinuée d'ACV en traitement curatif ou en prophylaxie est propice à l'apparition de résistance. Une prophylaxie à l'ACV sous-dosée par mauvaise absorption ou mauvaise compliance favorise l'émergence de sous-populations virales résistantes (12). En effet, des concentrations plasmatiques suboptimales vont diminuer l'excrétion virale sans complètement la supprimer et permettre ainsi une réplication du virus à bas bruit. La présence d'une population virale hétérogène, avec coexistence de souches sensibles et résistantes favorise dès lors la sélection rapide de mutants résistants. Le traitement prophylactique par ACV reste essentiel chez les patients greffés de CSH séropositifs à l'HSV en réduisant l'incidence de la réactivation d'environ 70% à 5-20% (26). Une étude sur les patients greffés de CSH a rapporté une apparition de mutants résistants en moyenne dans les 42 jours suivant l'instauration du traitement prophylactique par ACV (13). Elle a également décrit des cas précoces de résistance au FOS déclarés après seulement 5 jours de prophylaxie (13). La prophylaxie par ACV aux doses recommandées (400mg par jour) ne semblant pas prévenir la totalité des réactivations chez les patients greffés de CSH, la prophylaxie avec des hautes doses (au moins 1.5 g par jour) d'ACV est recommandée dans la plupart des nouveaux protocoles pré-transplantation visant à prévenir la résistance virale post-greffe chez tous les patients séropositifs à l'HSV1. De plus, une étude rétrospective américaine a montré que plus le traitement prophylactique par ACV est long après la transplantation, plus les épisodes herpétiques sont courts et plus le taux d'apparition de mutants résistants est bas (37). Enfin, l'efficacité prophylactique de l'aciclovir et de son pro-médicament le valaciclovir sur l'inhibition des réactivations virales est comparable chez les sujets greffés de CSH (38). Toutefois leurs potentiels de sélection d'organismes résistants n'ont pas été spécifiquement comparés chez le patient greffés de CSH.

4. Traitements de 2^{ème} intention : foscarnet et cidofovir

Dans le cas d'infection à virus herpes résistant à l'ACV, le traitement de seconde intention repose alors sur l'utilisation du foscarnet (FOS) ou du cidofovir (CDV). Ces deux molécules sont utilisées exclusivement par voie intraveineuse. Bien qu'il existe des formulations topiques ayant prouvé leur efficacité, elles sont pour l'heure réservées aux modèles expérimentaux (39,40). Le FOS est utilisable dans le cadre de son AMM pour le traitement d'attaque des infections à HSV résistants ou insensibles à l'ACV chez les patients immunodéprimés. Le FOS ne nécessite pas d'étape d'activation par la TK pour exercer son activité antivirale. Il s'agit d'un analogue structural de l'anion pyrophosphate qui va inhiber le site de liaison au pyrophosphate de l'ADN polymérase virale. Ainsi, il empêche toute incorporation d'un éventuel désoxynucléotide triphosphate endogène dans l'ADN viral. Depuis 2014 et le retrait de son AMM, le cidofovir (CDV) n'est utilisable que pour son indication qu'en ATU. En effet, le laboratoire le commercialisant et l'agence européenne du médicament ont observés une augmentation du nombre d'effets indésirables liée à son utilisation hors AMM. Les effets indésirables les plus fréquents et les plus graves rapportés lors de cette utilisation hors AMM ont été une toxicité rénale, oculaire et la survenue de neutropénies. Des difficultés industrielles, la baisse de l'incidence de la pathologie pour lequel il était indiqué (rétinite à CMV chez le patient VIH) et l'existence d'alternatives thérapeutiques ont également motivés ce choix. Il a cependant prouvé son efficacité dans le traitement des infections à HSV résistants aux analogues nucléosidiques et/ou au FOS (41,42). Le CDV est un analogue nucléosidique acyclique et phosphonaté de la cytosine qui nécessite deux phosphorylations successives par des kinases cellulaires pour être actif. Ainsi, dans sa forme bi-phosphorylée, le CDV inhibe l'ADN polymérase virale en agissant comme un terminateur de chaîne.

Ces deux traitements de seconde intention, ne présentent pas l'index thérapeutique favorable et la facilité d'utilisation de l'ACV. Ils ont une affinité pour l'ADN polymérase virale bien inférieure à celle de l'ACV (20 fois inférieure pour le FOS et 300 fois inférieure pour le CDV) et nécessitent donc des doses plus importantes pour inhiber la réplication virale (36). En plus de la restriction à la voie intraveineuse, ces deux molécules présentent une néphrotoxicité certaine. Il est notamment observé

chez les patients traités par FOS une élévation de plus de 50% de la créatininémie, voire même la survenue d'insuffisance rénale aiguë par nécrose tubulaire pouvant être irréversible et conduire ces patients jusqu'à l'hémodialyse (43,44). L'utilisation en thérapeutique humaine de ces deux alternatives à l'ACV est par conséquent difficile. En cas de mauvaise tolérance du CDV lors du traitement d'une infection à HSV présentant une résistance croisée ACV/FOS, les options thérapeutiques seraient épuisées (45). Également disponible en ATU, le brincidofovir, ester lipidique du CDV, est le pro-médicament du CDV. Il exerce donc son activité antivirale par le même mécanisme d'action que le CDV mais permet de s'affranchir de la voie générale obligatoire du CDV. Grâce à cette forme lipidique, les taux intracellulaires du brincidofovir sont 100 fois supérieurs à ceux du CDV et son activité antivirale est supérieure à celle de l'ACV et du FOS (46–48). En outre, dans les modèles animaux, une inhibition synergique de la réplication de l'HSV se produit lorsque le brincidofovir et l'ACV sont associés (49).

5. Les inhibiteurs de l'hélicase primase

Le complexe hélicase primase (HP) présente un rôle essentiel dans la réplication de l'ADN viral. Les hélicases jouent un rôle central non seulement dans la mise en place de la boucle de réplication, mais aussi dans la régulation de la dynamique de réplication et de la coordination du processus de réplication. Les primases constituent une classe majeure de partenaires d'interaction avec l'hélicase. Elles synthétisent les amorces complémentaires des brins d'ADN en cours d'élongation permettant ainsi une action optimale de l'ADN polymérase (50). Ce complexe apparaît donc comme une potentielle cible thérapeutique avec l'utilisation d'inhibiteurs ciblant son action.

Encore au stade de développement, les inhibiteurs de l'HP que sont l'aménamévir (AMV) et le pritélivir (PTV) s'avèrent être de nouvelles molécules très prometteuses (51). Actuellement, le PTV est au stade des essais cliniques de phase II quant à l'AMV, il a été autorisé sur le marché pour le traitement du zona en 2017 au Japon. Une utilisation clinique à large échelle est encore attendue. En effet, elles ont démontrées lors d'étude clinique une très bonne efficacité dans le traitement des

lésions herpétiques. Il a été observé une activité *in vitro* supérieure du PTV à celle de l'ACV (52). L'AMV présente une CE50 moyenne de 0,036µM pour l'HSV1 et une puissance 14 fois supérieure à celle du VACV (53). Leur principal atout dans est de rester actif sur les virus HSV résistants à l'ACV (54). De plus, elles possèdent une biodisponibilité de l'ordre de 40% pour l'AMV et de plus de 60% pour le PTV permettant leurs administrations par voie orale (55,56). D'autres avantages certains concernant ces molécules : il a été rapporté une activité synergique avec l'ACV, ainsi qu'une excellente diffusion au travers de la barrière hémato-encéphalique (54,57). Ces caractéristiques sont encourageantes pour le traitement des encéphalites herpétiques, notamment à HSV résistant.

6. Nouvelles approches thérapeutiques

De nombreuses nouvelles cibles thérapeutiques sont actuellement à l'étude et seront brièvement abordées ici, elles pourraient déboucher sur de nouveaux médicaments pour traiter les infections à HSV. Tout d'abord l'enveloppe virale, qui est dégradée par un peptide d'origine amphibienne, la *Temporin B* et qui a démontré récemment une activité antivirale à l'encontre de l'HSV1 (58). La kinase TBK1 impliquée dans la réponse immunitaire innée en amplifiant notamment la synthèse d'interféron-gamma, son inhibition a montré un effet suppressif sur l'HSV1 (59). Cette inhibition s'étant notamment avérée efficace à l'encontre des souches résistantes à l'ACV (59). D'autres kinases impliquées dans l'homéostasie cellulaire de la famille DYRKs (Dual specificity tyrosine regulated kinases) ont été ciblées et une action suppressive sur les souches HSV1 résistantes à l'ACV a été rapportée (60). L'inhibition des protéases s'est avérée extrêmement efficace contre le VIH, il est intéressant de noter que le nelfinavir a récemment été signalé comme ayant une activité contre l'HSV (61). Des efforts supplémentaires sont encore nécessaires pour améliorer son activité, mais l'inhibition des protéases reste une approche encourageante. Cette liste de cible potentielle n'est certainement pas exhaustive, et les meilleures cibles dans le traitement des infections à HSV ne sont peut-être pas encore découvertes. Il est possible d'envisager l'utilisation un jour d'une thérapie combinée, à l'instar des

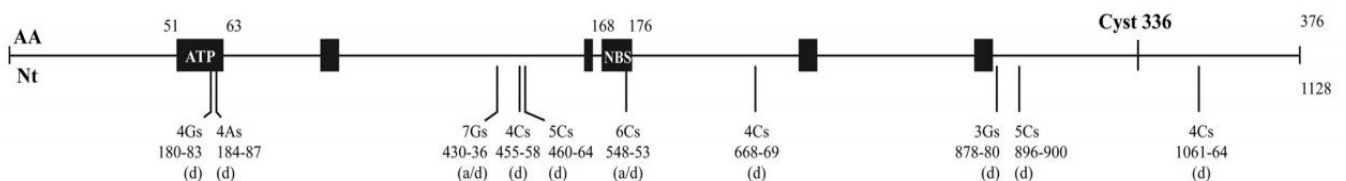
thérapeutiques existantes pour le traitement du VIH, et qui minimiserait le développement de résistance virale.

7. Mécanismes de résistance aux antiviraux

7.1 Le gène de la thymidine kinase (UL23)

La résistance à l'ACV est médiée dans 95% des cas par la survenue d'une mutation dans le gène de la TK virale (gène *UL23*) et dans les cas restants, par une mutation dans l'ADN polymérase virale (gène *UL30*) (62,63). La thymidine kinase virale est une enzyme qui catalyse la phosphorylation de la thymidine en thymidine monophosphatée. Cette enzyme est constitutive de la majorité des *Herpesviridae* (HSV, VZV, CMV, EBV) (64). La TK de l'HSV phosphoryle la thymidine et la désoxyuridine comme son homologue humaine et peut en plus phosphoryler la désoxycytidine. Au contraire de son équivalent humain, la TK virale peut donc phosphoryler les bases puriques et pyrimidiques et exprime donc une plus faible restriction stéréochimique et une plus grande permissivité (65). Elle peut ainsi assurer des réactions de phosphorylation sur des substrats comportant une structure partielle de nucléoside comme l'ACV. La TK joue un rôle primordial pour l'action thérapeutique de l'ACV mais n'est pas essentielle pour la survie et la réplication virale. La TK est une protéine de 376 acides aminés (AA), pour laquelle de nombreuses positions de mutations ont déjà été décrites (66). Le gène *UL23* présente un polymorphisme naturel varié et fréquent, avec en moyenne 1,2 mutations toutes les 100 paires de bases (67).

Figure 1. Représentation schématique du gène *UL23* (selon Boivin et al. 2011)



HSV-1 : Herpes simplex virus type 1 ; AA : Acide aminés

Les mutations du gène *UL23* conduisant à la résistance à l'ACV apparaissent selon deux mécanismes observés en proportion équivalente (15). Le premier mécanisme consiste en l'addition ou la délétion d'un nucléotide dans l'une des dix zones riches en homopolymères G et C qui constituent les points chauds de la résistance. Il est à noter que le génome entier de l'HSV1 présente un taux de GC important, de 68% (68). Ce mécanisme conduit à l'apparition précoce d'un codon stop ou à la synthèse d'une enzyme tronquée non fonctionnelle (69,70). Le second mécanisme correspond à la survenue d'une substitution nucléotidique isolée survenant majoritairement dans les zones hautement conservées du gène *UL23* (63). Il existe six régions hautement conservées dans ce gène : le site 1 correspondant au site de liaison à l'ATP (AA 56 à 62), le site 2 (AA 83 à 88), le site 3 (AA 162 à 164), le site 4 correspondant au site de liaison aux nucléosides (AA 171 à 173), le site 5 (AA 216 à 222) et le site 6 (AA 284 à 289) (Figure 1). Le codon 336 est essentiel pour le repliement tridimensionnel de la protéine et son activité, il s'agit donc d'une zone cruciale pour laquelle l'apparition d'une mutation C336Y induit une baisse significative de sensibilité à l'ACV (69).

En fonction de la survenue de ces mutations, 3 phénotypes de la TK sont décrits (71). Ces phénotypes tiennent compte de l'activité de phosphorylation de la TK pour son substrat naturel, la thymidine et pour l'ACV. Cette classification peut être obtenue en comparant, les taux d'incorporation dans les cellules infectées, de thymidine et d'un analogue nucléotidique radio-marqué, ou bien en utilisant des alternatives froides, comme le dosage par HPLC des formes mono-phosphatées de thymidine et (72–74). Ainsi, les mutants TK déficients ne vont générer aucune activité de la TK ; les mutants TK altérée présentent une activité de phosphorylation réduite pour la thymidine entre 15% et 100% et ne phosphoryle pas l'ACV. Enfin, les mutants TK faible producteur ont quant à eux une activité réduite à moins de 15% pour la thymidine et ne génèrent plus aucune phosphorylation de l'ACV. Ces phénotypes résistants présentent donc des conséquences différentes en termes de réactivation. En effet, dans les modèles murins, les mutants TK déficients montrent une baisse de leur pathogénicité et sont incapables de se réactiver à partir leur forme de latence ganglionnaire (75). Néanmoins, la coexistence simultanée de souches phylogénétiquement proches l'une sensible à l'ACV et l'autre résistante peut

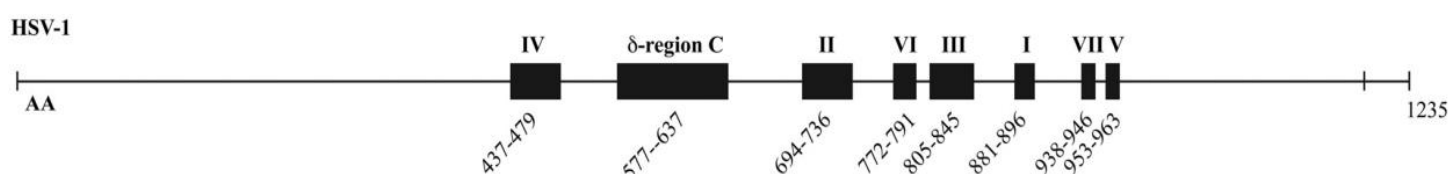
permettre la réactivation de la souche TK déficiente résistante à l'ACV (76). Les mutants TK altérée, tous comme les mutants TK faible producteur, ont une virulence diminuée mais peuvent toutefois être capables de réactivation car il a été prouvé que même des quantités infimes d'activité TK étaient suffisantes pour permettre une réactivation virale (77).

Le FOS et le CDV ne nécessitant pas de phosphorylation par la TK virale pour être actifs, ils inhibent la réplication des souches d'HSV1 avec TK mutée.

7.2 Le gène de l'ADN polymérase (UL30)

Le gène *UL30*, quand il est soumis à des mutations, peut induire une résistance à l'ACV seul, une résistance croisée ACV/FOS ou une multi-résistance ACV/FOS/CDV. L'ADNpol est une enzyme multifonctionnelle de 1235 acides aminés qui possède une activité polymérase pour l'extension des chaînes d'ADN, une activité 3'-5' exonucléase « proof-reading » ainsi qu'une activité RNase H, nécessaire à la dégradation des amorces de la boucle de réplication. Il s'agit de la cible terminale de toutes les molécules antivirales actuellement sur le marché. De par sa nature primordiale dans la survie virale, le gène *UL30* est hautement conservé (78). Les mutations survenant dans l'*UL30* affaiblissent généralement le fitness viral et il est donc moins fréquent d'observer des mutations de résistance par rapport à l'*UL23* (63,79). Les mutants avec une activité de l'ADN polymérase altérée sont peu étudiés mais semblent présenter une atténuation importante de leur neurovirulence dans les modèles murins (80,81).

Figure 2. Représentation schématique du gène *UL30* (selon Boivin et al. 2011)



HSV-1 : Herpes simplex virus type 1 ; AA : Acide aminés

Les substitutions à l'origine d'une résistance aux antiviraux surviennent principalement dans les régions II, III, VI et VII, ainsi que dans une région non conservée singulière située entre les régions I et VII (Figure 2) (63,66). Elles sont directement ou indirectement impliquées dans la reconnaissance et la liaison des nucléotides et des pyrophosphates, ou encore à l'activité catalytique de l'enzyme. La présence de substitutions non synonymes dans les autres régions conservées ou dans les zones non conservées est bien plus rare (82,83). A noter que lorsque le domaine Exo III, siège de l'activité 3'-5' exonucléase, est touché par des mutations comme E597K ou A605V, l'activité « proof-reading » de l'enzyme est altérée. Il en résulte une fréquence d'apparition de mutations trois fois plus importante dans ces souches et donc à un risque accru de mutation de résistance (84).

40% des mutations conduisant à la résistance à l'ACV seul sont localisées dans les régions II et III, spécialement entre les codons 529 et 657 (15). Des cas de résistance croisée ACV/FOS ont également été décrits et les mutations impliquées sont situées préférentiellement dans les régions conservées II et VI (82,85,86). Des mutations ponctuelles de résistance isolée au FOS ont été décrites dans les régions conservées II et III (83). Les mutations induisant une résistance isolée au CDV sont préférentiellement localisée en partie C-terminal non conservée de l'enzyme (I1028T) ou dans la région V (K960R) (87). Par ailleurs, les mutations S724N de la région II et L778M de la région VI du gène *UL30* de l'HSV1 sont responsables d'une résistance étendue touchant l'ACV, le FOS et le CDV (82,87).

7.3 Le gène de l'hélicase-primase (*UL5*)

A l'heure actuelle, aucune émergence de variants résistants aux inhibiteurs de l'HP n'a été détectée dans les souches cliniques évaluées dans les essais cliniques de ces molécules (55,59). Toutefois ces patients étaient immunocompétents et donc moins à sujet à l'apparition d'un virus résistant. Des populations virales variantes minoritaires hautement résistantes aux inhibiteurs de l'HP ont toutefois déjà été détectées, à la fois après sélection *in vitro* par ces inhibiteurs, mais également préexistantes au sein d'isolats cliniques (55,60). La barrière génétique de ces molécules pourrait ainsi ne pas être élevée. A l'heure actuelle, toutes les mutations conduisant à

la résistance à ces inhibiteurs sont rapportés comme étant localisées dans la région IV du gène *UL5*, entre les codons 341 et 356 (88,89).

8. Détection de la résistance aux antiviraux

Le diagnostic de la résistance aux antiviraux par le laboratoire de virologie permet de guider le clinicien quant aux options thérapeutiques disponibles. Ce diagnostic se fait soit par méthode phénotypique en soumettant le virus à différentes concentrations d'antiviraux (antivirogramme) soit par méthode génotypique, en identifiant les mutations conférant une résistance aux antiviraux.

8.1 Détection phénotypique

La méthode phénotypique requiert l'isolement préalable du virus par culture sur cellule Vero ou MRC5. Des concentrations croissantes de la suspension virale sont mises en présence de concentrations croissantes d'antiviral. La technique d'antivirogramme en échiquier teste 5 doses de virus et 5 concentrations d'antiviral. L'objectif est de déterminer la concentration efficace 50 (CE50) qui correspond à la concentration d'antiviral qui inhibe 50% de la réplication virale. Cette CE50 est ensuite comparée au cut-off choisi par le laboratoire. Plusieurs techniques de révélation de la réplication peuvent être utilisées : la réduction des plages de lyses, considérée comme le « gold standard », la coloration au rouge neutre, la détection de l'expression d'un antigène viral détecté par une technique ELISA ou par cytométrie de flux (90–93). Plus récemment, la quantification de l'ADN viral dans le surnageant cellulaire ou le lysat cellulaire par hybridation d'ADN ou PCR en temps réel a été également développée (94–96). Enfin, des techniques basées sur l'analyse en temps réel des cultures cellulaires par mesure de l'impédances sont à l'essai (97).

Ces techniques ne sont pas standardisées au niveau national et international. Les valeurs des concentrations critiques établies nécessitent encore une harmonisation internationale mais il est reconnu que des valeurs de CE50 supérieures à 9µM et 330µM correspondent à une résistance à l'ACV et au FOS, respectivement (93). La

résistance virale est également définie selon certains laboratoires comme étant une élévation de CE50 de trois à quatre fois supérieures à celle du premier prélèvement chez un même patient. La comparaison des CE50 fait apparaître une grande hétérogénéité des valeurs entre les équipes, aussi bien avec des techniques différentes que des techniques similaires. Cela s'explique par la diversité des lignées cellulaires et des souches de référence utilisées.

Il existe plusieurs inconvénients à l'approche phénotypique. Tout d'abord, le temps requis pour la culture cellulaire est long, en moyenne 2 à 7 jours. Après l'isolement du virus, l'antivirogramme peut alors être réalisé, ce qui nécessite une semaine supplémentaire et le rendu des résultats de sensibilité est généralement réalisé en 15 jours. De plus, il est possible que durant la croissance virale, une population hétérogène minoritaire émerge et que le résultat ne reflète pas les populations virales initialement présentes chez le patient. Enfin, il existe également un défaut de sensibilité. Les isolats cliniques peuvent contenir un mélange de différentes sous-populations virales résistantes en faible proportion (de 0,01 à 0,15%) qui ne sont alors pas détectées (4). C'est à partir de 20% de virus résistants que la CE50 commence à augmenter (98).

8.2 Détection génotypique

La méthode génotypique permet de détecter dans les gènes viraux *UL23* et *UL30* des mutations à l'origine d'une résistance aux antiviraux. Ces gènes d'intérêt sont amplifiés par PCR, puis les produits de PCR sont séquencés, majoritairement par la technique Sanger. Les séquences génétiques obtenues sont comparées à celles des souches HSV de référence. Les mutations détectées sont à interpréter par rapport à une base de données des mutations décrites dans la littérature. Cette technique est plus sensible que la méthode phénotypique et permet la détection des virions mutés, à des taux inférieurs à ceux détecté par l'approche phénotypique. La limite principale de cette technique est que l'ensemble des mutations de résistance et de polymorphisme génétique naturel du virus ne sont pas décrites. Ainsi, le rôle précis d'une mutation détectée lors du séquençage peut s'avérer parfois difficile à établir.

Si une mutation non précédemment caractérisée est détectée, une interprétation par rapport à sa localisation peut être faite. S'il s'agit d'une addition/délétion, la mutation induira un décalage du cadre de lecture et potentiellement l'apparition précoce d'un codon stop. Il s'agira ainsi d'une mutation induisant une résistance à l'ACV. S'il s'agit d'une substitution située dans une région hautement conservée, une zone liée à l'activité catalytique ou au repliement tridimensionnel de la protéine, alors elle sera fortement suspecte d'induire une résistance aux antiviraux. L'interprétation peut être facilitée si une exploration phénotypique est effectuée conjointement. En cas de substitution située en dehors des zones conservées, l'interprétation ne sera pas possible.

Le séquençage haut débit NGS représente une alternative attrayante au séquençage Sanger (99). En effet, le séquençage NGS permet de caractériser les mutants viraux minoritaires et potentiellement de détecter l'émergence de mutants résistants à des stades plus précoces de l'infection (100). Lors de l'analyse d'un mélange de sous-populations virales comportant à la fois des mutants minoritaires sensibles et résistants, le NGS arrive à détecter la présence de mutants ultra-minoritaires résistants à des taux de 5% (100). Cette technique peut également permettre d'apprécier les variations génétiques des populations résistantes sur des prélèvements successifs durant une thérapie antivirale. L'impact positif du NGS sur le diagnostic virologique des infections à HSV résistant est donc indéniable mais la connaissance approfondie des gènes d'intérêt du virus HSV est nécessaire.

ARTICLE

***UL23, UL30 and UL5* characterization of HSV1 clinical strains isolated from hematology department patients**

Labrunie T¹, Ducastelle S², Halfon-Domenech C³, Ader F⁴, Morfin F^{1,5}, Frobert E^{1,5,*}

¹ Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Nord, Institut des Agents Infectieux, Laboratoire de Virologie, 69004 LYON, France

² Service d'Hématologie Clinique, Centre Hospitalier Lyon Sud, Lyon, France

³ Institut of Pediatric Hematology and Oncology, Hospices Civils de Lyon, Claude Bernard Lyon I university, Lyon.

⁴ Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital de la Croix-Rousse, Lyon, France

⁵ Université de Lyon, Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm U1111 CNRS UMR5308, Equipe Virpath, 69008 LYON, France

* Corresponding author: address: Laboratoire de Virologie, Centre de Biologie et Pathologie

Abstract :

Occurrence of drug-resistant herpes simplex virus type 1 (HSV1) remains a major concern for immunocompromised patients, particularly in clinical hematology departments. A complete database of *UL23*, *UL30* and *UL5* encoding respectively thymidine kinase, DNA polymerase and helicase primase is necessary to make the genotypic detection of drug resistance reliable. We retrospectively studied 239 HSV1 from patients hospitalized in hematological departments during the 2012-2016 period in order to first characterize genes of interest and second to reassess HSV1 antiviral resistance frequency in hematology department patients and particularly in those undergoing an hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). This 5-year study confirmed the high frequency, up to 32%, of acyclovir resistance HSV among HSCT adults, with no significant evolution during the study period. Moreover, the present study provides further information on HSV1 natural polymorphism with 29 newly reported substitutions, 23 on *UL23* and 6 on *UL30*. Likewise, 19 newly detected mutations, 11 on *UL23* and 8 on *UL5*, respectively, for which impact on HSV1 phenotype has to be explored, are also reported herein. Moreover, a new *UL23* substitution must be added to acyclovir resistance related mutations database. Such characterization of gene involved in drug resistance is necessary to enlarge the number of virological labs able to detect HSV drug resistance by genotypic approach.

Keywords :

Herpes simplex virus ; antiviral resistance ; hematopoietic stem cell transplant; thymidine kinase; DNA polymerase; helicase primase inhibitors

Highlights :

- ACV-resistant HSV1 in hematopoietic stem cell transplant (HSCT) patients remains high, around 33%
- No significant evolution in ACV-resistance could be observed from 2012 to 2016
- FOS resistance did not increase and the frequency was 3.7% among HSCT adults
- Exploration of *UL23*, *UL30* and *UL5* genes involved in drug activities is necessary for making genotypic detection reliable
- We reported one novel ACV-resistance substitution, 29 newly HSV1 natural polymorphism substitutions, and 19 undefined substitutions

1. Introduction

Occurrence of drug-resistant herpes simplex virus type 1 (HSV1) remains a major concern for immunocompromised patients, particularly in clinical hematology department [1]. Prevalence of HSV1 resistant strains can reach 30% among hematopoietic stem cell transplant (HSCT) patients [2]. Pre-transplantation conditioning including chemotherapy and radiotherapy or the development of graft versus host disease (GVHD) represent major risk factors for mucosal involvement thus favoring HSV reactivation and high viral replication. Because of a defective cellular immunity, HSV1 reactivation can occur even under acyclovir (ACV) prophylaxis and viral clearance is delayed favouring emergence of HSV resistance to antiviral drugs. This emergence thus partially reflect the severity of the underlying disease condition and the degree of immune impairment among HSCT patients [3].

Acyclovir remains the first line treatment in regards of its effectiveness and safety [4]. ACV requires an initial phosphorylation step from the viral thymidine kinase (TK) encoded by *UL23* gene and then acts as a chain terminator inhibiting DNA polymerase (DNApol) encoded by *UL30* gene. Foscarnet (FOS) and cidofovir (CDV), used as second line treatments in case of ACV resistance, do not require viral TK phosphorylation and directly inhibit DNApol. Nevertheless, their nephrotoxicity restricts their use in clinical practice [5, 6]. Mutations in *UL23* gene is reported in more than 90% of the cases of ACV resistance [7]. *UL23* gene, which is not essential for viral replication, remains permissive to mutations and has an extended natural polymorphism [8]. *UL23* resistance-related mutations are in 50% of cases nucleotide insertions or deletions resulting in premature stop codons, mainly occurring in G and C homopolymers so-called "hot-spot" regions, or in the remaining 50% of cases, single nucleotide substitution within active or conserved regions. *UL30* gene, in regards to its key role in viral replication, is conserved and resistance mutations mainly induce impaired viral growth fitness [9, 10]. Nevertheless, resistance mutations occurring within *UL30* active or conserved regions can induce resistant strains to both ACV and FOS or even multi-resistance affecting CDV. Discovering antivirals that does not ultimately target DNApol can therefore be essential. The helicase-primase complex, encoded by *UL5* and *UL52* genes, respectively, is an essential and well-conserved gene among members of the herpesvirus family [11]. Recently, helicase-primase inhibitors (HPI) as amenamevir (AMV) and pritelivir (PTV) represent promising molecules as they remain active on ACV resistant HSV [12]. Even if few publications showed resistance mutations within *UL5* gene [13, 14], *UL5* and *UL52* gene have not been yet extensively characterized.

Currently, detection of antiviral resistance can be performed by phenotypic analysis, relying on viral culture, a highly time-consuming method. Genotypic detection of antiviral resistance can be performed by PCR amplification and sequencing genes of interest, but is still also restricted to a small number of expert labs. There is a crucial need to develop reliable genotypic tests for antiviral resistance as available for HIV or

HBV [15, 16]. The large scale introduction of genotypic methods in laboratory routine would save time and allow a better management of patients care. The collection of data on genetic polymorphism and resistance mutations is thus an essential prerequisite. At the present time, almost 58%, 21 % and 3% of the amino acid of the *UL23*, *UL30* and *UL5* have been characterized for nucleotide substitutions. Knowledge about HSV genome has increased these last years, but a further exploration is absolutely necessary, especially in the genomic segments involved in drug activity.

In this context, this study aimed first to characterize *UL23*, *UL30* and *UL5* genes from 239 HSV1 clinical strains isolated from hematology department patients, in order to complete natural polymorphism and resistance mutations database. Second, in regards to patient recruitment, this study also aimed to reassess HSV1 antiviral resistance frequency in hematology department patients and particularly in those undergoing an hematopoietic stem cell transplantation.

2. Materials and methods

2.1 Patients and clinical specimens

In this single-center retrospective study, during the 2012-2016 period, 239 patients had tested HSV positive by real-time PCR assay using HSV1 & HSV2 R-gene™ Quantification kit (Argène, BioMérieux, France). Patients were hospitalized from one of the three clinical hematology departments of Lyon including South Lyon Hospital of Hospices Civils of Lyon, Pediatric Onco-Hematology Institute and Oncologic Leon Berard Center. Overall, clinical hematology centers hospitalized on average 10 000 patients a year and perform 150 to 200 hematopoietic stem cell transplantations (HSCT) per year. 186 (78%) patients were adults and 53 (22%) were children. Demographic characteristics and indications of HSCT are summarized in Table 1, differentiating adults and children patients who undergone an HSCT. Among patients presenting an hematological disease (184 adults and 41 children), 85 adults (46%) and 4 children (9.8%) have undergone an HSCT. Clinical samples were collected from various locations: 126 oropharyngeal (52.7%), 48 cutaneous (20.1%), 45 nasopharyngeal (18.8%), 12 bronchoalveolar lavages (5.0%), 5 anal (2.1%), 2 genital (0.8%) and 1 ocular (0.4%).

2.2 Phenotypic analysis

Screening for ACV and FOS resistance was performed by chessboard method using neutral red dye-uptake assay as previously described [17]. The effective concentration 50 (EC50) cut-off values were 6.5 µM for ACV and 350 µM for FOS [18]. Testing FOS resistance was performed in specific clinical and virological situations as ACV

resistance, herpetic recurrence under treatment or severe clinical conditions. Resistance to CDV, AMV and PTV was not tested.

2.3 Genotypic analysis

HSV DNA extraction was performed directly on clinical samples after a proteinase K digestion on NucliSENS easyMAG® device (BioMérieux, France). Amplification process of *UL23*, *UL30* and *UL5* was carried out by Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs, USA) as previously described [19, 20]. Primers for *UL5* amplification are available on request. Amplicons were sequenced by Sanger method (Genoscreen, Lille). Nucleotides sequences were then compared to sensitive reference strain KOS (GenBank number access JQ763480) using SeqmanII software (DNASTar Inc, Wisconsin, USA). Silent mutations have not been taken into account. *UL23* and *UL30* genotypic analysis was tested for the 239 specimens, whereas *UL5* gene encoding for helicase-primase complex was only sequenced for ACV resistant specimens (n=36).

2.4 Statistical analysis

The proportions of ACV resistance according to the transplantation status and the evolution of ACV resistance year-per-year were both evaluated by a Chi-squared test of independence to assess intergroup differences. The frequencies of *UL23*, *UL30* and *UL5* polymorphism mutations were evaluated statistically by a Student's t-test. A test was considered statistically significant when the p value was less than 0.05.

2.5 Ethical statement

Samples were collected for regular clinical management during hospital stay. No additional samples were taken for the purpose of this study. Patient confidentiality was strictly protected. This study has been approved by the ethical committee of Hospices Civils de Lyon, France, on 17th October 2018.

3. Results

3.1. Phenotypic data

Among the 239 HSV1 PCR-positive specimens, 39 strains were not able to replicate on MRC-5 cells, partly due to a low viral load. ACV sensitivity was thus performed by phenotypic method for 200 strains. FOS sensitivity was determined for 51 strains, in regards to clinical interest. From the 200 strains tested for ACV resistance, 36 showed

an ACV EC50 beyond the 6,5 μM cut-off and were thus considered as ACV resistant. From the 51 strains explored for FOS resistance, 5 strains had an EC50 beyond the 350 μM cut-off, and were then considered as phenotypically resistant to FOS. All these FOS-resistant strains were ACV cross resistant.

3.2. Genotypic data

3.2.1. *UL23* analysis

The *UL23* gene could be amplified and sequenced for the 239 HSV1 strains. *UL23* analysis showed 36 sequences strictly identical to KOS reference strain and 164 with only natural polymorphism mutations (NPm). This allowed us to consider 200 strains (83.7%) as genotypically sensitive to ACV. 23 new substitutions never previously described could thus be classified as NPm, as detected in ACV sensitive strains (Table 2). 32 strains (13.4%) were considered as genotypically resistant to ACV by identifying either a previously described resistance mutation (Rm) or frameshift mutation (Fm). Resistance-related mutations were punctual substitution for 20 sequences (62.5%), single-nucleotide deletion for 9 sequences (28.1%) and single-nucleotide insertion for 3 sequences (9.4%). Interestingly, the L242P mutation, previously described as unclear significance mutation [21], could now be classified as a mutation causing resistance to ACV. It was the only mutation identified within *UL23* gene of an ACV resistant (EC50=14 μM) and FOS sensitive (EC50<62.5 μM) strain. There were 7 (2.9%) strains that presented one mutation never previously described. As no phenotypical data could be available, these 7 mutations are thus considered as unclear significance mutation (USm). Four other mutations (S74L, P154S, E225L and Y248H) were also considered as USm because they were detected in ACV-resistant strains for which a known resistance-related mutation was also identified (frameshit mutations or D162N Rm). Of note, positions 151, 316 and 352 have previously been described but with other aminoacid substitutions. These experiments on *UL23* allow us to enlight 35 new amino acids localization for nucleotide substitutions, improving from 58% to 67% the knowledge about mutated positions among the total gene length.

3.2.2. *UL30* analysis

The *UL30* gene could be amplified and sequenced for 147 HSV1 strains. 53 strains failed at amplification process and 39 strains were not available anymore to perform *UL30* sequencing. 67 sequences had no mutations and were identical to KOS reference strain (45.6%). 77 sequences had only natural NPm (52.4%). 6 new mutations considered as NPm (G641R, G645D, E649G, G679D, R681L and I966M) had never been published (Table 3). From the 5 strains tested ACV and FOS resistant by phenotypic analysis, 3 strains presented a mutated DNAPol with a substitution mutation already

published (2.0%), conferring both ACV and FOS resistance (A605V, S724N and V813M). *UL30* gene investigation did not allow us to genotypically explain the phenotypic FOS resistance for 2 strains : one strain was not available anymore to perform *UL30* sequencing, while the second one harboured two substitutions previously described as NPM (D672N and N711K). Finally, we improved *UL30* database with 6 new substitutions.

3.2.3. *UL5* Analysis

24 strains (20 ACV-resistant FOS-sensitive strains and 4 resistant to both antivirals) could have a helicase primase complex explored by *UL5* gene sequencing. 3 strains failed at amplification process and 9 strains were not available anymore to perform *UL5* sequencing. 8 new substitutions not previously reported were detected (Table 4). Three of them (A575V, V600A and V602T) are located in an area where many NPM have already been reported.

3.2.4. Comparison of *UL23*, *UL30* and *UL5* genes

Concerning *UL23* gene, among strains with natural polymorphism, ACV-sensitive strains have on average 2.69 (± 2.62) NPM per strain and ACV-resistant have 1.78 (± 2.02) NPM per strain. More precisely, 1.91 (± 1.97) for strains with frameshift mutations and 1.52 (± 2.12) for strains with substitution mutations. Thereby, the frequency of occurrence of *UL23* NPM is not statistically higher for resistant strains ($p < 0.05$). Some *UL23* NPM have been very frequently observed in association with others. Notably, three recurrent *UL23* NPM (V267L, P268T and D286E) have been identified almost exclusively associated. This kind of association was not observed for *UL30* and *UL5*. Concerning *UL30* gene natural polymorphism, ACV-sensitive strains have on average 0.82 (± 1.02) NPM per strain and ACV-resistant have 0.84 (± 1.01) NPM per strain. Frequency of genetic polymorphism on *UL30* gene is clearly lower than that determined for *UL23* gene ($p < 0.001$). Concerning *UL5*, the gene presented on average of 5.00 (± 1.59) NPM per sequence. *UL5* polymorphism frequency is therefore higher than for *UL23* ($p < 0.001$) and *UL30* ($p < 0.001$) genes, but the localization of the mutations is much less diverse than that observed for *UL23*. Indeed, we observed 64 different NPM localizations for *UL23* and only 11 for *UL5* gene, for a 376 and 882 amino acids total length, respectively.

Schematic localization maps of previously reported NPM, Rm (with the exception of *UL23* frameshift mutations) and USm detected during our observations is detailed on Figures 1,2,3 for *UL23*, *UL30* and *UL5* genes, respectively. Most NPM are located outside active or conserved sites of enzymes, except for *UL23*, the D286E substitution within site 6, and for *UL30*, the A562T substitution, within delta-C and N711K within

motif II. *UL23* Rm are mostly located on highly-conserved parts or close to it, except G200D and G246V, whereas all *UL30* Rm are strictly located on conserved amino acids regions. For *UL5* gene, one NPM (V347I) have been detected on the IV conserved motif.

3.3 Frequency of drug-resistance

3.3.1. In adults

By combining phenotypic (161 ACV testing) and genotypic (186 *UL23* sequences and 117 *UL30* sequences) assays, ACV susceptibility was determined for 167 HSV1. 31 strains were identified as resistant to ACV on the whole adult population; the overall prevalence is then 18.6%. Among non-HSCT patients this prevalence is 5.8% (5/86) while it reaches 32.1% (26/81) among HSCT patients. As four strains were also FOS resistant from adult population, ACV and FOS cross-resistance prevalence is 2.4% (4/167) among adults and 3.7% (3/81) among HSCT patients.

3.3.2. In children

Phenotypic (39 ACV testing) and genotypic (53 *UL23* sequences and 30 *UL30* sequences) data association provided us ACV susceptibility for 46 children. 5 cases of ACV resistance were detected; the overall prevalence is then 10.9%. Among non-HSCT patients this prevalence is 7.1% (3/42) while it reaches 50% (2/4) among HSCT patients. Of note, one case of FOS resistance (1/42, 2.2%) was detected in a child who undergone HSCT for the treatment of acute myeloid leukemia.

3.4 Evolution of ACV resistance and risk factor

The overall frequency of ACV-resistant HSV1 in patients admitted in clinical hematology departments was 16.9% (36/213). 26 specimens did not allow us to conclude about ACV susceptibility because of USm occurrence (7 strains) or unavailable isolate to perform *UL30* sequencing (19 strains). Year-per-year prevalence is represented by Figure 4. Over the 2012-2016 period, no statistically significant evolution could be observed from year-to-year neither for the whole studied population ($p=0.91$) nor the HSCT population ($p=0.85$). Considering the 89 patients who have undergone HSCT, 85 could be explored for ACV sensitivity. 28 HSCT patients developed an ACV-resistant HSV1 infection while only 8 patients in the non-HSCT group. The prevalence of resistance is therefore 32.9% in HSCT patients and 6.25% in non HSCT patients. The emergence of ACV resistance and patients transplant status are statistically correlated ($p<0.001$) (OR=7.37).

4. Discussion

The prevalence of resistance is known to be the highest in hematopoietic stem cell transplant patients, up to 27% to 34% depending on studies [21-23]. The risk factors of developing a resistant herpesvirus infection for these patients are various: allogeneic graft, HLA mismatch donors, intense T-cell depletion, underdose of ACV prophylaxis [24, 25]. The death rate of HSCT patients is higher in patient with HSV1 shedding and even higher among those who excrete an ACV resistant strain even if HSV1 disease does not occur [3]. In University Hospital of Lyon, HSCT patients are subjected to weekly systematic sampling, allowing a good survey of such critical patients, and thus reflecting the exhaustive HSV infection and drug-resistance frequency reported herein. This 5-year study confirmed the high frequency, up to 32%, of drug-resistance HSV among HSCT adults, as assessed previously [21]. Nevertheless, no significant evolution could be observed from 2012 to 2016, as observed between 2007 and 2012 [21]. Our overall 6.25% prevalence in non-HSCT patients is close to that already described in the literature [26]. Although careful surveillance must be maintained, FOS resistance did not increase and the frequency was 3.7% among HSCT adults as described before [21].

Phenotypic methods by viral culture remain time-consuming. The average time between clinical sampling and susceptibility testing is reported to be around 15 days, and even 27 days between collection and adaptation of antiviral therapy [27]. In case of clinical failure, therapeutic switch is often done before laboratory results are available. Genotypic techniques would decrease this delay. Sanger sequencing is still the gold standard for the detection of drug resistance mutation even if NGS high-throughput sequencing would permit to characterize minor variant subtypes and may enable earlier detection of emerging resistance mutation [28]. Establishing a robust and complete mutation database is therefore essential especially to develop genotypic techniques. The present study provides further informations on HSV1 natural polymorphism with 29 newly reported mutations, 23 on *UL23* and 6 on *UL30*. Likewise, 19 newly detected mutations, 11 on *UL23* and 8 on *UL5*, respectively, for which impact on HSV1 phenotype has to be explored are also reported herein. A new *UL23* substitution (L242P) must be added to ACV resistance related mutations database.

UL23 gene variability was 2.69 Npm per strain, whereas *UL30* was 0.83 Npm per strain. These data confirm that *UL30* gene is highly conserved because of its crucial role into viral replication. Nevertheless, *UL30* polymorphism is clearly lower than reported before [19]. Primers used for *UL30* amplification were designed to preferentially amplify highly conserved areas and thus target resistance mutations. Many natural polymorphism mutations possibly never described might be present outside of this targeted sequence. *UL5* gene shows frequent polymorphism but with very few different locations, as previously reported [29]. Nevertheless, *UL5* sequencing studies should be performed on larger amount of HSV to be exhaustive.

Discrepancy between phenotype and genotype can appear, partly due to technical limitations, presence of viral sub-populations or even the detection of mutations whose role remains unknown. One strain with a FOS resistance phenotype presented 2 mutations in *UL30* gene: D672N and N711K. A 2010 study published these two mutations as NPM [19]. However, N711K is located within a conserved region of the gene; D672N was published on another study as a resistance-associated mutation [7]. Their impact on resistance must therefore be clearly established. The newly-described M322L mutation, located outside conserved regions, has been observed within two ACV-sensitive strains although a M322K mutation leading to resistance has been described [30]. This M322K mutation has also been selected *in vitro* and included in confirmed mutations [26]. The physico-chemical characteristics of leucine and lysine could lead to a different impact on TK functionality. Moreover, 11 USm on *UL23* and 8 USm on *UL5* have also to be reported herein. Four USm mutations (S74L, P154S, E225L and Y248H) have been detected in ACV-resistant strain harbouring another known ACV Rm, but could also be implied in drug resistance. Particularly, E225L is located close to the 216-222 conserved site and Y248H is near a well-known G246V resistance-associated mutation. About other USm substitutions, some should likely be related to *UL23* NPM. A37S and Q270R could be presumably NPM as A37S is adjacent to E36K previously reported as NPM and Q270R is located in a high frequency area of NPM. Even if H151Y has already been known as a NPM, the impact of a tyrosine instead of an asparagine should be explored for H151N. The four remaining *UL23* USm (V70M, P155Q, N303Y and M372I) are neither located on “hot-spots” nor on high frequency area of NPM, so their roles cannot be speculated. For *UL5* gene, the impact of the USm could not be established as no phenotypic data about HPI was available. Nevertheless, none of the 8 USm was located on the motif IV region (amino acid 341 to 356) where all mutations conferring HPI resistance have been described [29]. Moreover, V600A and V602T are adjacent to M601I, already published as Npm [29]. Furthermore, no patient was treated with HPI so, without selection pressure, these mutations should correspond to *UL5* polymorphism. Studies are needed to precisely characterize some substitutions in order to elucidate their impact on HSV1 phenotype, for example by site-directed mutagenesis [31].

In hematological departments, protocols for treating resistant HSV infection are codified by the American Society for Blood and Marrow Transplantation guidelines. In case of ACV resistance, if no improvement is observed after 7 days of FOS infusion, switch to CDV could be recommended. As CDV and its prodrug brincidofovir could represent alternative treatments, testing CDV sensitivity, notably on FOS resistant strains, could have been interesting. Moreover, as therapeutic use of HPI looks promising [32], HSV susceptibility to HPI, should also be developed, especially since HSV1 minor variants highly resistant to HPI have already been detected on clinical isolates [13]. Some real time culture assays would allow to perform such test sensitivity and differentiate NPM from Rm, and study and clarify USm in drug resistance [33].

In conclusion, new informations concerning natural polymorphism of HSV1 *UL23*, *UL30* and *UL5* genes provided herein will assist the interpretation of genotypic assays. A new mutation associated to ACV resistance, L242P on *UL23* gene, has also to be incremented in the database. As it already exists for CMV [34], the establishment of a complete database associated to regular updates is necessary to enlarge the number of virological labs able to detect HSV drug resistance by genotypic approach.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Virology Lab team for technical help, and Philip Robinson for reading the english version.

References

1. Morfin F, Thouvenot D: Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J Clin Virol* 2003, 26(1):29-37.
2. Piret J, Boivin G: Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55(2):459-472.
3. Kakiuchi S, Tsuji M, Nishimura H, Yoshikawa T, Wang L, Takayama-Ito M, Kinoshita H, Lim CK, Fujii H, Yamada S et al: Association of the Emergence of Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus Type 1 With Prognosis in Hematopoietic Stem Cell Transplantation Patients. *The Journal of infectious diseases* 2017, 215(6):865-873.
4. Vere Hodge RA, Field HJ: Antiviral agents for herpes simplex virus. *Advances in pharmacology* 2013, 67:1-38.
5. Deray G, Martinez F, Katlama C, Levaltier B, Beaufiles H, Danis M, Rozenheim M, Baumelou A, Dohin E, Gentilini M et al: Foscarnet nephrotoxicity: mechanism, incidence and prevention. *American journal of nephrology* 1989, 9(4):316-321.
6. Vandercam B, Moreau M, Goffin E, Marot JC, Cosyns JP, Jadoul M: Cidofovir-induced end-stage renal failure. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 1999, 29(4):948-949.
7. Sauerbrei A, Deinhardt S, Zell R, Wutzler P: Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant clinical isolates of herpes simplex virus. *Antiviral research* 2010, 86(3):246-252.

8. Burrel S, Aime C, Hermet L, Ait-Arkoub Z, Agut H, Boutolleau D: Surveillance of herpes simplex virus resistance to antivirals: a 4-year survey. *Antiviral research* 2013, 100(2):365-372.
9. Piret J, Boivin G: Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus. *Rev Med Virol* 2014, 24(3):186-218.
10. Zarrouk K, Piret J, Boivin G: Herpesvirus DNA polymerases: Structures, functions and inhibitors. *Virus research* 2017, 234:177-192.
11. Chono K, Katsumata K, Kontani T, Kobayashi M, Sudo K, Yokota T, Konno K, Shimizu Y, Suzuki H: ASP2151, a novel helicase-primase inhibitor, possesses antiviral activity against varicella-zoster virus and herpes simplex virus types 1 and 2. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2010, 65(8):1733-1741.
12. Tyring S, Wald A, Zadeikis N, Dhadda S, Takenouchi K, Rorig R: ASP2151 for the treatment of genital herpes: a randomized, double-blind, placebo- and valacyclovir-controlled, dose-finding study. *The Journal of infectious diseases* 2012, 205(7):1100-1110.
13. Sukla S, Biswas S, Birkmann A, Lischka P, Zimmermann H, Field HJ: Mismatch primer-based PCR reveals that helicase-primase inhibitor resistance mutations pre-exist in herpes simplex virus type 1 clinical isolates and are not induced during incubation with the inhibitor. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2010, 65(7):1347-1352.
14. Field HJ, Biswas S: Antiviral drug resistance and helicase-primase inhibitors of herpes simplex virus. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 2011, 14(1):45-51.
15. Basaras M, Arrese E, Blanco S, Arroyo LS, Ruiz P, Cisterna R: Comparison of INNO-LIPA and TRUGENE assays for genotyping and drug-resistance mutations in chronic hepatitis B virus infection. *Intervirology* 2013, 56(3):190-194.
16. Bronze M, Aitken SC, Wallis CL, Steegen K, Stuyver LJ, de Wit TF, Stevens W: Evaluation of an affordable HIV-1 virological failure assay and antiretroviral drug resistance genotyping protocol. *Journal of virological methods* 2013, 194(1-2):300-307.
17. Langlois M, Allard JP, Nugier F, Aymard M: A rapid and automated colorimetric assay for evaluating the sensitivity of herpes simplex strains to antiviral drugs. *J Biol Stand* 1986, 14(3):201-211.
18. 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. *Journal of medical virology* 1992, 36(1):1-12.

19. Burrel S, Deback C, Agut H, Boutolleau D: Genotypic characterization of UL23 thymidine kinase and UL30 DNA polymerase of clinical isolates of herpes simplex virus: natural polymorphism and mutations associated with resistance to antivirals. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, 54(11):4833-4842.
20. Frobert E, Cortay JC, Ooka T, Najjoulah F, Thouvenot D, Lina B, Morfin F: Genotypic detection of acyclovir-resistant HSV-1: characterization of 67 ACV-sensitive and 14 ACV-resistant viruses. *Antiviral research* 2008, 79(1):28-36.
21. Frobert E, Burrel S, Ducastelle-Lepretre S, Billaud G, Ader F, Casalegno JS, Nave V, Boutolleau D, Michallet M, Lina B et al: Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: an update from a ten-year survey in France. *Antiviral research* 2014, 111:36-41.
22. Morfin F, Bilger K, Boucher A, Thiebaut A, Najjoulah F, Bleyzac N, Raus N, Bosshard S, Aymard M, Michallet M et al: HSV excretion after bone marrow transplantation: a 4-year survey. *J Clin Virol* 2004, 30(4):341-345.
23. Stranska R, Schuurman R, Nienhuis E, Goedegebuure IW, Polman M, Weel JF, Wertheim-Van Dillen PM, Berkhout RJ, van Loon AM: Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the Netherlands: prevalence and characterization. *J Clin Virol* 2005, 32(1):7-18.
24. Nichols WG, Boeckh M, Carter RA, Wald A, Corey L: Transferred herpes simplex virus immunity after stem-cell transplantation: clinical implications. *The Journal of infectious diseases* 2003, 187(5):801-808.
25. Erard V, Wald A, Corey L, Leisenring WM, Boeckh M: Use of long-term suppressive acyclovir after hematopoietic stem-cell transplantation: impact on herpes simplex virus (HSV) disease and drug-resistant HSV disease. *The Journal of infectious diseases* 2007, 196(2):266-270.
26. Piret J, Boivin G: Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections: diagnosis and management. *Current opinion in infectious diseases* 2016, 29(6):654-662.
27. Ariza-Heredia EJ, Chemaly RF, Shahani LR, Jang Y, Champlin RE, Mulanovich VE: Delay of alternative antiviral therapy and poor outcomes of acyclovir-resistant herpes simplex virus infections in recipients of allogeneic stem cell transplant - a retrospective study. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2018, 31(6):639-648.
28. Fujii H, Kakiuchi S, Tsuji M, Nishimura H, Yoshikawa T, Yamada S, Omura N, Inagaki T, Shibamura M, Harada S et al: Application of next-generation sequencing to detect acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 variants at low frequency in

thymidine kinase gene of the isolates recovered from patients with hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of virological methods* 2018, 251:123-128.

29. Collot M, Rouard C, Brunet C, Agut H, Boutolleau D, Burrel S: High conservation of herpes simplex virus UL5/UL52 helicase-primase complex in the era of new antiviral therapies. *Antiviral research* 2016, 128:1-6.

30. Bae PK, Kim JH, Kim HS, Chung IK, Paik SG, Lee CK: Intracellular uptake of thymidine and antiherpetic drugs for thymidine kinase-deficient mutants of herpes simplex virus type 1. *Antiviral research* 2006, 70(3):93-104.

31. Malartre N, Boulieu R, Falah N, Cortay JC, Lina B, Morfin F, Frobert E: Effects of mutations on herpes simplex virus 1 thymidine kinase functionality: an in vitro assay based on detection of monophosphate forms of acyclovir and thymidine using HPLC/DAD. *Antiviral research* 2012, 95(3):224-228.

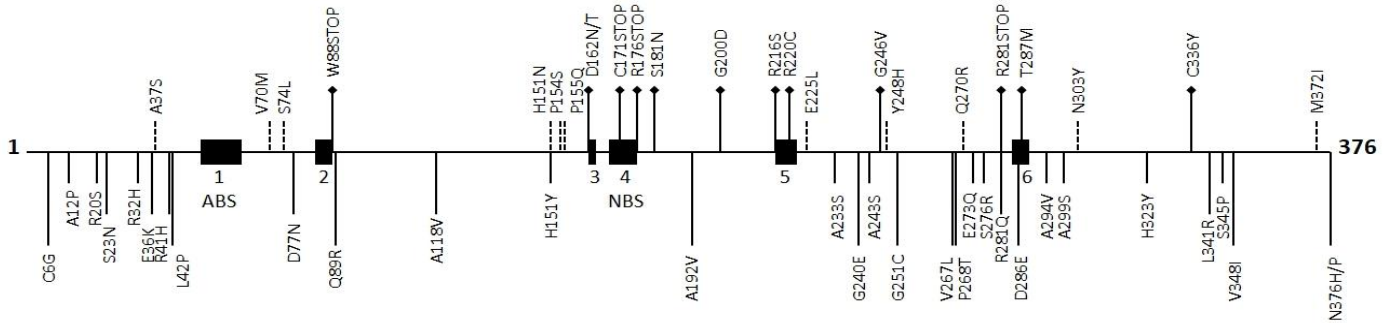
32. James SH, Prichard MN: Current and future therapies for herpes simplex virus infections: mechanism of action and drug resistance. *Current opinion in virology* 2014, 8:54-61.

33. Piret J, Goyette N, Boivin G: Novel Method Based on Real-Time Cell Analysis for Drug Susceptibility Testing of Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus. *Journal of clinical microbiology* 2016, 54(8):2120-2127.

34. Chevillotte M, von Einem J, Meier BM, Lin FM, Kestler HA, Mertens T: A new tool linking human cytomegalovirus drug resistance mutations to resistance phenotypes. *Antiviral research* 2010, 85(2):318-327.

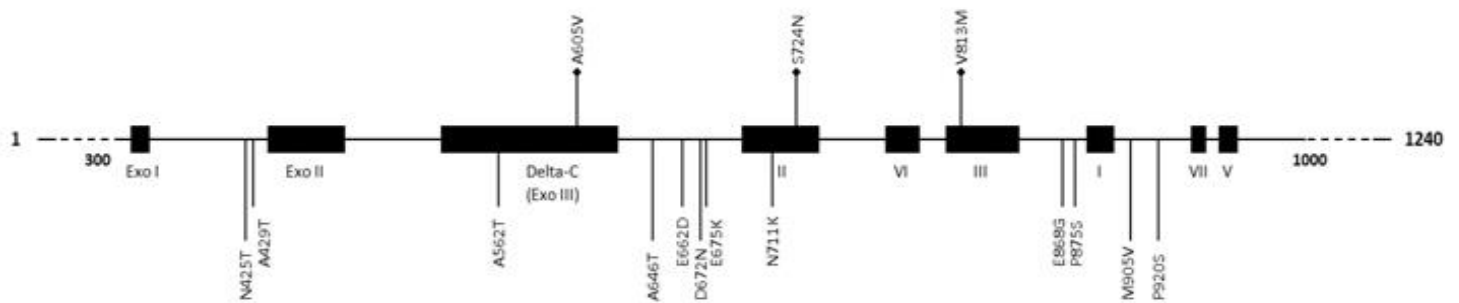
TABLES ET FIGURES

Figure 1 : Schematic of *UL23* gene, previously reported mutations localization



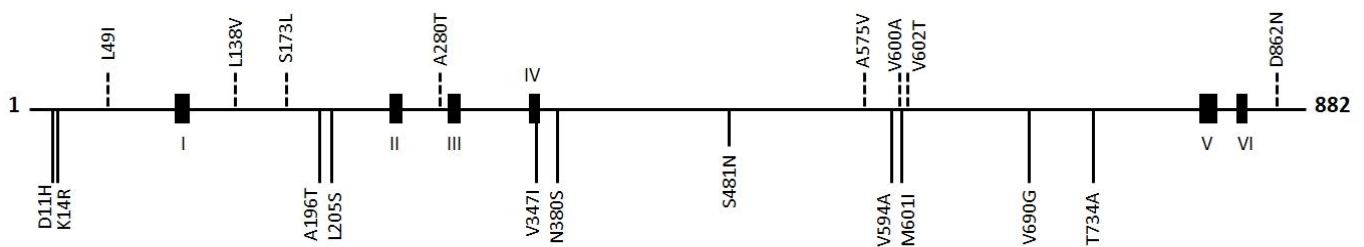
Horizontal line represent non-conserved regions and black boxes the conserved/active regions. ABS is ATP binding site while NBS is nucleoside binding site. Above the horizontal line, resistance mutations and unclear significant mutations are shown. Resistance mutations are schematized by a black line and a rhombus, unclear significant mutations by a dashed line. Natural polymorphism mutations localizations are below the horizontal line. Their frequencies of appearance in our study is schematized by three sizes of lines, a little line for mutations detected in less than 1% of the strains, a medium line for a frequency of detection between 1% and 5%, and tall line for those detected in more than 5% of the strains.

Figure 2 : Schematic of *UL30* gene, previously reported mutations localization



Non-conserved regions are indicated by the horizontal line. Conserved regions and functional domains are indicated by the black boxes. Resistance mutations are schematized by a black line and a rhombus. Natural polymorphism mutations localizations are schematized by vertical lines, small lines for mutations detected in less than 5% of the strains and tall lines for those detected in more than 5% of the strains.

Figure 3 : Schematic of the mutations observed on the *UL5* gene



Non-conserved regions are indicated by the horizontal line. Conserved regions and functional domains are indicated by the black boxes. Unclear significant mutations are schematized by dashed lines below horizontal line. Natural polymorphism mutations are schematized by vertical lines above horizontal line. Small lines are for mutations detected below 5%, and tall lines for frequent mutations more than 5%.

Table 1

Clinical characteristics of patients admitted in clinical hematology departments

	Adults		Children	
	HSCT+	HSCT-	HSCT+	HSCT-
Median age, year (range)	51 (\pm 12.7)	60 (\pm 16.3)	4.5 (\pm 4.9)	10 (\pm 4.6)
Male-to-female sex ratio	1.30	1.35	1.00	1.04
Underlying hematological condition, no. (%)				
Acute myeloid leukemia	46 (54.1)	55 (54.5)	2 (50)	4 (8.7)
Acute lymphoblastic leukemia	8 (9.4)	12 (11.9)	0 (0)	17 (34.7)
Hodgkin's lymphoma	1 (1.2)	0 (0)	1 (25)	3 (6.1)
Non-Hodgkin's lymphoma ^a	8 (9.4)	16 (15.8)	0 (0)	6 (12.2)
Other hematologic pathology ^b	22 (25.9)	16 (15.8)	1 (25)	7 (14.3)
Non-hematologic pathology ^c	0 (0)	2 (2)	0 (0)	12 (24.5)
Total	85 (100)	101 (100)	4 (100)	49 (100)

HSCT: hematopoietic stem cell transplant

^a Burkitt's lymphoma, lymphoplasmacytic lymphoma, mantle cell lymphoma, follicular lymphoma, nodal marginal zone lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma, angioimmunoblastic T cell lymphoma, peripheral T cell lymphoma or T cell prolymphocytic leukemia^b Refractory anemia with excess blasts, refractory cytopenia with multilineage dysplasia, myelofibrosis, myelodysplastic syndrome, chronic myeloid leukemia, chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma, chronic myelomonocytic leukemia, primary polycythemia, sickle cell disease or hemolytic anemia^c AL amyloidosis, nephroblastoma, neuroblastoma, sarcoma, ependymoma, cavum cancer or testicular cancer**Table 3***UL30* gene previously unreported mutation

Mutation	Type	Amount	Sample	Date	EC50 ACV	EC50 FOS
G641R	NPm	1 strain	Oropharyngeal	2013	<0.8 μ M	107 μ M
G645D	NPm	1 strain	Oropharyngeal	2014	<0.8 μ M	110 μ M
E649G	NPm	1 strain	Oropharyngeal	2015	1 μ M	101 μ M
G679D	NPm	1 strain	Cutaneous	2013	<0.8 μ M	125 μ M
R681L	NPm	1 strain	Nasopharyngeal	2012	<0.8 μ M	104 μ M
I966M	NPm	1 strain	Cutaneous	2012	2 μ M	226 μ M

ACV: acyclovir; FOS: foscarnet ; HSCT: hematopoietic stem cell transplant ; NPm: natural polymorphism mutation

EC50 cut-off values : 6.5 μ M for ACV and 350 μ M for FOS**Table 4***UL5* gene previously unreported mutations

Mutation	Type	Amount	Sample	Date	EC50 ACV	EC50 FOS
L49I	USm	1 strain	Cutaneous	2014	16 μ M	638 μ M
L138V	USm	1 strain	Oropharyngeal	2014	15 μ M	538 μ M
S173L	USm	1 strain	Cutaneous	2014	42 μ M	92 μ M
A280T	USm	1 strain	Oropharyngeal	2015	31 μ M	<62.5 μ M
A575V	USm	1 strain	Oropharyngeal	2015	31 μ M	<62.5 μ M
V600A	USm	1 strain	Oropharyngeal	2014	15 μ M	538 μ M
A602T	USm	1 strain	Oropharyngeal	2014	15 μ M	538 μ M
D862N	USm	1 strain	Oropharyngeal	2013	16 μ M	638 μ M

USm : unclear significance mutation ; ACV: acyclovir ; FOS: foscarnet

EC50 cut-off values : 6.5 μ M for ACV and 350 μ M for FOS

Table 2*UL23* gene previously unreported mutations

Mutation	Type	Amount	Sample	Date	EC50 ACV	EC50 FOS
A37S	USm	1 strain	Nasopharyngeal	2013	NA	NA
E43A	NPm	2 strains	Oropharyngeal	2016	1 µM	NP
			Bronchoalveolar	2016	<0.8 µM	NP
L50M	NPm	1 strain	Oropharyngeal	2014	<0.8 µM	NP
L68R	NPm	2 strains	Oropharyngeal	2016	1.2 µM	NP
			Nasopharyngeal	2015	<0.8 µM	NP
V70M	USm	1 strain	Bronchoalveolar	2012	NA	NA
S74L	USm	1 strain	Oropharyngeal	2015	31 µM	<62.5 µM
Q109K	NPm	1 strain	Oropharyngeal	2015	<0.8 µM	101 µM
A133V	NPm	1 strain	Oropharyngeal	2014	<0.8 µM	NP
A136N	NPm	1 strain	Oropharyngeal	2014	<0.8 µM	NP
S150L	NPm	1 strain	Oropharyngeal	2013	<0.8 µM	NP
H151N	USm	1 strain	Oropharyngeal	2016	NA	NA
P154S	USm	1 strain	Anal	2016	67 µM	70 µM
P155Q	USm	1 strain	Oropharyngeal	2011	NA	NA
L159R	NPm	1 strain	Oropharyngeal	2013	45 µM	88 µM
E225L	USm	1 strain	Nasopharyngeal	2012	20 µM	136 µM
L242P	Rm	1 strain	Nasopharyngeal	2012	14 µM	<62.5 µM
Y248H	Usm	1 strain	Oropharyngeal	2012	42 µM	125 µM
D258N	NPm	1 strain	Bronchoalveolar	2016	1 µM	NP
S263L	NPm	2 strains	Oropharyngeal	2014	1.3 µM	NP
			Oropharyngeal	2014	15 µM	538 µM
Q270R	USm	1 strain	Oropharyngeal	2016	NA	NA
P280S	NPm	1 strain	Oropharyngeal	2016	1 µM	NP
N301S	NPm	1 strain	Oropharyngeal	2014	<0.8 µM	NP
N303Y	USm	1 strain	Cutaneous	2015	NA	NA
A316S	NPm	1 strain	Oropharyngeal	2014	<0.8 µM	NP
M322L	NPm	2 strains	Nasopharyngeal	2013	<0.8 µM	NP
			Oropharyngeal	2014	<0.8 µM	NP
I326V	NPm	2 strains	Oropharyngeal	2016	1 µM	NP
			Bronchoalveolar	2016	<0.8 µM	NP
D330A	NPm	1 strain	Cutaneous	2016	<0.8 µM	NP
D338H	NPm	1 strain	Oropharyngeal	2015	<0.8 µM	NP
Q342H	NPm	1 strain	Oropharyngeal	2014	<0.8 µM	NP
T344I	NPm	1 strain	Nasopharyngeal	2012	<0.8 µM	NP
Q349R	NPm	1 strain	Nasopharyngeal	2013	<0.8 µM	NP
V352L	NPm	1 strain	Oropharyngeal	2015	1.5 µM	NP
R370W	NPm	1 strain	Oropharyngeal	2012	1.3 µM	NP
E371D	NPm	1 strain	Nasopharyngeal	2014	1.5 µM	NP
M372I	USm	1 strain	Cutaneous	2012	NA	NA

USm : unclear significance mutation ; NPm: natural polymorphism mutation ; Rm: resistance mutation

ACV: acyclovir ; FOS: foscarnet ; NP: not performed ; NA: not assessable

EC50 cut-off values : 6.5 µM for ACV and 350 µM for FOS

DISCUSSION

La prévalence de la résistance de l'HSV1 aux antiviraux est rapportée pour être la plus élevée chez les patients greffés de CSH. En effet, des études rapportent des fréquences allant de 27% à 34% (8,12,101). Les facteurs de risque de développer une infection à HSV résistant chez ces patients sont variés : greffe allogénique, incompatibilité HLA, déplétion intense de l'immunité cellulaire ou encore une prophylaxie par ACV mal conduite (37,102). Le taux de mortalité des patients greffés de CSH est plus élevé chez les patients excréant un virus HSV1 et encore plus élevé parmi ceux excréant un virus résistant à l'ACV même en l'absence de survenue d'une maladie herpétique (19). Dans les services d'hématologie du CHU de Lyon, les patients greffés de CSH sont soumis à des prélèvements systématiques et hebdomadaires permettant un dépistage exhaustif. Notre étude portant sur 5 années consécutives confirme cette fréquence élevée avec 32,1% de cas de résistance à l'ACV chez les patients greffés de CSH (8). Chez les patients non greffés de CSH, la prévalence globale est de 6,25%, en concordance avec les données décrites dans la littérature (103). Concernant la fréquence de résistance chez les enfants greffés de CSH, nous n'avons eu que 4 cas, ceci ne nous permettant donc pas d'obtenir des données épidémiologiques interprétables comme celles obtenues chez l'adulte. En effet, l'intervalle de confiance à 95% de la prévalence chez l'adulte greffé est de 30,9% à 33,3% alors que chez l'enfant greffé il est de 25,5% à 74,5%. Néanmoins, notre travail a permis de confirmer les résultats de la dernière enquête de notre laboratoire (8). Cette enquête, portant sur la période de 2002-2011, démontrait une augmentation significative des cas de résistance à l'ACV entre 2002-2006 et 2007-2011, passant de 3,8% à 15,7% pour les immunodéprimés et de 14,3% à 46,5% pour les patients greffés de CSH (8). Concernant la résistance au FOS, peu de données épidémiologiques existent dans la littérature. Nous rapportons ici une prévalence chez les individus greffés de CSH de 3,7% pour les adultes et 2,2% pour les enfants. Bien que le FOS n'ait été testé que pour un nombre restreint d'HSV1 (51 souches testées), ces données peuvent être considérées comme relativement cohérentes par rapport aux données de la littérature (12). Une étude portant sur 196 patients greffés de CSH rapporte également une prévalence de 3% (13).

Les méthodes phénotypiques de détection de la résistance restent chronophages. La culture virale nécessite des cultures cellulaires qui imposent d'importantes lourdeurs techniques pour obtenir des lignées cellulaires viables et exploitables et le temps pour obtenir un titre viral adéquat pour l'inoculum est également variable. Le temps moyen entre le prélèvement du patient et le rendu du résultat de l'antivirogramme est d'environ 15 jours et même de 27 jours entre le prélèvement de l'échantillon et la modification du traitement (34). Dans l'état actuel des techniques, une modification thérapeutique dès la survenue d'une suspicion d'échec clinique et avant même d'avoir obtenus les résultats du laboratoire semble être préférable. La détection génotypique de la résistance permet un gain de temps indéniable et donc une meilleure prise en charge des patients. La méthode de séquençage Sanger reste le « gold standard » pour la détection des mutations de résistance. Les nouvelles méthodes de séquençage haut débit NGS sont très prometteuses dans l'optique d'améliorer la sensibilité et la rapidité de cette détection (99). En effet, elle permettrait de caractériser les sous-types viraux minoritaires et ainsi de détecter l'émergence d'une souche résistante à des stades bien plus précoces (100). L'établissement d'une base de données complète et robuste des mutations, à la fois de résistance et de polymorphisme, est donc essentiel afin d'utiliser l'approche génotypique pour détecter la résistance aux antiviraux de l'HSV1. Cette étude a permis de fournir un important complément d'information sur le polymorphisme naturel du virus HSV1 en décrivant 29 nouvelles mutations : 23 pour le gène *UL23* et 6 pour le gène *UL30* ; ainsi que 19 nouvelles mutations dont l'impact sur le phénotype viral est à élucider (11 pour l'*UL23* et 8 pour l'*UL5*). La mutation L242P du gène *UL23* est désormais à incrémenter à la base de données comme étant une mutation conduisant à la résistance de l'HSV1 à l'ACV.

La résistance de l'HSV1 à l'ACV est attribuée à une mutation du gène *UL23* dans 95% des cas, les 5% restant concernant le gène *UL30* (15). Une étude récente a rapporté une implication bien plus importante de l'ADNpol mutée avec 45% des souches résistantes (19). Toutefois, le faible nombre de souches résistantes étudiées (11 isolats) vient sans aucun doute biaiser ce chiffre. Dans notre étude, 85% des cas de résistance ont été induits par mutation du gène *UL23* et 10% pour le gène *UL30*, ce qui est en concordance avec les données publiées (15). Le séquençage du gène *UL23* a mis

en évidence une fréquence de 2,69 mutations de polymorphisme par souche, alors que le gène *UL30* en présentait 0,83. Ces données confirment le fait que le gène *UL30* est hautement conservé en raison de son rôle crucial dans la réplication virale. Néanmoins, ce polymorphisme du gène *UL30* est nettement moins élevé que celui déjà rapporté dans la littérature (67). Ceci peut être expliqué par le fait que les amorces de PCR utilisées (cf. Annexe) pour l'amplification du gène *UL30* ont été conçues pour cibler les zones hautement conservées et ainsi détecter préférentiellement les mutations de résistance. De nombreuses mutations de polymorphisme non précédemment décrites étaient donc potentiellement présentes sur ces zones non séquencées. Enfin, en raison de la longueur importante du gène *UL30* (environ 3 fois plus long que le gène *UL23*) et afin de maintenir une fidélité importante de la polymérase lors de l'amplification, le gène a été amplifié en deux fragments. La sensibilité de la PCR *UL30* s'est avérée moins bonne que pour l'amplification de l'*UL23* et nous n'avons pas pu obtenir de séquence pour 53 spécimens, soit une sensibilité technique de 74%. Comparativement, la sensibilité de l'amplification de l'*UL5* était de 88,9% et celle de l'*UL23* proche de 100%. Une étude prospective permettrait de réduire certains écueils techniques comme les souches manquantes ou non amplifiables. Nos observations sur le gène *UL5*, quant à elles, ont démontrées un polymorphisme très fréquent mais touchant très peu de sites différents. Bien que nous n'ayons séquencé qu'un nombre limité de souches pour ce gène, ces observations confirment les données de l'une des rares études existante explorant ce gène (104). Des études à large échelle doivent encore être menées pour améliorer les connaissances du gène *UL5*.

Une stricte corrélation entre phénotype et génotype ne peut donc pas être systématiquement observée. Ceci est en partie expliqué par plusieurs limitations : certains aléas techniques comme un manque de sensibilité lors de l'amplification, un inoculum viral trop faible pour permettre une culture appropriée, une base de données des mutations incomplète du fait du manque d'études, la présence potentielle de sous-populations virales indétectables ou encore la mise en évidence d'une mutation dont le rôle n'a pas été éclairci. Ainsi, une de nos souches présentait un phénotype de résistance au FOS (EC50 = 638 μ M) mais le séquençage du gène *UL30* ne mettait aucune mutation de résistance connue en évidence. Toutefois deux

mutations considérées dans la littérature comme étant du polymorphisme naturel, D672N et N711K étaient présentes (67). Cependant, la substitution N711K est située dans une région conservée du gène, la région II (694-736) où se concentre une majorité de mutations de résistance. La mutation D672N est quant à elle, publiée dans un autre travail comme étant associée à la résistance virale (105). Leur impact sur la sensibilité aux antiviraux doit donc être clairement établi, car il est très probable qu'au moins l'une d'entre elles entraîne une résistance aux FOS.

La substitution M322L nouvellement décrite ici sur le gène *UL23*, située en dehors des régions conservées, a été observée au sein de deux souches sensibles à l'ACV (EC50 <0,8 µM pour les deux). Pourtant, à cette localisation, une mutation M322K conduisant à un phénotype de résistance à l'ACV a été décrite (106). Toutefois, cette mutation a uniquement été obtenue après sélection *in vitro* et ne fait pas partie des mutations confirmées selon la dernière revue (103). Des divergences physico-chimiques entre la leucine et la lysine pourraient expliquer ces différences : notamment, le pH isoélectrique de la leucine est de 5.98 et de 9.59 pour la lysine ; la leucine est de plus l'un des acides aminés les plus hydrophobes quand la lysine est à l'opposé l'un des moins hydrophobes. Ces modifications d'AA pourraient donc entraîner conformation tridimensionnelle modifiée de la thymidine kinase ayant des impacts sur sa fonctionnalité.

Lorsque des mutations de signification indéterminée sont détectées, l'interprétation du séquençage devient difficile. Toutes les mutations de signification indéterminée décrites dans notre article (11 sur *UL23* et 8 sur *UL5*) nécessitent donc une caractérisation afin d'élucider leur impact sur le phénotype d'HSV1. Des explorations par mutagenèse dirigée peuvent par exemple être envisagées (107). Parmi celles découvertes sur le gène *UL23*, E225L est située près du site conservé 216-222 et Y248H près de la mutation G246V connue comme induisant une résistance virale. La mutation H151N n'est sans doute pas impliquée dans la résistance aux antiviraux, car à la même position la mutation H151Y a été déjà décrite comme polymorphisme naturel, la tyrosine et l'asparagine ayant des caractéristiques physico-chimiques proches (polaire et non chargé à pH neutre). Les mutations A37S et Q270R sont en toute vraisemblance liées à du polymorphisme naturel car A37S est adjacente à E36K précédemment signalé comme polymorphisme et Q270R est situé dans une

zone ou de très nombreuses mutations de polymorphisme sont décrites. Les autres mutations de signification indéterminée détectées (V70M, P155Q, N303Y et M372I) n'étant situées ni dans une zone hautement conservée, ni dans une zone riche en homopolymères, ni dans une zone à haute fréquence de polymorphisme, aucune spéculation sur leur rôle ne peut être émise. Concernant le gène *UL5*, l'impact des mutations de signification inconnue ne peut être établi en raison de l'absence de données phénotypiques réalisées avec les inhibiteurs de l'hélicase primase. Néanmoins, aucune des 8 nouvelles mutations n'était située dans la région du motif IV (acides aminés 341 à 356), qui est la zone où toutes les mutations conférant une résistance aux inhibiteurs de l'hélicase primase ont été précédemment décrites (104). De plus, aucun patient de notre étude n'ayant été traité par inhibiteur de l'HP, aucune pression de sélection n'a été imposée sur nos souches. Ces 8 mutations sont donc très probablement liées au polymorphisme de l'*UL5*, en particulier pour les mutations V600A et V602T adjacentes à M601I détectée dans 6 souches de notre étude et déjà publiée comme relative au polymorphisme naturel de l'HSV1.

Dans les services d'oncohématologie, les protocoles pour le traitement d'une infection à herpès résistant suivent des recommandations et des algorithmes de prise en charge de la littérature (103). L'ASBMT (American Society for Blood and Marrow Transplantation) recommande une dose d'ACV de 400mg d'ACV per os par jour pendant les 100 premiers jours post-greffe pour prévenir l'apparition d'un HSV1 résistant. En France, la Haute Autorité de Santé a émis des recommandations quant à la prévention des infections herpétiques materno-fœtales mais aucune concernant les patients greffés de CSH. Une harmonisation des pratiques thérapeutique pourrait être également requise. En cas de suspicion clinique d'HSV résistant à l'ACV, l'étape initiale consiste alors à administrer des doses élevées d'ACV en intraveineux (10 mg/kg toutes les 8 heures en adaptant en selon la fonction rénale). En l'absence d'amélioration après 7 jours, un switch thérapeutique vers le FOS en intraveineux est proposé (40 mg/kg toutes les 8 heures) avec une adaptation posologique selon la fonction rénale et une surveillance stricte de son état sous traitement. Parallèlement, les isolats cliniques provenant des lésions doivent être soumis à des tests de sensibilité phénotypique et/ou génotypique. S'il n'y a toujours pas d'amélioration de la symptomatologie herpétique après 7 à 10 jours sous traitement par FOS, deux alternatives sont

proposées : une perfusion continue d'ACV à dose élevée (2 mg/kg/heure) ou des perfusions de CDV (5 mg/kg une fois par semaine pendant 3 à 4 semaines). Par rapport à cet algorithme, il aurait été intéressant de tester le CDV dans notre étude, notamment sur nos souches résistantes au FOS.

Pour conclure, cette étude nous a permis de fournir de nouvelles informations concernant le polymorphisme naturel des gènes *UL23*, *UL30* et *UL5* de l'HSV1. Ces données vont permettre à l'avenir de faciliter le travail des virologues lors de l'interprétation des séquences et également d'optimiser les analyses de séquences lorsqu'une technique automatisée de détection de la résistance sera mise en place. Une nouvelle mutation du gène *UL23*, la mutation L242P est désormais à incrémenter à la base de données des mutations conférant une résistance à l'ACV. Des explorations sont encore à mener pour objectiver l'effet phénotypique précis de cette mutation sur la thymidine kinase virale (TK déficient, TK altérée ou TK faible producteur). Nos investigations sur le gène *UL5* offrent de premiers éclaircissements concernant le complexe hélicase primase, cible thérapeutique d'une nouvelle classe d'antiviraux prometteuse pour le traitement des infections à HSV. A l'instar de l'outil de recherche informatisé concernant le CMV (108), une mise en commun des résultats des différents laboratoires travaillant sur l'HSV1 est à réfléchir. En effet, l'établissement d'une base de données robuste, complète et surtout évolutive permettra un accès facilité à plus de laboratoires. Elle sera également dans le futur, un prérequis primordial lors de l'instauration à large échelle de techniques automatisées de dépistage de la résistance. L'avènement de nouvelles techniques de séquençage telle que le séquençage haut débit impose une vaste connaissance du génome des microorganismes d'intérêt biomédicaux pour permettre d'apprécier l'utilité de ces avancées techniques. Les tests de sensibilité aux antiviraux deviendront d'autant plus importants lorsque de nouveaux médicaments seront disponibles, offrant un plus large choix d'agents antiviraux, notamment pour traiter les infections à HSV.

CONCLUSIONS

La résistance à l'aciclovir est une problématique médicale importante chez les patients greffés de cellules souches hématopoïétiques. Les alternatives thérapeutiques en cas de résistance à l'aciclovir restent encore restreintes. Néanmoins, une nouvelle classe thérapeutique, les inhibiteurs de l'hélicase primase, pourrait être ajoutée à l'arsenal thérapeutique. Actuellement, la détection de la résistance aux antiviraux par les techniques génotypiques peut encore se heurter au manque de connaissances concernant le polymorphisme des gènes d'intérêt impliqués dans les mécanismes d'action des antiviraux. La constitution d'une base de données la plus exhaustive possible des mutations concernant à la fois la résistance et le polymorphisme de ces gènes, est le prérequis essentiel pour rendre cette approche génotypique performante.

Notre étude rétrospective a porté sur 239 HSV1 détectés chez les patients hospitalisés dans les services d'oncohématologie au CHU de Lyon durant la période de 2012 à 2016. La sensibilité à l'aciclovir et au foscarnet a été déterminée phénotypiquement. L'analyse génotypique a été réalisée par amplification et séquençage des gènes *UL23*, *UL30* et *UL5* codant respectivement la thymidine kinase, l'ADN polymérase et l'hélicase primase. L'évolution de la fréquence de la résistance aux antiviraux a également été étudiée de façon statistique.

L'analyse du gène *UL23* a révélée 23 nouvelles substitutions de polymorphisme, une nouvelle mutation, la L242P, à l'origine d'une résistance à l'ACV, ainsi que 11 mutations de signification indéterminée. L'analyse du gène *UL30* a révélée 6 nouvelles mutations de polymorphisme ; enfin, l'analyse du gène *UL5* a révélée 8 nouvelles substitutions dont leur rôle en termes d'acquisition de résistance aux inhibiteurs de l'hélicase-primase reste à investiguer.

La prévalence globale de la résistance à l'aciclovir observée dans notre étude était de 16,9% sans augmentation significative au cours de la période étudiée. Chez les patients greffés de cellules souches hématopoïétiques, nous rapportons une fréquence de 32.9% de résistance à l'aciclovir et de 3.7% de résistance au foscarnet, en concordance avec les résultats d'études préalablement publiées.

Nos résultats permettent ainsi d'élargir le nombre de substitutions connues pour les trois gènes d'intérêts concernant la résistance aux antiviraux et de réévaluer la prévalence des phénomènes de résistance de l'HSV1 dans les services cliniques d'oncohématologie. Cela permettra de rendre accessible les techniques génotypiques de détection de la résistance aux antiviraux par un plus large nombre de laboratoires et de faciliter le développement de techniques de séquençage haut-débit.

ANNEXES

Annexe 1 : Amorces utilisées pour l'analyse du gène *UL23*

Amorce	Fonction	Séquence 5'→3'
TKF	Amplification	GATCTTGGTGGCGTGAACTCC
TKR	Amplification	GGTTCCTCCGGTATTGTCTCC
TKB	Séquençage	CGATACCTTATGGGCAGCAT
TKC1	Séquençage	GGGTCATGCTGCCATAAGGTA

Annexe 2 : Amorces utilisées pour l'analyse du gène *UL30*

Amorce	Fonction	Séquence 5'→3'
LP6	Amplification	GAGCACGTCTCTCTGTTTTTC
RP6	Amplification	CCGAGTTACACACGACCTTG
LP7	Amplification	GTATTAACATCACCCGCACC
RP7	Amplification	CGGAGACGGTATCGTCGTAA
LP8	Séquençage	TGTAACCTCGGTGTACGGGTTTC
RP8	Séquençage	ATGCAGTACTCGCCGATCAC

Annexe 3 : Amorces utilisées pour l'analyse du gène *UL5*

Amorce	Fonction	Séquence 5'→3'
33F	Amplification & séquençage	ACCTTTACCCAGCCGTCTCT
336F	Séquençage	ACGTGGCGGCCTTAGAGT
844F	Séquençage	GCAGCAACGTGATCGTCAT
1628R	Amplification & séquençage	CGTCCCACTAAACCCAAAAA
1152R	Séquençage	GCACCTTCATGAGGTTACCG
659R	Séquençage	CGTGAGGTCCAAAATCACCT
1351F	Amplification & séquençage	TACCTGAAGGTGACCCGTGA
1851F	Séquençage	GGAGAACTAACGGCGGAGA
2318F	Séquençage	ACACACGGGTGTTTGCCTTT
2160R	Séquençage	TAAAGGGGGCGACTTCAAAT
2702R	Séquençage	GCGCAGAGCCGATAGTATGT
2898R	Amplification & séquençage	TCAAAAACATGCACCACCTG



Comité d'Éthique du CHU de Lyon

Président :
Jean-François GUÉRIN

Groupement Hospitalier Est
Hôpital Femme Mère Enfant
Service de médecine de la reproduction
59 boulevard Pinel
69677 Bron
Tél : 04 72 12 95 75

Mail : hcl.comite-ethique@chu-lyon.fr

Bureau

Patrick Carlioz
François Chapuis
Brigitte Comte
Fabienne Doiret
Nathalie Brousse (conseillère juridique)

Lyon le 17/10/18

Dr Emilie Frobert
Laboratoire de virologie
Hôpital de la Croix Rousse
Chu de Lyon

Madame et chère consoeur

Vous avez soumis pour avis au Comité d'Éthique, le protocole intitulé :

«Caractérisation des gènes *UL23*, *UL30* et *UL5* de virus HSV1 isolés à partir de patients hospitalisés en hématologie clinique, en lien avec l'acquisition de mutations de résistance aux antiviraux «

Le Comité d'Éthique a examiné votre projet et a donné un **avis favorable** pour sa réalisation, dans la mesure où il s'agit d'une étude non interventionnelle, concernant des données cliniques et biologiques déjà existantes, avec des prélèvements stockés au laboratoire, et qui n'implique pas directement les patients.

Cette étude ne soulève pas de problème éthique.

En vous remerciant d'avoir sollicité le Comité d'Éthique, je vous prie de croire, Madame et chère consoeur, à l'assurance de mes sentiments les meilleurs.

Professeur J.F. GUERIN
Président du Comité d'éthique

ISPB - FACULTE DE PHARMACIE

CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR: M. LABRUNIE Thibault

La résistance à l'aciclovir chez les patients greffés de cellules souches hématopoïétiques est une problématique médicale importante et émergente. Les alternatives thérapeutiques en cas de résistance que sont le foscarnet et le cidofovir peuvent également être touchés. Les inhibiteurs de l'hélicase primase sont une nouvelle classe thérapeutique prometteuse dans le traitement des infections à virus résistant. Il est nécessaire d'améliorer les connaissances pour le développement des techniques de détection génotypique de la résistance. Pour permettre leur essor, le pré-requis essentiel est la constitution d'une base de données de mutations la plus exhaustive possible.

Notre étude rétrospective a portée sur 239 HSV1 détectés chez les patients hospitalisés dans les services d'onco-hématologie durant la période allant de 2012 à 2016. La sensibilité à l'aciclovir et au foscarnet a été déterminée phénotypiquement. L'analyse génotypique a été réalisée par amplification et séquençage des gènes *UL23*, *UL30* et *UL5* codant respectivement pour la thymidine kinase, l'ADN polymérase et l'hélicase primase.

L'analyse du gène *UL23* a révélée 23 nouvelles substitutions de polymorphisme, une mutation L242P non précédemment rapportée comme étant à l'origine d'une résistance, ainsi que 11 mutations de signification indéterminée. L'analyse du gène *UL30* a révélée 6 nouvelles mutations de polymorphisme naturel et celle du gène *UL5* a révélée 8 nouvelles substitutions dont le rôle en termes d'acquisition de résistance reste à investiguer.

La prévalence globale de la résistance à l'aciclovir observée dans notre étude était de 16,9% sans élévation significative au cours de la période étudiée. Chez les patients greffés de cellules souches hématopoïétiques nous rapportons une prévalence de 32.9% et 3.7% de résistance à l'aciclovir et au foscarnet respectivement.

Nos résultats permettent ainsi d'élargir le nombre de substitution connue pour les trois gènes d'intérêts concernant la résistance aux antiviraux et de réévaluer la prévalence des phénomènes de résistance de l'HSV1 dans les services cliniques d'oncohématologie.

Le Président de la thèse,

Nom :

Pr Florence MORFIN

Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 18/10/2018

Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie



Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,



Professeure C. VINCIGUERRA

REFERENCES

1. Looker KJ, Magaret AS, May MT, Turner KME, Vickerman P, Gottlieb SL, et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. *PLOS ONE*. 2015;10(10):e0140765.
2. Looker KJ, Magaret AS, Turner KME, Vickerman P, Gottlieb SL, Newman LM. Global Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 2 Infections in 2012. *PLOS ONE*. 2015;10(1):e114989.
3. Malkin JE, Morand P, Malvy D, Ly TD, Chanzy B, de Labareyre C, et al. Seroprevalence of HSV-1 and HSV-2 infection in the general French population. *Sex Transm Infect*. 2002;78(3):201-3.
4. Parris DS, Harrington JE. Herpes simplex virus variants resistant to high concentrations of acyclovir exist in clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1982;22(1):71-7.
5. Ramaswamy M, Waters A, Smith C, Hainsworth E, Hardy G, Johnson M, et al. Reconstitution of Herpes Simplex Virus-Specific T Cell Immunity in HIV-Infected Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. *The Journal of Infectious Diseases*. 2007;195(3):410-5.
6. Bacon TH, Boon RJ, Schultz M, Hodges-Savola C. Surveillance for Antiviral-Agent-Resistant Herpes Simplex Virus in the General Population with Recurrent Herpes Labialis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(9):3042-4.
7. Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT, Sutton D. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(1):114-28.
8. Frobert E, Burrel S, Ducastelle-Lepretre S, Billaud G, Ader F, Casalegno J-S, et al. Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: an update from a ten-year survey in France. *Antiviral Res*. 2014;111:36-41.
9. Duan R, Vries D, D R, Osterhaus ADME, Remeijer L, Verjans GMGM. Acyclovir-Resistant Corneal HSV-1 Isolates from Patients with Herpetic Keratitis. *J Infect Dis*. 2008;198(5):659-63.
10. Kriesel JD, Spruance SL, Prichard M, Parker JN, Kern ER. Recurrent antiviral-resistant genital herpes in an immunocompetent patient. *J Infect Dis*. 2005;192(1):156-61.
11. Stránská R, Schuurman R, Nienhuis E, Goedegebuure IW, Polman M, Weel JF, et al. Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the Netherlands: prevalence and characterization. *J Clin Virol*. 2005;32(1):7-18.
12. Danve-Szatanek C, Aymard M, Thouvenot D, Morfin F, Agius G, Bertin I, et al. Surveillance Network for Herpes Simplex Virus Resistance to Antiviral Drugs: 3-Year Follow-Up. *J Clin Microbiol*. 2004;42(1):242-9.
13. Chen Y, Scieux C, Garrait V, Socié G, Rocha V, Molina J-M, et al. Resistant Herpes Simplex Virus Type 1 Infection: An Emerging Concern after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Clin Infect Dis*. 1 2000;31(4):927-35.

14. 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(1):290-3.
15. Morfin F, Thouvenot D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J Clin Virol.* 2003;26(1):29-37.
16. Langston AA, Redei I, Caliendo AM, Somani J, Hutcherson D, Lonial S, et al. Development of drug-resistant herpes simplex virus infection after haploidentical hematopoietic progenitor cell transplantation. *Blood.* 2002;99(3):1085-8.
17. 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(6):2055-8.
18. Imanguli M, Alevizos I, Brown R, Pavletic S, Atkinson J. Oral graft-versus-host disease. *Oral Dis.* 2008;14(5):396-412.
19. Kakiuchi S, Tsuji M, Nishimura H, Yoshikawa T, Wang L, Takayama-Ito M, et al. Association of the Emergence of Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus Type 1 With Prognosis in Hematopoietic Stem Cell Transplantation Patients. *J Infect Dis.* 2017;215(6):865-73.
20. Safrin S, Kemmerly S, Plotkin B, Smith T, Weissbach N, De Veranez D, et al. Foscarnet-resistant herpes simplex virus infection in patients with AIDS. *J Infect Dis.* 1994;169(1):193-6.
21. Bestman-Smith J, Boivin G. Herpes simplex virus isolates with reduced adefovir susceptibility selected in vivo by foscarnet therapy. *Journal of medical virology.* 2002;67:88-91.
22. Wyles DL, Patel A, Madinger N, Bessesen M, Krause PR, Weinberg A. Development of herpes simplex virus disease in patients who are receiving cidofovir. *Clin Infect Dis.* 2005;41(5):676-80.
23. Berrington WR, Jerome KR, Cook L, Wald A, Corey L, Casper C. Clinical Correlates of Herpes Simplex Virus Viremia Among Hospitalized Adults. *Clin Infect Dis.* 2009;49(9):1295-301.
24. Kennedy PGE, Steiner I. Recent issues in herpes simplex encephalitis. *J Neurovirol.* 2013;19(4):346-50.
25. Toriyama K, Inoue T, Suzuki T, Kobayashi T, Ohashi Y. Necrotizing keratitis caused by acyclovir-resistant herpes simplex virus. *Case Rep Ophthalmol.* 2014;5(3):325-8.
26. Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B. Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis.* mars 1998;26(3):541-53.
27. Severson JL, Tying SK. Relation between herpes simplex viruses and human immunodeficiency virus infections. *Arch Dermatol.* 1999;135(11):1393-7.
28. Martinez V, Bricaire F, Caumes E. Hépatites à Herpes simplex virus chez l'adulte. *Virologie.* 2004;8(6):445-9.
29. Ljungman P, Ellis MN, Hackman RC, Shepp DH, Meyers JD. Acyclovir-resistant herpes simplex virus causing pneumonia after marrow transplantation. *J Infect Dis.* 1990;162(1):244-8.

30. Côté-Daigneault J, Carrier FM, Toledano K, Wartelle-Bladu C, Willems B. Herpes simplex hepatitis after liver transplantation: case report and literature review. *Transpl Infect Dis.* 2014;16(1):130-4.
31. Gomez RS, Carneiro MA, Souza LN, Victória JMN, Azevedo WM de, Marco LD, et al. Oral recurrent human herpes virus infection and bone marrow transplantation survival. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology.* 2001;91(5):552-6.
32. Astuto M, Palermo CI, Costanzo CM, Ettore GC, Palmucci S, Franchina C, et al. Fatal pulmonary disease and encephalic complication in a man with HSV-1 Infection: a case report. *J Clin Virol.* 2014;59(1):59-62.
33. Luiz Sena Guimaraes A, Gomes C, Marques da Silva L, de Fatima Correia-Silva J, Maria Neto Victoria J, Gomez R, et al. Association between oral HSV-1 and survival in allogeneic hematopoietic stem cell transplanted patients. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal.* 2009;14:62-8.
34. Ariza-Heredia EJ, Chemaly RF, Shahani LR, Jang Y, Champlin RE, Mulanovich VE. Delay of alternative antiviral therapy and poor outcomes of acyclovir-resistant herpes simplex virus infections in recipients of allogeneic stem cell transplant - a retrospective study. *Transpl Int.* 2018;31(6):639-48.
35. Vere Hodge RA, Field HJ. Antiviral agents for herpes simplex virus. *Adv Pharmacol.* 2013;67:1-38.
36. Topalis D, Gillemot S, Snoeck R, Andrei G. Distribution and effects of amino acid changes in drug-resistant α and β herpesviruses DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(20):9530-54.
37. Erard V, Wald A, Corey L, Leisenring WM, Boeckh M. Use of long-term suppressive acyclovir after hematopoietic stem-cell transplantation: impact on herpes simplex virus (HSV) disease and drug-resistant HSV disease. *J Infect Dis.* 2007;196(2):266-70.
38. Eisen D, Essell J, Broun ER, Sigmund D, DeVoe M. Clinical utility of oral valacyclovir compared with oral acyclovir for the prevention of herpes simplex virus mucositis following autologous bone marrow transplantation or stem cell rescue therapy. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31(1):51-5.
39. Ghislanzoni M, Cusini M, Zerboni R, Alessi E. Chronic hypertrophic acyclovir-resistant genital herpes treated with topical cidofovir and with topical foscarnet at recurrence in an HIV-positive man. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2006;20(7):887-9.
40. Muluneh B, Dean A, Armistead P, Khan T. Successful clearance of cutaneous acyclovir-resistant, foscarnet-refractory herpes virus lesions with topical cidofovir in an allogeneic hematopoietic stem cell transplant patient. *J Oncol Pharm Pract.* 2013;19(2):181-5.
41. Epstein JB, Gharapetian S, Rejali AR, Zabner R, Lill M, Tzachanis D. Complex management of resistant oral herpes simplex virus infection following hematopoietic stem cell transplantation: potential role of topical cidofovir. *Support Care Cancer.* 2016;24(8):3603-6.
42. Bryant P, Sasadeusz J, Carapetis J, Waters K, Curtis N. Successful treatment of foscarnet-resistant herpes simplex stomatitis with intravenous cidofovir in a child. *Pediatr Infect Dis J.* nov 2001;20(11):1083-6.

43. Deray G, Martinez F, Katlama C, Levaltier B, Beaufiles H, Danis M, et al. Foscarnet nephrotoxicity: mechanism, incidence and prevention. *Am J Nephrol*. 1989;9(4):316-21.
44. Vandercam B, Moreau M, Goffin E, Marot JC, Cosyns JP, Jadoul M. Cidofovir-induced end-stage renal failure. *Clin Infect Dis*. 1999;29(4):948-9.
45. Saunders IM, Lahoti A, Chemaly RF, Trevino C, Westmoreland M, Hosing C. Topical cidofovir-induced acute kidney injury in two severely immunocompromised patients with refractory multidrug-resistant herpes simplex virus infections. *J Oncol Pharm Pract*. 2016;22(2):325-31.
46. Aldern KA, Ciesla SL, Winegarden KL, Hostetler KY. Increased antiviral activity of 1-O-hexadecyloxypropyl-[2-(14)C]cidofovir in MRC-5 human lung fibroblasts is explained by unique cellular uptake and metabolism. *Mol Pharmacol*. 2003;63(3):678-81.
47. Williams-Aziz SL, Hartline CB, Harden EA, Daily SL, Prichard MN, Kushner NL, et al. Comparative activities of lipid esters of cidofovir and cyclic cidofovir against replication of herpesviruses in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(9):3724-33.
48. Quenelle DC, Lampert B, Collins DJ, Rice TL, Painter GR, Kern ER. Efficacy of CMX001 against herpes simplex virus infections in mice and correlations with drug distribution studies. *J Infect Dis*. 2010;202(10):1492-9.
49. Prichard MN, Kern ER, Hartline CB, Lanier ER, Quenelle DC. CMX001 potentiates the efficacy of acyclovir in herpes simplex virus infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(10):4728-34.
50. Weller SK, Kuchta RD. The DNA helicase-primase complex as a target for herpes viral infection. *Expert Opin Ther Targets*. 2013;17(10):1119-32.
51. Tyring S, Wald A, Zadeikis N, Dhadda S, Takenouchi K, Rorig R. ASP2151 for the treatment of genital herpes: a randomized, double-blind, placebo- and valacyclovir-controlled, dose-finding study. *J Infect Dis*. 2012;205(7):1100-10.
52. Biswas S, Smith C, Field HJ. Detection of HSV-1 variants highly resistant to the helicase-primase inhibitor BAY 57-1293 at high frequency in 2 of 10 recent clinical isolates of HSV-1. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(2):274-9.
53. Chono K, Katsumata K, Kontani T, Kobayashi M, Sudo K, Yokota T, et al. ASP2151, a novel helicase-primase inhibitor, possesses antiviral activity against varicella-zoster virus and herpes simplex virus types 1 and 2. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(8):1733-41.
54. Quenelle DC, Birkmann A, Goldner T, Pfaff T, Zimmermann H, Bonsmann S, et al. Efficacy of pritelivir and acyclovir in the treatment of herpes simplex virus infections in a mouse model of herpes simplex encephalitis. *Antiviral Res*. 2018;149:1-6.
55. Ohtsu Y, Susaki Y, Noguchi K. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of the Novel Helicase-Primase Inhibitor, Amenamevir (ASP2151), in Rodents. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2018;
56. Kleymann G, Fischer R, Betz UAK, Hendrix M, Bender W, Schneider U, et al. New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease. *Nat Med*. 2002;8(4):392-8.

57. James SH, Prichard MN. Current and future therapies for herpes simplex virus infections: mechanism of action and drug resistance. *Curr Opin Virol.* 2014;8:54-61.
58. Marcocci ME, Amatore D, Villa S, Casciaro B, Aimola P, Franci G, et al. The Amphibian Antimicrobial Peptide Temporin B Inhibits In Vitro Herpes Simplex Virus 1 Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(5).
59. Jaishankar D, Yakoub AM, Yadavalli T, Agelidis A, Thakkar N, Hadigal S, et al. An off-target effect of BX795 blocks herpes simplex virus type 1 infection of the eye. *Sci Transl Med.* 2018;10(428).
60. Zinser E, Krawczyk A, Mühl-Zürbes P, Aufderhorst U, Draßner C, Stich L, et al. A new promising candidate to overcome drug resistant herpes simplex virus infections. *Antiviral Res.* 2018;149:202-10.
61. Kalu NN, Desai PJ, Shirley CM, Gibson W, Dennis PA, Ambinder RF. Nelfinavir inhibits maturation and export of herpes simplex virus 1. *J Virol.* 2014;88(10):5455-61.
62. Piret J, Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(2):459-72.
63. Piret J, Boivin G. Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus. *Rev Med Virol.* 2014;24(3):186-218.
64. Gentry GA. Viral thymidine kinases and their relatives. *Pharmacol Ther.* 1992;54(3):319-55.
65. Pilger BD, Perozzo R, Alber F, Wurth C, Folkers G, Scapozza L. Substrate diversity of herpes simplex virus thymidine kinase. Impact Of the kinematics of the enzyme. *J Biol Chem.* 1999;274(45):31967-73.
66. Sauerbrei A, Bohn-Wippert K, Kaspar M, Krumbholz A, Karrasch M, Zell R. Database on natural polymorphisms and resistance-related non-synonymous mutations in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus types 1 and 2. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(1):6-16.
67. Burrell S, Deback C, Agut H, Boutolleau D. Genotypic characterization of UL23 thymidine kinase and UL30 DNA polymerase of clinical isolates of herpes simplex virus: natural polymorphism and mutations associated with resistance to antivirals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(11):4833-42.
68. Brown JC. High G+C Content of Herpes Simplex Virus DNA: Proposed Role in Protection Against Retrotransposon Insertion. *Open Biochem J.* 2007;1:33-42.
69. 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(2):297-303.
70. Sasadeusz JJ, Tufaro F, Safrin S, Schubert K, Hubinette MM, Cheung PK, et al. Homopolymer mutational hot spots mediate herpes simplex virus resistance to acyclovir. *J Virol.* 1997;71(5):3872-8.
71. Larder BA, Cheng YC, Darby G. Characterization of abnormal thymidine kinases induced by drug-resistant strains of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol.* 1983;64 Pt 3:523-32.

72. L Martin J, N Ellis M, M Keller P, K Biron K, N Lehrman S, W Barry D, et al. Plaque autobiography assay for the detection and quantification of thymidine kinase deficient and thymidine kinase altered mutants of herpes simplex virus in clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1985;28:181-7.
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(2):1024-33.
74. Malartre N, Bouliou R, Falah N, Cortay JC, Lina B, Morfin F, et al. Effects of mutations on herpes simplex virus 1 thymidine kinase functionality: an in vitro assay based on detection of monophosphate forms of acyclovir and thymidine using HPLC/DAD. *Antiviral Res.* 2012;95(3):224-8.
75. Coen DM. Acyclovir-resistant, pathogenic herpesviruses. *Trends in Microbiology*. 1994;2(12):481-5.
76. van Velzen M, van Loenen FB, Meesters RJW, de Graaf M, Remeijer L, Luider TM, et al. Latent acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 in trigeminal ganglia of immunocompetent individuals. *J Infect Dis.* 2012;205(10):1539-43.
77. Besecker MI, Furness CL, Coen DM, Griffiths A. Expression of extremely low levels of thymidine kinase from an acyclovir-resistant herpes simplex virus mutant supports reactivation from latently infected mouse trigeminal ganglia. *J Virol.* 2007;81(15):8356-60.
78. Liu S, Knafels JD, Chang JS, Waszak GA, Baldwin ET, Deibel MR, et al. Crystal structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase. *J Biol Chem.* 2006;281(26):18193-200.
79. Zarrouk K, Piret J, Boivin G. Herpesvirus DNA polymerases: Structures, functions and inhibitors. *Virus Res.* 2017;234:177-92.
80. Snoeck R, Andrei G, Gérard M, Silverman A, Hedderman A, Balzarini J, et al. 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.* 1994;18(4):570-8.
81. Sacks SL. Progressive Esophagitis from Acyclovir-Resistant Herpes Simplex: Clinical Roles for DNA Polymerase Mutants and Viral Heterogeneity? *Annals of Internal Medicine.* 1989;111(11):893.
82. Bestman-Smith J, Boivin G. Drug resistance patterns of recombinant herpes simplex virus DNA polymerase mutants generated with a set of overlapping cosmids and plasmids. *J Virol.* 2003;77(14):7820-9.
83. 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(2):487-90.
84. 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(10):7791-8.
85. Saijo M, Yasuda Y, Yabe H, Kato S, Suzutani T, De Clercq E, et al. Bone marrow transplantation in a child with Wiskott-Aldrich syndrome latently infected with acyclovir-

- resistant (ACV(r)) herpes simplex virus type 1: emergence of foscarnet-resistant virus originating from the ACV(r) virus. *J Med Virol.* 2002;68(1):99-104.
86. Korovina AN, Gus'kova AA, Skoblov MI, Andronova VL, Galegov GA, Kochetkov SN, et al. [Analysis of mutations in DNA polymerase and thymidine kinase genes of herpes simplex virus clinical isolates resistant to antitherpetic drugs]. *Mol Biol (Mosk).* 2010;44(3):488-96.
 87. Andrei G, Fiten P, Froeyen M, De Clercq E, Opdenakker G, Snoeck R. DNA polymerase mutations in drug-resistant herpes simplex virus mutants determine in vivo neurovirulence and drug-enzyme interactions. *Antivir Ther (Lond).* 2007;12(5):719-32.
 88. Chono K, Katsumata K, Kontani T, Shiraki K, Suzuki H. Characterization of virus strains resistant to the herpes virus helicase-primase inhibitor ASP2151 (Amenamevir). *Biochem Pharmacol.* 2012;84(4):459-67.
 89. Field HJ, Biswas S. Antiviral drug resistance and helicase-primase inhibitors of herpes simplex virus. *Drug Resist Updat.* 2011;14(1):45-51.
 90. Weinberg A, Leary JJ, Sarisky RT, Levin MJ. Factors that affect in vitro measurement of the susceptibility of herpes simplex virus to nucleoside analogues. *J Clin Virol.* 2007;38(2):139-45.
 91. Pavić I, Hartmann A, Zimmermann A, Michel D, Hampl W, Schleyer I, et al. Flow cytometric analysis of herpes simplex virus type 1 susceptibility to acyclovir, ganciclovir, and foscarnet. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(12):2686-92.
 92. Tardif KD, Jorgensen S, Langer J, Prichard M, Schlaberg R. Simultaneous titration and phenotypic antiviral drug susceptibility testing for herpes simplex virus 1 and 2. *J Clin Virol.* 2014;61(3):382-6.
 93. Tebas P, Stabell EC, Olivo PD. Antiviral susceptibility testing with a cell line which expresses beta-galactosidase after infection with herpes simplex virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1287-91.
 94. Stránská R, van Loon AM, Polman M, Schuurman R. Application of Real-Time PCR for Determination of Antiviral Drug Susceptibility of Herpes Simplex Virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(9):2943-7.
 95. Thi TN, Deback C, Malet I, Bonnafous P, Ait-Arkoub Z, Agut H. Rapid determination of antiviral drug susceptibility of herpes simplex virus types 1 and 2 by real-time PCR. *Antiviral Res.* 2006;69(3):152-7.
 96. van der Beek MT, Claas ECJ, van der Blij-de Brouwer CS, Morfin F, Rusman LG, Kroes ACM, et al. Rapid susceptibility testing for herpes simplex virus type 1 using real-time PCR. *J Clin Virol.* 2013;56(1):19-24.
 97. Piret J, Goyette N, Boivin G. Novel Method Based on Real-Time Cell Analysis for Drug Susceptibility Testing of Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus. *J Clin Microbiol.* 2016;54(8):2120-7.
 98. Shin YK, Cai G-Y, Weinberg A, Leary JJ, Levin MJ. Frequency of Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus in Clinical Specimens and Laboratory Isolates. *J Clin Microbiol.* 2001;39(3):913-7.

99. Chin ELH, da Silva C, Hegde M. Assessment of clinical analytical sensitivity and specificity of next-generation sequencing for detection of simple and complex mutations. *BMC Genet.* 2013;14:6.
100. Fujii H, Kakiuchi S, Tsuji M, Nishimura H, Yoshikawa T, Yamada S, et al. Application of next-generation sequencing to detect acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 variants at low frequency in thymidine kinase gene of the isolates recovered from patients with hematopoietic stem cell transplantation. *J Virol Methods.* 2018;251:123-8.
101. Morfin F, Bilger K, Boucher A, Thiebaut A, Najioullah F, Bleyzac N, et al. HSV excretion after bone marrow transplantation: a 4-year survey. *J Clin Virol.* 2004;30(4):341-5.
102. Nichols WG, Boeckh M, Carter RA, Wald A, Corey L. Transferred herpes simplex virus immunity after stem-cell transplantation: clinical implications. *J Infect Dis.* 1 2003;187(5):801-8.
103. Piret J, Boivin G. Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections: diagnosis and management. *Curr Opin Infect Dis.* 2016;29(6):654-62.
104. Collot M, Rouard C, Brunet C, Agut H, Boutolleau D, Burrel S. High conservation of herpes simplex virus UL5/UL52 helicase-primase complex in the era of new antiviral therapies. *Antiviral Res.* 2016;128:1-6.
105. Sauerbrei A, Deinhardt S, Zell R, Wutzler P. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant clinical isolates of herpes simplex virus. *Antiviral Res.* 2010;86(3):246-52.
106. Bae PK, Kim JH, Kim HS, Chung IK, Paik SG, Lee C-K. Intracellular uptake of thymidine and antiherpetic drugs for thymidine kinase-deficient mutants of herpes simplex virus type 1. *Antiviral Res.* 2006;70(3):93-104.
107. Kaspar M, Bohn-Wippert K, Bellstedt P, Häfner S, Görlach M, Sauerbrei A. Stepwise characterization of non-synonymous mutations in the HSV-1 thymidine kinase gene by different functional assays. *J Virol Methods.* 2017;247:51-7.
108. Chevillotte M, von Einem J, Meier BM, Lin F-M, Kestler HA, Mertens T. A new tool linking human cytomegalovirus drug resistance mutations to resistance phenotypes. *Antiviral Res.* 2010;85(2):318-27.

L'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon I
n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les
thèses : ces opinions sont considérées comme propres à leur auteurs

LABRUNIE Thibault

Caractérisation des gènes *UL23*, *UL30* et *UL5* des virus herpes simplex type 1 détectés chez les patients des services d'onco-hématologie des Hospices Civils de Lyon

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2018, 63p

RESUME

Introduction : L'émergence de virus herpes simplex de type 1 (HSV1) résistant aux antiviraux reste une problématique majeure pour les patients immunodéprimés, en particulier dans les services d'hématologie clinique. Une base de données complète des gènes *UL23*, *UL30* et *UL5* codant respectivement pour la thymidine kinase, l'ADN polymérase et l'hélicase primase est nécessaire pour rendre fiable la détection génotypique de la résistance aux antiviraux.

Matériels et méthodes : Notre étude rétrospective a porté sur 239 HSV1 détectés chez les patients hospitalisés dans les services d'hématologie au cours de la période 2012-2016. Nous avons premièrement caractériser ces gènes d'intérêt et secondairement réévaluer la fréquence de résistance aux antiviraux de l'HSV1 chez les patients des services d'hématologie et plus particulièrement chez ceux subissant une greffe de cellules souches hématopoïétiques.

Résultats : Cette étude a confirmé une prévalence élevée, avec plus de 32% de cas de virus HSV1 résistant chez les adultes greffés de cellules souche hématopoïétiques, sans évolution significative au cours de la période d'étude. De plus, la présente étude fournit des informations supplémentaires sur le polymorphisme naturel de l'HSV1 avec 29 substitutions nouvellement décrites, 23 pour l'*UL23* et 6 pour l'*UL30*. Nous rapportons ici également 19 nouvelles mutations, 11 pour l'*UL23* et 8 pour l'*UL5* pour lesquelles l'impact sur le phénotype de l'HSV1 doit encore être exploré. Par ailleurs, une nouvelle substitution de l'*UL23* doit être ajoutée à la base de données des mutations conduisant à la résistance à l'aciclovir.

Conclusion : Une telle caractérisation des gènes impliqués dans la résistance aux antiviraux est nécessaire pour augmenter le nombre de laboratoires de virologie capables de détecter la résistance des virus herpes au moyen d'une approche génotypique.

MOTS CLES

Herpes simplex virus, résistance virale, greffe de cellules souches hématopoïétiques, thymidine kinase, ADN polymérase, hélicase primase

JURY

Mme MORFIN SHERPA Florence, Professeur
M. LINA Bruno, Professeur
Mme FROBERT Emilie, Maître de Conférences
Mme FOSSARD Gaëlle, Assistante Chef de Clinique

DATE DE SOUTENANCE

Mardi 30 octobre 2018

ADRESSE DE L'AUTEUR

94, avenue de l'Europe – 69008 LYON