

**Université de Limoges**

**ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)**

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

Thèse pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Limoges**  
Immunologie, oncologie, inflammation et infectiologie

Présentée et soutenue par  
**Chloé Jacquet**

Le 20 décembre 2019

**Evaluation du potentiel antiviral de nouvelles  
molécules dans des modèles cellulaires et  
tissulaires d'infection à cytomégalovirus humain**

Thèse dirigée par le Pr Sophie ALAIN et le Dr Sébastien HANTZ

**JURY :**

Président du jury  
Pr. Jacques IZOPET

Rapporteurs  
Pr. Natacha TEISSIER, Inserm · U1141, Hôpital Robert Debré, PU-PH (HDR)  
Pr. Jacques IZOPET, CPTP Inserm, Toulouse, PU (HDR)

Examineurs  
Pr. Olivier PICONE, Hôpitaux Universitaires Paris Nord Val de Seine, PU-PH (HDR)  
Dr. Pierre SZEPETOWSKI, INMED Inserm, Université Aix-Marseille, PhD (HDR)

Pr. Sophie ALAIN, Inserm 1092, CHU Dupuytren, CNR herpesvirus, Limoges, PU-PH  
Dr. Sébastien HANTZ, Inserm 1092, CHU Dupuytren, CNR herpesvirus, Limoges, MCU-PH





*« A virus is not just DNA; a virus is also package up, covered over with a series of proteins in a nice, elegant, well-compacted form.»*  
Francis Collins





## Remerciements

---

Je tiens à remercier tout d'abord les Pr. Natacha TEISSIER et Pr. Jacques IZOPET qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie aussi le Pr Olivier PICONE ainsi que Dr. Pierre SZEPETOWSKI d'avoir accepté avec enthousiasme d'être examinateurs dans ce jury de thèse.

Je souhaite aussi remercier ma co-directrice de thèse, le Pr. Sophie ALAIN pour m'avoir donné sa confiance et accepté que je poursuive en thèse au sein de l'équipe « Viro ». J'ai beaucoup grandi au cours de ces trois ans de thèse autant professionnellement que personnellement. Merci de votre bienveillance et de m'avoir fait confiance pour la conduite de certains projets. Vous avez toute ma gratitude.

Je poursuis ces remerciements en remerciant le Dr. Sébastien HANTZ. Merci d'avoir accepté de co-encadrer ce travail de thèse. Merci pour toutes les discussions scientifiques et moins scientifiques que nous avons eues. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite avec ton HDR en poche !

Je tiens aussi à remercier le Pr Marie-Cécile PLOY pour m'avoir accueilli au sein de l'unité Inserm UMR 1092 de Limoges. Merci pour votre bienveillance.

In particularly, I would like to thank Pr. Manfred MARSHALL for this great collaboration. I appreciated our exchanges and I hope we could meet during my scientific career.

Je remercie le Dr. Vincent ROY pour m'avoir permis de découvrir le monde de la chimie au travers de la collaboration avec l'unité. Je vous souhaite tout le meilleur pour cette petite molécule.

Merci à Olivier SAMAMA, Guillaume RONDEAU et Alix MEREY, pour m'avoir permis de participer à l'aventure Cytotect ! Merci de la confiance accordée et de tous les fructueux échanges que nous avons eus. Cela aura été un grand plaisir de travailler avec vous tous.

Un grand merci à Séverine et Maryline, les deux supers secrétaires de cytogénétique de l'HME et merci à la Collection Biologique ainsi qu'à Pauline pour toute la paperasse que l'on t'a fait subir.



Je remercie aussi le Dr François PAPON pour sa réactivité lors du dosage de mes échantillons. Merci au Dr. CHIANEA de la plateforme Biochimie et merci au Dr. Pierre-Antoine FAYE pour toute ton aide et son implication dans le projet souris ! Promis, le papier va arriver !!

Je tiens aussi à remercier le Dr. Bertrand COURTIOUX en tant que Directeur d'Ecole Doctorale pour sa bienveillance envers les doctorants et à titre personnel pour sa confiance et son soutien jusqu'à la toute dernière minute de ces années de doctorat. Je remercie aussi mes collègues du Conseil de l'Ecole Doctorale Bio-Santé pour tout ce que l'on a pu construire pour les doctorants de Limoges. Et bien sûr je remercie Rachida pour sa bonne humeur constante ! Une pensée pour Adeline qui a toujours su aider les étudiants même s'ils sont plus pénibles les uns que les autres et reste toujours sincèrement ravie de les voir.

Je souhaite remercier tous les membres de l'équipe coté Fac et côté CHU. Vous êtes tous super et je vous remercie infiniment de m'avoir supportée durant toutes ces années. Dans le désordre :

Merci à Sophiiiiiiiiiee (je crois qu'il manque un ou deux i), tu as été une super co-bureau lors de ma rédaction de mémoire. Merci pour ton soutien de tous les instants, et surtout, le plus important : nos discussions *Outlander* !!! Merci à ma petite Claire, pour tous tes précieux conseils, ta fraîcheur et ta bonne humeur. Grâce à toi j'ai pu découvrir le formidable univers de la K-pop et surtout les K-Drama qui m'ont bien aidé à tenir le coup après ton départ. J'espère que ta vie sera aussi belle qu'une série coréenne (qui finit bien, hein !!!!!). A Margaux, vive les Charentais, et merci d'avoir supporté mes plaintes perpétuelles, le tout dans la bonne humeur et avec humour ! Je te souhaite d'être benaise le plus souvent possible. Merci à Mélissa pour ta joie de vivre, ta franchise et ton rire inimitable. A Sandra pour nos discussions de fin et d'après thèse, merci de ton inquiétude à mon sujet et de tes conseils. Elena, many thanks for your kindness et sweetness. I wish you all the best! Cécile, petite Cécile, tu es arrivée il y a peu au labo mais tu as été d'une aide et d'un grand soutien pour moi. Et parfois, caché derrière ton sérieux et toute l'expérience que tu aimes tant partager, tu gardes encore un peu de naïveté enfantine. Garde cela précieusement, c'est tellement rafraichissant ! Catalina, thank you so much for your great help in English! I keep in



mind all your kindness, your joie de vivre, and your beautiful smile! Merci à Sylvain, pour les bons gâteaux que tu nous as fait et pour tous les bons moments de rire. Oh là là, merci à Lucie pour ta joie de vivre, pour réussir à faire vivre le labo avec autant de brio ! Merci pour tout ce que tu as fait, garde le sourire, il te va si bien ! Linda, merci à toi. J'espère que tu vas continuer de chanter les comptines pour enfant encore longtemps ! Merci pour ton soutien, pour les cafés-discussions, pour les moments de rire et tout le reste ! Merci à Déborah, pour toutes les soirées cheveux, pour les grandes discussions dans ma petite 106 sac-à-dos et ta présence durant toutes ces années passées au labo. Garde le moral pour la suite, mais je sais que la guerrière qui est en toi y arrivera ! Je te souhaite une vie épanouie et remplie de longs cheveux, de vidéos plus tordues les unes que les autres, de K-pop et de joie, de tatouage de chatons et surtout d'amour et de fun. Petit Yo, merci de ta bienveillance, de ton calme reposant. Je te suis reconnaissante de tous les heureux moments passés ensemble. Je ne peux que te souhaiter d'être heureux ! Un énorme merci à Léo, pour les soirées au coin du feu chez toi, pour m'avoir permis de rencontrer ta superbe famille. Fait un bisous-câlin à tes deux filles pour moi. Cela n'a été que du bonheur, merci infiniment ! Merci à Clotilde B, cela aura été chouette de partager les derniers jours d'une thèse avec toi. Merci pour tout ! Je sais que le bonheur est déjà sur ta liste alors maintenant profite !! Merci aussi à tous les autres, à Nicolas pour son aide « souris » et autre durant ma thèse ; à Thibault et Brice, deux stagiaires hors normes et je vous en suis tellement reconnaissante ! merci à Clotilde, essaie juste de ne pas casser tout le labo ; Merci à Léa pour ta vision de la vie, for Ana and Carolina to share with us your culture and food and also to improve our English ! Merci à Camille pour sa bonne humeur, merci à Michaël, Anthony, Thomas, Elodie, Fabien, Delphine, toute l'équipe des extractions CHU et de la culture viro, les anciens et nouveaux du CNR et encore une fois à toute l'équipe pour avoir rendu ces années au sein du labo exceptionnelles.

Je souhaite remercier mes amis qui me soutiennent depuis longtemps, Amélie pour toute la tendresse (et le prêt d'appartement dans les moments de galères !) que tu m'as apportée ainsi que ta joie de vivre communicative. Christina, ces années d'études à tes côtés ont été formidables !



Et un grand merci à tous les Charentais pour leur soutien dans le dernier rush de fin de thèse,  
Cheh !

Je tiens à remercier ma famille et surtout ma Maman et ma Mamita. Je sais que vous en pouviez-plus de m'entendre râler sur la fin mais votre soutien sans faille m'a été très précieux ! (Merci le forfait téléphone en illimité !) Et le Frangin, je sais que les élans sentimentaux ce n'est pas ton truc, mais merci pour tout.

Je termine en remerciant mon Double Docteur de chéri. Vincent, merci pour tout ce que tu m'as apporté, je n'aurai pas les mots justes pour te dire combien ta présence et ton soutien de tous les instants, nos discussions et tout le reste sont chers à mes yeux. Il me faudrait une thèse entière et même plus pour te remercier. Alors merci pour ton amour ... tout simplement. Je t'aime tant.





## Table des matières

---

Table des illustrations.....	11
Table des tableaux.....	13
Index.....	14
Introduction.....	19
Chapitre I : Généralités sur le cytomégalovirus humain.....	21
I. Classification.....	21
II. Structure du cytomégalovirus.....	22
II.1. Le génome du CMVH.....	23
II.2. La capside virale.....	23
II.3. Les protéines du tégument.....	24
II.4. L'enveloppe du CMVH.....	24
III. Interaction virus et hôte.....	24
III.1. Entrée du virus dans la cellule et tropisme cellulaire.....	25
III.1.1. Tropisme cellulaire.....	25
III.1.2. Entrée du virus dans la cellule.....	26
III.2. Réponses cellulaires à l'entrée du virus dans la cellule.....	27
III.2.1. Activation de la voie NF-κB.....	28
III.2.2. Inhibition de la mort cellulaire.....	29
III.2.3. Réponse immunitaire.....	29
III.3. Réplication virale.....	31
III.3.1. Phase très précoce.....	31
III.3.2. Phase précoce.....	32
III.3.3. Phase tardive.....	33
III.4. Phase de latence du CMVH et réactivation virale.....	34
Chapitre II : Epidémiologie et physiopathologie de l'infection à CMV.....	37
I. Transmission du CMVH.....	37
II. Manifestations cliniques chez l'immunocompétent.....	38
III. Infection par CMVH chez les transplantés.....	38
III.1. Risques et manifestations cliniques de l'infection à CMVH chez les patients transplantés.....	38
III.2. Immunité des patients transplantés.....	41
III.3. Diagnostic de l'infection à CMVH chez le patient transplanté.....	41
III.3.1. Détection directe du CMVH.....	42
III.3.2. Suivi immunologique des patients transplantés.....	43
III.4. Non réponse au traitement pour les patients transplantés.....	43
Chapitre III : Infection congénitale à CMVH.....	45
I. Manifestations cliniques de l'infection congénitale à CMVH.....	46
II. Prévention de l'infection congénitale à CMVH.....	47
III. Diagnostic de l'infection congénitale à CMVH.....	48
III.1. Diagnostic de l'infection maternelle.....	48
III.2. Diagnostic de l'infection du fœtus.....	48
IV. Transmission du CMVH <i>in utero</i> .....	50
IV.1. Structure et développement du placenta.....	50



IV.2. Voies de transmission des pathogènes et rôle des syncytiotrophoblastes contre les infections.....	56
IV.3. Evolution du CMVH dans le placenta et modifications induites. ....	57
Chapitre IV : Traitements de l'infection à CMVH.....	59
I. Inhibiteurs de la polymérase virale pUL54 .....	59
I.1. Ganciclovir et valganciclovir.....	59
I.2. Cidofovir et brincidofovir.....	62
I.3. Foscarnet.....	64
I.4. Aciclovir et valaciclovir .....	65
I.5. Cyclopropavir .....	66
II. Inhibiteurs du complexe terminase.....	66
II.1. BDCRB.....	67
II.2. BAY-38-4766.....	68
II.3. Letemovir .....	68
III. Autres inhibiteurs .....	70
III.1. Maribavir.....	70
III.2. Artésunate .....	71
III.3. Sirolimus, évérolimus et leflunomide .....	72
IV. Immunoglobulines.....	73
V. Développement des vaccins anti-CMVH .....	75
VI. Conclusion sur les traitements anti-CMVH .....	77
Chapitre V : Modèles d'étude pour l'évaluation de nouvelles molécules antivirales. ....	79
I. Modèles tissulaires d'infection à CMVH .....	79
I.1. Culture de décidue.....	79
I.2. Culture de villosités placentaires.....	79
II. Modèles animaux d'infection à CMVH.....	80
II.1. La souris.....	80
II.2. Le rat .....	83
II.3. Le cobaye.....	85
II.4. Macaque rhesus.....	86
III. Conclusion sur les modèles d'infection à cytomégalovirus .....	87
Introduction à l'étude expérimentale .....	89
Partie I : Modèles d'étude pour l'infection à CMVH.....	91
I. Introduction.....	91
II. Matériels et Méthodes .....	93
II.1. Cellules.....	93
II.2. Cultures virales.....	94
II.3. Stock de virions extracellulaires .....	94
II.3.1. Production de virion extracellulaires .....	94
II.3.2. Titrage de surnageant viral .....	95
II.4. Collection Biologique de placentas .....	96
II.5. Modèle d'infection des villosités .....	97
II.6. Charge virale dans les explants .....	97
II.7. Dosage des $\beta$ -hCG pour l'évaluation de la cytotoxicité.....	98
II.8. Souris .....	99
II.9. Procédure de greffe.....	99
II.10. Essais de vascularisation.....	99



II.11.	Cinétique virale dans le greffon.....	100
II.12.	Analyses statistiques.....	101
III.	Résultats.....	103
III.1.	Culture de souches sauvages de CMVH.....	103
III.2.	Comparaison des cinétiques d'infection sur villosités de 1 <sup>er</sup> et de 3 <sup>ème</sup> trimestre 105	
III.3.	Modèle souris.....	107
III.3.1.	Vérification de la vascularisation des greffons après implantation sous- cutanée 107	
III.3.2.	Cinétique virale dans les greffons.....	108
IV.	Conclusion Partie 1.....	109
Partie II : Evaluation de nouvelles molécules anti-CMVH.....		111
Introduction.....		111
I.	Evaluation de TF27.....	113
I.1.	Introduction à l'article.....	113
I.2.	Conclusions sur TF27.....	141
II.	Evaluation de LAVR-289.....	143
II.1.	Matériel et méthodes.....	145
II.1.1.	Cultures cellulaires et virales.....	145
II.1.2.	Molécules antivirales.....	145
II.1.3.	Essais d'efficacité de molécules <i>in vitro</i> .....	145
II.1.4.	Essais de cytotoxicité.....	146
II.1.5.	Collection Biologique de placentas.....	147
II.1.6.	Modèle d'infection des villosités.....	147
II.1.7.	Analyses statistiques.....	147
II.2.	Résultats sur l'évaluation de LAVR-289.....	149
II.2.1.	Efficacité <i>in vitro</i> de LAVR-289.....	149
II.2.2.	Cytotoxicité <i>in vitro</i> de LAVR-289.....	150
II.2.3.	Efficacité de LAVR-289 dans le modèle <i>ex vivo</i> de villosité de 1 <sup>er</sup> trimestre 152	
II.2.4.	Cytotoxicité de LAVR-289 dans les villosités de 1 <sup>er</sup> trimestre.....	153
II.3.	Conclusion sur LAVR-289.....	155
III.	Evaluation du Cytotect® CP.....	157
III.1.	Matériels et méthodes.....	159
III.1.1.	Cultures cellulaires et virales.....	159
III.1.2.	Molécules antivirales.....	159
III.1.3.	Essais de neutralisation.....	159
III.1.4.	Essais de cytotoxicité.....	160
III.1.5.	Collection Biologique de placentas.....	160
III.1.6.	Cytotoxicité du Cytotect CP® <i>ex vivo</i> .....	161
III.1.7.	Analyses statistiques.....	161
III.2.	Résultats de l'évaluation du Cytotect® CP.....	163
III.2.1.	Efficacité <i>in vitro</i> Cytotect CP.....	163
III.2.2.	Evaluation <i>ex vivo</i> du Cytotect CP.....	164
III.3.	Conclusion sur le Cytotect® CP.....	165
Discussion et perspectives.....		167
I.	Optimisation de modèles d'infection pour le traitement de l'infection à CMVH.....	167



II. Analyse du potentiel de nouveaux traitements antiviraux .....	175
Conclusions.....	183
Conclusion générale .....	184
Références bibliographiques.....	187
Annexes .....	207
Annexe 1. Liste des Publications Et Communications.....	209
Annexe 2. Activités complémentaires .....	211



## Table des illustrations

---

Figure 1. Arbre phylogénétique des herpesvirus. ....	21
Figure 2 : Schéma de la structure du virion du cytomegalovirus humain.....	22
Figure 3. Structure du génome du CMVH. ....	23
Figure 4. Rôles des glycoprotéines dans le tropisme cellulaire du CMVH.....	25
Figure 5. Interaction du CMVH avec les composants de la membrane plasmique.....	26
Figure 6. Voie de signalisation classique de NF-κB. ....	28
Figure 7. Modulation du système immunitaire par le cytomegalovirus humain. ....	30
Figure 8. Cycle viral du CMVH dans la cellule.....	33
Figure 9. Modèle d'interaction entre le CMVH et l'hôte pendant la latence.....	35
Figure 10. Physiopathologie de l'infection à cytomegalovirus humain.....	37
Figure 11. Observation de fibroblastes infectés par le CMVH.. ....	42
Figure 12. Estimation de séroprévalence chez les femmes en âge de procréer.....	45
Figure 13. Structure des villosités.....	50
Figure 14. Développement du placenta humain durant les 3 premières semaines de grossesse.....	52
Figure 15. Formation des villosités d'ancrage et invasion des trophoblastes dans la décidue. ....	54
Figure 16. Voies de passage des pathogènes au travers de la barrière placentaire.. ...	56
Figure 17. Schéma de la structure du ganciclovir (GCV) et du valganciclovir (VGCV).. .....	59
Figure 18. Mécanisme d'action du ganciclovir (GCV), cidofovir (CDV), foscarnet (FOS), maribavir (MBV) et du letermovir (LTV).....	60
Figure 19. Schéma de la structure du cidofovir et du CMX001.....	62
Figure 20. Schéma de la structure du foscarnet. ....	64
Figure 21. Schéma de la structure de l'aciclovir et du valaciclovir.....	65
Figure 22. Structure du cyclopropavir.. ....	66
Figure 23. Schémas de la structure du BDCRB et d'un de ses dérivés, le GW275175X. .....	67
Figure 24. Structure du toméglovir.....	68
Figure 25. Schéma de la structure du letermovir. ....	68
Figure 26. Structure du maribavir.....	70
Figure 27. Structure de l'artésunate. ....	71
Figure 28. Implants sous-cutanés de fibroblastes sur Gelfoam chez la souris SCID.. .	83
Figure 29. Bénéfice de la vaccination lors de transplantation cardiaque chez le rat.. ...	84

<b>Figure 30 : Foyers d'infection de la souche TB40 en cellules FEH après 5 jours d'incubation.</b> .....	95
<b>Figure 31. Schéma d'infection des villosités flottantes.</b> .....	97
<b>Figure 32. Foyers d'infection de CMVH en culture cellulaire.</b> .....	104
<b>Figure 33. Cinétique de réplication des souches de CMVH dans les villosités de 1<sup>er</sup> et de 3<sup>ème</sup> trimestre.</b> .....	105
<b>Figure 34. Mise en évidence la L-norleucine dans les implants.</b> .....	107
<b>Figure 35. Evolution de TB40/E dans les greffons après 7 jours et 14 post greffe.</b> .....	108
<b>Figure 36. Essais d'efficacité de LAVR-289 et du CDV sur des souches de CMVH en fibroblastes humains.</b> .....	149
<b>Figure 37. Efficacité de LAVR-289 dans le 1<sup>er</sup> trimestre à J13 post-traitement.</b> .....	152
<b>Figure 38. Cytotoxicité de LAVR-289 sur les villosités de 1<sup>er</sup> trimestre.</b> .....	153
<b>Figure 39. Schéma de protocole d'essai de neutralisation du Cytotect® CP.</b> .....	160
<b>Figure 40. Efficacité <i>in vitro</i> du Cytotect® CP.</b> .....	163
<b>Figure 41. Cytotoxicité du Cytotect® CP dans les villosités de 1<sup>er</sup> trimestre.</b> .....	164



## Table des tableaux

---

<b>Tableau 1 : Recommandation pour la prévention de l'Infection à CMV pour les transplantés d'organes solides.</b> .....	40
<b>Tableau 2. Définition d'infection ou de maladie à CMVH réfractaires et de résistance au traitement.</b> .....	44
<b>Tableau 3 : Classement des manifestations cliniques dues au cCMV</b> .....	46
<b>Tableau 4. Vaccins en développement ou en essai clinique.</b> .....	75
<b>Tableau 5. Cibles virales des antiviraux anti-CMVH, résistances et toxicité.</b> .....	77
<b>Tableau 6 : Composition des milieux de culture des différents types cellulaires utilisés.</b> .....	93
<b>Tableau 7. Collection de souches de CMVH de patients et essai de production de virions libres.</b> .....	103
<b>Tableau 8. Concentrations efficaces 50% et 90% de LAVR-289 et du CDV en FEH.</b> ....	149
<b>Tableau 9. Cytotoxicité de LAVR-289 et du CDV <i>in vitro</i>.</b> .....	150
<b>Tableau 10. Index thérapeutique de LAV-289.</b> .....	151
<b>Tableau 11. Activité antivirale de LA-VR-289 et du CDV <i>ex vivo</i>.</b> .....	153
<b>Tableau 12. DN<sub>50</sub> et DN<sub>90</sub> du Cytotect® CP <i>in vitro</i>.</b> .....	163

## Index

---

<b>Abréviations</b>	<b>Définitions</b>
°C	degré Celsius
ACV	aciclovir
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARPE	cellules pigmentaires épithéliales de la rétine
ART	artésunate
BCDV	brincidofovir
BDCRB	2-Bromo-5,6-dichloro-1-β-d-ribofuranosyl-1H-benzimidazole
CB-HME	Collection Biologique de Hôpital de la Mère et de l'Enfant
CC <sub>50</sub>	concentration cytotoxique 50%
CC <sub>90</sub>	concentration cytotoxique 90%
cCMV	cytomégalovirus congénital
CDV	cidofovir
CHU	centre hospitalo-universitaire
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CMVH	cytomégalovirus humain
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
CREB	élément liant les protéines de réponse à l'AMP cyclique
CTBs	cytotrophoblastes
D+/R-	donneur séropositif/ receveur séronégatif
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DN <sub>50</sub>	dose neutralisante de 50%
DN <sub>90</sub>	dose neutralisante de 90%
DMSO	diméthylsulfoxyde
dNK	<i>natural killer</i> de la décidue



E	<i>early</i>
EBV	Epstein-Barr virus
EC <sub>50</sub>	concentration efficace de 50%
EC <sub>90</sub>	concentration efficace de 90%
ECP	effet cytopathique
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELISpot	<i>Enzyme-linked immunosorbent spot</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EVTs	trophoblastes invasifs extravillositaires
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOS	foscarnet
gC	glycocomplexe
GCV	ganciclovir
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gH (gB, gL, gO, gM, gN)	glycoprotéine H (ou B, L O, M, N)
GPCMV	cytomégalovirus du cobaye
h	heure
hCG	hormone chorionique gonadotrope humaine
HEF	fibroblastes humains embryonnaire
HHV	virus de l'herpès humain
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
HSCT	transplantation de cellules souches hématopoïétiques
HUVEC	cellules épithéliales humaines de veine de cordon ombilical
iCTBs	cytotrophoblastes interstitiels
ICTV	Comité International de la Taxonomie des Virus



IE	<i>immediate early</i>
IFN	interferon
IgG/M	immunoglobuline G ou M
IKK	inhibiteur de la kinase $\kappa$ B
IP	intrapéritonéale
IRL	répétition interne longue
IRS	répétition interne courte
IV	intraveineuse
IVG	interruption volontaire de grossesse
$\kappa$ B	inhibiteur $\kappa$ B
Kg	kilogramme
L	litre
LCR	liquide céphalo-rachidien
LDH	lactate déshydrogénase
LT	lymphocyte T
MBV	maribavir
MCMV	cytomégalovirus murin
MCP	protéines majeures de la capsid
mg	milligramme
MIE	gènes majeurs <i>immediate-early</i>
MIEP	promoteur des gènes majeurs <i>immediate-early</i>
min	minute
mL	millilitre
mM	millimolaire
mm <sup>3</sup>	millimètre cube
mnCP	protéines mineures de la capsid
MOI	multiplicité d'infection



NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	<i>natural killer</i>
nM	nanomolaire
Nrp2	neurophiline 2
NVAC	<i>National Vaccine Advisory Committee</i>
<i>pac</i>	<i>cis-packaging element</i>
PDGFRα	<i>platelet-derived growth factor receptor A</i>
PFU	<i>plaque forming unit</i>
PS	syncytium primitif
QI	quotient intellectuel
qPCR	réaction en chaîne de polymérase quantitative
RCMV	cytomégalovirus du rat
LTV	letermovir
RhCMV	cytomégalovirus du macaque rhésus
s	seconde
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SCP	petites protéines de la capsid
SDS	sodium dodecyl sulfate
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
SNC	système nerveux central
SOPF	<i>specific and opportunistic pathogen-free</i>
SOT	transplantation d'organe solide
STB	syncytiotrophoblastes
TE	trophectoderme
TLR	répétition terminale longue
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNFR	<i>tumor necrosis factor receptor</i>



TRS	répétition terminale courte
µg	microgramme
UL	segment long
µL	microlitre
µM	micromolaire
uNK	<i>uterine natural killer</i>
US	segment court
VACV	valaciclovir
VGCV	valganciclovir
VIH	virus de l'immunodéficience acquise
VZV	virus varicelle-zoster
ZIKV	virus ZIKA



## Introduction

---

La découverte de l'existence du cytomégalovirus humain (CMVH) pourrait remonter en 1881. Ribet découvre alors sur des coupes de rein d'enfants mort-nés, la présence de grandes cellules. Puis en 1904 Jesionek et Kiolemenoglou décrivent à nouveau ces cellules cytomégaliennes avec des inclusions nucléaires. Il faudra attendre plusieurs années, d'autres observations de ces cellules et l'isolement du virus dans les années 1950 pour que Weller nomme ce virus cytomégalovirus (Ho, 2007; Weller, 1970).

Depuis les années 1950, la connaissance du CMVH s'est accrue mais reste incomplète. Le CMVH a été classé dans la famille des *Herpesviridae* et plus précisément dans la sous-famille des *beta-herpesviridae*. Comme tous les virus de la famille des *Herpesviridae*, après une infection, il persiste à l'état latent toute la vie de l'individu. Aujourd'hui, environ 83% de la population mondiale serait porteuse du virus (Zuhair et al., 2019). Cette prévalence varie en fonction du pays et du statut socio-économique des individus (Cannon et al., 2010). Le problème majeur n'est plus l'identification du virus et sa détection mais la gestion des complications qu'il induit lors de greffes ou dans le cas d'une infection congénitale.

L'infection à CMVH est la première cause virale de morbidité et de mortalité chez les patients transplantés d'organes solides (SOT) ou de cellules souches hématopoïétiques (CSH). L'incidence de l'infection à CMVH dépend du statut sérologique du donneur et du receveur et varie entre 2,5% et 31,5% suivant le type de greffe (Ramanan and Razonable, 2013). Les complications induites lors d'une maladie à CMVH peuvent entraîner le rejet de la greffe ou favoriser la réaction du greffon contre l'hôte. Dans le cas de l'infection congénitale, environ 0,7 % des nouveau-nés sont infectés *in utero* lors d'une primo-infection, d'une réinfection ou d'une réactivation virale maternelles. Parmi ces nouveau-nés infectés, 10 à 15% sont symptomatiques et développeront des séquelles allant d'une thrombopénie, à une surdité ou des retards mentaux (Leruez-Ville and Ville, 2017).

La volonté de développer un vaccin contre l'infection à CMVH débute dès 1975. Il est constitué de la souche virale Towne atténuée par passages successifs en culture cellulaire (Plotkin et al., 1975). Au début des années 2000, la mise au point d'un vaccin contre le CMVH est devenue la priorité pour le *National Vaccine Advisory Committee (NVAC)* (Modlin et al., 2004). Depuis, aucun vaccin n'a été commercialisé mais plusieurs sont en développement. Une des premières molécules utilisées dans le traitement de l'infection à CMVH est le ganciclovir qui reste aujourd'hui le traitement de référence en thérapeutique. D'autres molécules peuvent être utilisées en alternative dans le traitement de l'infection à CMVH comme le cidofovir ou le foscarnet. Cependant, à cause de l'émergence possible de mutations de résistances aux traitements et de la toxicité de ces molécules, le développement de nouveaux composés est indispensable. Parmi les derniers développés, le letermovir a vu son autorisation de mise sur le marché être acceptée par la *Food and Drug Administration* et par l'Agence Européenne de Médecine pour une utilisation en prophylaxie pour les patients receveurs de CSH en 2018. Malgré l'arrivée de ces nouveaux antiviraux, l'arsenal thérapeutique est encore très limité et nécessite d'être étoffé.

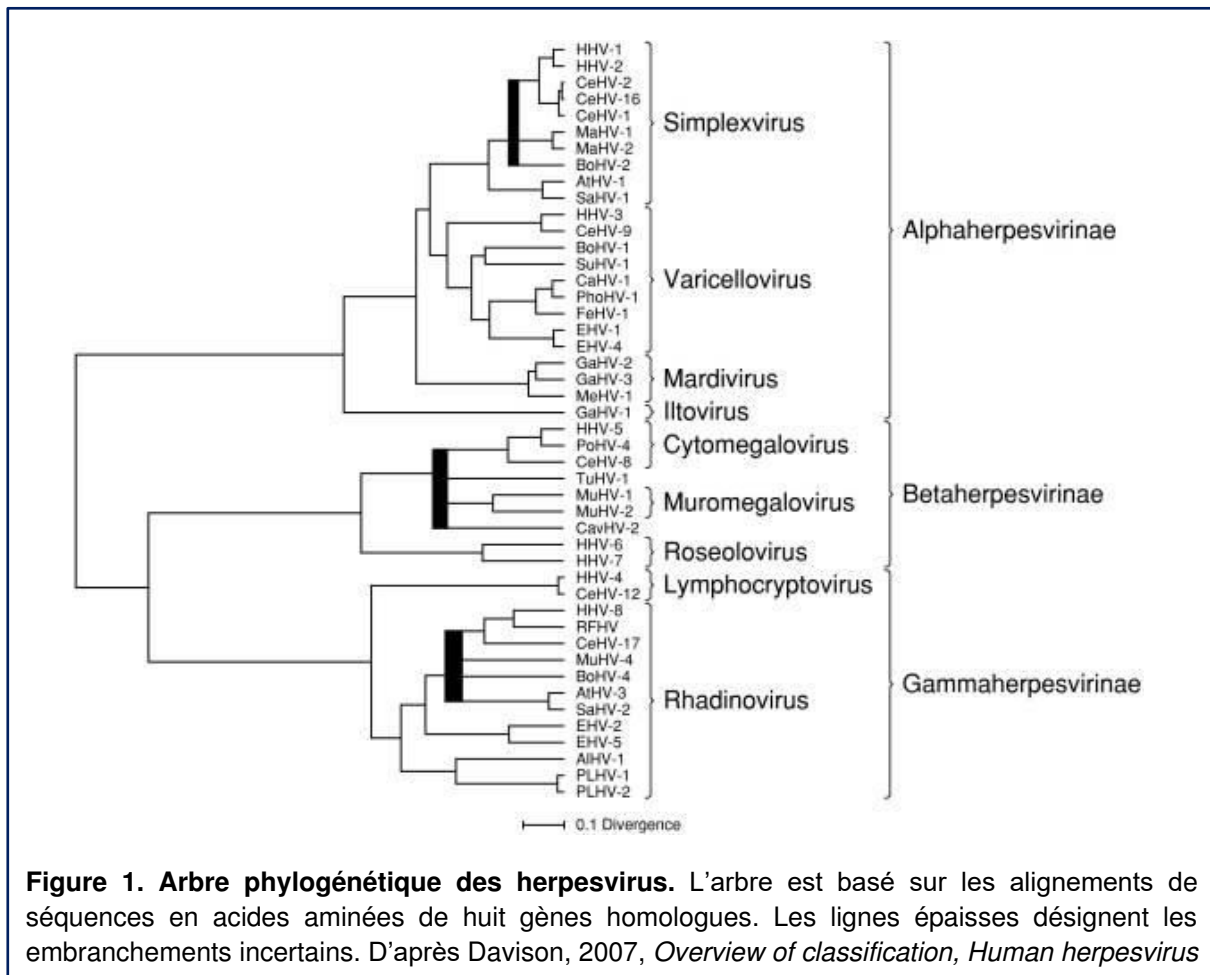
C'est dans ce contexte de développement de nouvelles thérapeutiques anti-CMVH que s'inscrivent ces travaux de thèse. Avant de pouvoir tester des molécules chez l'Homme, il est nécessaire de valider plusieurs étapes intermédiaires. Les études précliniques permettant l'évaluation de l'efficacité et de la toxicité des nouveaux composés nécessitent la mise au point de modèles d'étude pertinents. Dans le contexte de traitement de l'infection congénitale à CMVH, nous avons optimisé la culture *ex vivo* de villosités placentaires de 1<sup>er</sup> trimestre (Morère et al., 2015). Pour étudier l'efficacité des molécules dans un modèle plus complexe, avec la contrainte de la spécificité d'hôte du CMVH, nous avons validé un modèle original de greffe en sous-cutané de villosités placentaires chez la souris. Ainsi, les différents modèles d'étude mis en place au sein de l'unité de recherche permettent une évaluation *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* du potentiel anti-CMVH de nouveaux antiviraux.



# Chapitre I : Généralités sur le cytomégalovirus humain

## I. Classification

Le cytomégalovirus humain (CMVH) appartient à la famille des *Herpesviridae*. Cette famille est divisée, selon le groupe d'étude des herpesvirus du Comité International de la Taxonomie des Virus (ICTV), en trois sous-familles que sont les *Alphaherpesvirinae*, les *Betaherpesvirinae* et les *Gammapherpesvirinae* (Davison, 2007) (**Figure 1**). L'inclusion dans une sous-famille dépend des caractéristiques du virus tels que la structure du génome, son cycle de réplication ou encore de la morphologie du virion.



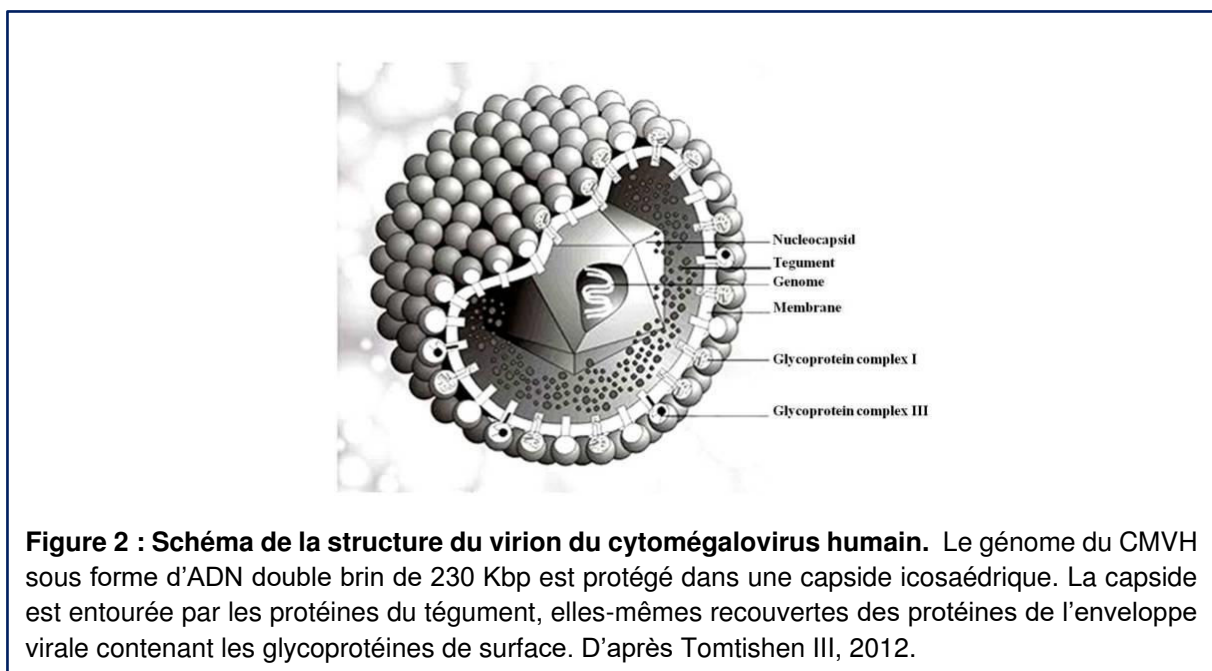
La sous-famille des *Alphaherpesvirinae* comprend par exemple, le virus de l'herpès simplex (HSV) ou le *Varicellovirus* (VZV), qui se caractérisent par un cycle répliatif court et lytique (18h à 20h pour HSV). Ils ont un tropisme d'infection d'hôte large et restent latents principalement dans les ganglions sensitifs (Davison, 2007).

Les  $\beta$ -herpesvirus, à la suite d'un cycle réplcatif dit long, restent latents principalement dans les cellules souches hématopoïétiques, les cellules lymphocytaires et les glandes sécrétoires. Le cytomégalo­virus humain ou HHV-5, ainsi que les virus HHV-6 et HHV-7 sont inclus dans cette sous-famille (Davison, 2007).

Les *Gammaherpesvirinae*, tels que le virus d'Epstein-Barr (EBV) ou les *Rhadinovirus*, sont généralement spécifiques des cellules lymphocytaires B et T avec une latence dans les tissus lymphoïdes (Davison, 2007).

## II. Structure du cytomégalo­virus

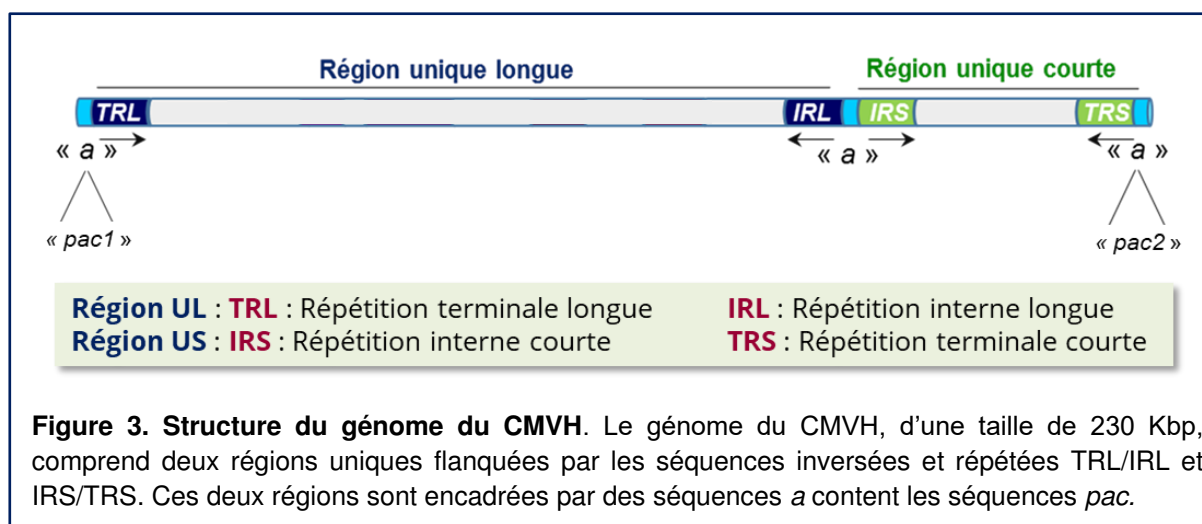
Le virion du CMVH est une particule virale de 180 à 200 nm de diamètre. Cette particule est composée du génome viral inclus dans une capsid. Le tégument entoure la capsid et la sépare de l'enveloppe virale (**Figure 2**).





## II.1. Le génome du CMVH

Le génome du CMVH est constitué d'un ADN bicaténaire de 230 Kbp codant plus de 200 protéines, ce qui en fait le plus long parmi les herpesvirus. Il est entièrement séquencé (Chee et al., 1990; Dolan et al., 2004). Le génome du CMVH se compose de deux régions, définies comme la région unique longue (UL) et la région unique courte (US) (**Figure 3**).



Chaque région, ou segment, est délimitée par des séquences inversées et répétées, *TRL* et *IRL* pour le segment UL, *TRS* et *IRS* pour le segment US. Les régions « *a* », sont présentes à chaque extrémité du génome viral ainsi qu'entre les séquences *TRL* et *IRS*. Elles contiennent les séquences *pac1* et *pac2* (*cis-packaging element*) qui servent de site de fixation au complexe d'encapsidation lors de la réplication virale (**Figure 3**).

## II.2. La capside virale

La capside du CMVH, comme toutes les capsides des herpesvirus, est formée de capsomères répartis en 150 hexons et 12 pentons. Les capsomères sont composés de différentes protéines dont la protéine majeure de la capside MCP (pUL86), les protéines mineures mnCP (pUL85 et pUL46) et les SCP qui sont les petites protéines de la capside (pU48 et pUL49) (Gibson et al., 1996; Liu and Zhou, 2007).

### **II.3. Les protéines du tégment**

Le tégment est principalement formé des protéines pp65, pp71, pp150 et pp128 entourant la capsid virale. Le rôle des protéines du tégment n'est pas encore totalement élucidé. Certaines sont impliquées dans les modifications cellulaires lors de l'entrée du virus dans la cellule hôte, dans l'évasion à la réponse immunitaire ou encore dans le passage de la capsid du noyau vers le cytoplasme (Tomtishen III, 2012; Marschall et al., 2017).

### **II.4. L'enveloppe du CMVH**

Les protéines composant l'enveloppe virale, initialement réparties entre trois groupes ou glycocomplexes (gC), gC-I, gC-II, gC-III (Gretch et al., 1988), définissent le tropisme cellulaire du virus. Par liaison avec les récepteurs extracellulaires, elles permettent la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire.

Le groupe gC-I est composé d'homotrimères de glycoprotéine B (gB) codées par le gène *UL55*. Le groupe gC-II comprend les glycoprotéines M et N (gM et gN) codées respectivement par les gènes *UL100* et *UL73*. Le groupe gC-III est formé des glycoprotéines gH/gL et gO (codées par *UL75*, *UL115* et *UL74*) (Nguyen and Kamil, 2018).

Un autre complexe est présent au sein de l'enveloppe virale : le complexe pentamérique ou pentamère. Il est composé des protéines gH/gL/pUL128/ pUL130/pUL131 permettant l'entrée du virus dans les cellules épithéliales et endothéliales (Wang and Shenk, 2005a).

## **III. Interaction virus et hôte**

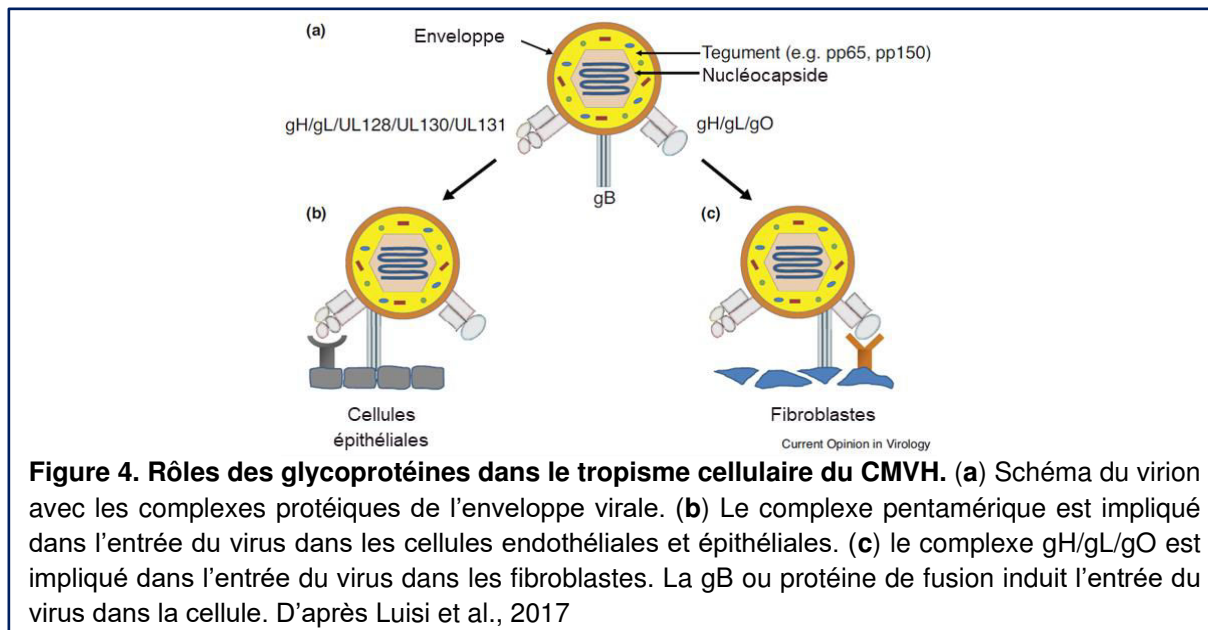
Les mécanismes d'entrée du virion dans la cellule ne sont pas complètement élucidés. Toutefois, il est établi que certains complexes protéiques sont impliqués dans le tropisme cellulaire du virus. Suite à son internalisation, le virus interagit avec la cellule pour pouvoir se répliquer et échapper au système immunitaire.

### III.1. Entrée du virus dans la cellule et tropisme cellulaire.

Malgré sa stricte spécificité d'hôte, le CMVH est capable d'infecter de nombreux types cellulaires tels que les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales, mais aussi les cellules dendritiques, les monocytes et macrophages, les cellules neurales, les trophoblastes ou encore les hépatocytes (Stinski and Meier, 2007a). L'entrée du virus dans la cellule hôte est médiée par l'interaction des complexes gC-I, gC-II et gC-III de l'enveloppe virale et des récepteurs extracellulaires de la cellule.

#### III.1.1. Tropisme cellulaire

Le tropisme cellulaire du CMVH est défini par la présence de la protéine gO associée soit au complexe gH/gL soit aux protéines codées par les gènes *UL128*, *UL130* et *UL131*. Le niveau d'expression du complexe gH/gL/gO ou du complexe gH/gL/UL128-131 est variable entre les souches de CMVH (Zhou et al., 2013).

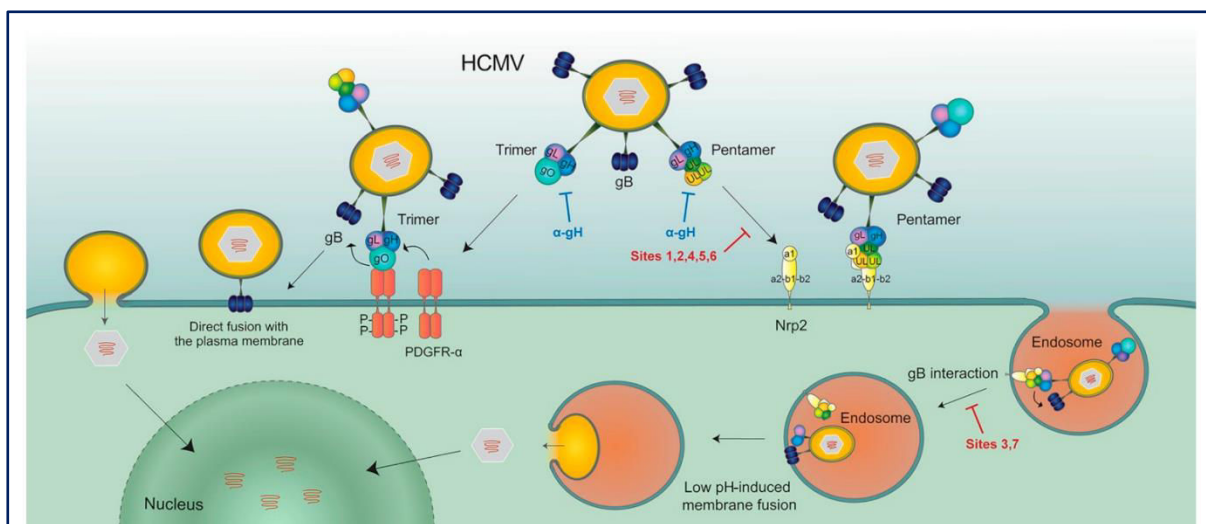


Le complexe gL/gH/gO, ou complexe trimérique, est un ligand du récepteur alpha des facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGFR $\alpha$ ) et permet l'entrée du virus dans les fibroblastes (**Figure 4**) (Kabanova et al., 2016). Les protéines pUL128/PpUL130/pUL131 du pentamère sont indispensables pour l'entrée du virus dans les cellules endothéliales et épithéliales mais aussi dans les cellules leucocytaires (**Figure 4**) (Gerna et al., 2019a).

Les passages successifs de souches de CMVH sur fibroblastes induisent des mutations dans les gènes *UL128*, *UL130* et *UL131* rendant le complexe non fonctionnel (Dargan et al., 2010). Cette perte du complexe pentamérique ne permet plus au virus d'infecter les cellules endothéliales et/ou épithéliales (Vanarsdall and Johnson, 2012). Il en est ainsi pour la souche virale de laboratoire AD169, principalement cultivée sur fibroblastes, qui a perdu son tropisme endothélial/épithélial à la suite de mutations dans le gène *UL131*. La restauration du gène *UL131* de l'AD169 a permis de restaurer sa capacité à infecter les cellules ARPE-19, cellules épithéliales de la rétine (Wang and Shenk, 2005b).

### III.1.2. Entrée du virus dans la cellule

L'entrée du CMVH dans les fibroblastes est favorisée par la liaison du complexe gL/gH/gO avec les récepteurs PDGFR $\alpha$  (**Figure 5**) qui sont alors phosphorylés (Kabanova et al., 2016; Martinez-Martin et al., 2018). Le complexe gL/gH/gO est aussi capable de se lier au récepteur TGF $\beta$ RIII dont la fonction dans l'infection virale n'est pas encore élucidée. Ce récepteur est exprimé par les cellules MRC-5 (fibroblastes embryonnaires) mais aussi par les cellules ARPE-19 (cellule épithéliales de la rétine) (Martinez-Martin et al., 2018).



**Figure 5. Interaction du HCMV avec les composants de la membrane plasmique.** La liaison du complexe trimérique avec le récepteur PDGFR $\alpha$  puis la liaison de la gB avec des composants extracellulaires, conduit à la fusion du virus avec la membrane plasmique. L'endocytose du virus est dépendante du pH et a lieu après interaction du pentamère avec Nrp2 puis action de la gB dans la vésicule d'endocytose. D'après Gerna et al., 2019b.

Le récepteur neuropiline2 (Nrp2) situé à la surface des cellules épithéliales/endothéliales interagit avec le complexe pentamérique du CMVH (**Figure 5**). La liaison à Nrp2 permettrait l'activation de la voie ErbB et ainsi pourrait activer la voie de l'EGFR (Martinez-Martin et al., 2018). Ce récepteur est aussi présent à la surface des fibroblastes, ce qui pourrait rendre ces derniers plus sensibles à l'infection par le CMVH.

L'entrée du virus dans la cellule peut se faire soit par endocytose soit par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique (**Figure 5**). Dans les deux cas, après liaison du complexe trimérique ou pentamérique, la fusion est induite par interaction de la gB avec des composants extracellulaires. La gB peut aussi se lier aux héparanes sulfates présents à la surface des cellules ainsi qu'avec les intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 3$  de la membrane plasmique des fibroblastes. Cette étape de liaison induit la fusion du virus avec la cellule (Gerna et al., 2019b). L'action de la gB, dite protéine de fusion, est indispensable pour l'entrée du virus dans la cellule (Vanarsdall et al., 2008). La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire conduit à la libération de la capside et des protéines du tégument dans la cellule (**Figure 5**). Cette étape est indépendante du pH à la différence de l'endocytose du virus lors de son entrée dans les cellules épithéliales/endothéliales qui se fait à pH faible (Ryckman et al., 2006).

Les virions utiliseraient deux voies distinctes d'entrée dans les cellules épithéliales ARPE-19. S'ils sont produits dans des cellules fibroblastiques, l'entrée se ferait préférentiellement par endocytose alors que les virions issus de cellules épithéliales fusionneraient avec la membrane plasmique (Wang et al., 2007).

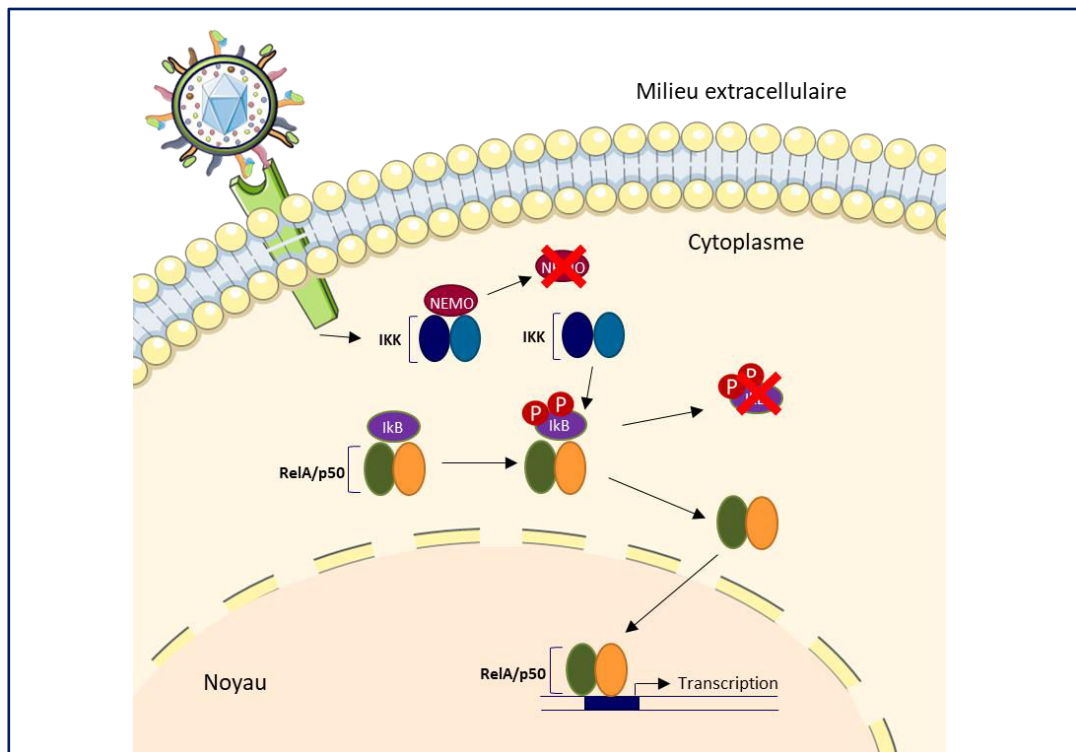
### **III.2. Réponses cellulaires à l'entrée du virus dans la cellule.**

L'internalisation du CMVH déclenche diverses réponses dans la cellule. L'homéostasie cellulaire du  $\text{Ca}^{2+}$  est modifiée, les phospholipases C et A2 sont activées. Les voies des facteurs de transcription sont aussi activées telles que la voie NF- $\kappa$ B, la voie des protéines kinases activées par des mitogènes (MAP kinases) ainsi que les voies ERK1/2 et p38 ou celle de la kinase

phosphatidylinositol 3 (PI3K) (Compton, 2004; Compton and Feire, 2007). La plupart de ces modifications cellulaires sont indépendantes de la transcription de gènes du CMVH mais sont impliquées dans la réplication virale ou dans la réponse immunitaire.

### III.2.1. Activation de la voie NF-κB

La régulation de la voie NF-κB par le CMVH est nécessaire pour sa réplication mais aussi pour l'échappement du virus à la réponse immunitaire. Elle est activée lors de l'entrée du virus, ce qui conduit à la dégradation du complexe NEMO, sous unité-régulatrice du complexe IKK. L'inhibiteur



**Figure 6. Voie de signalisation classique de NF-κB.** Le facteur de transcription NF-κB est activé après dégradation de sa protéine inhibitrice IκB par le complexe IKK. Il est ensuite transloqué au noyau et se fixe sur l'ADN au niveau des sites de liaison à NF-κB pour activer la transcription de gènes. D'après DeMeritt et al., 2004.

de la kinase κB (IKK) est alors activé et va phosphoryler l'inhibiteur κB (IκB) qui sera dégradé. Le complexe RelA/p50, formant le complexe NF-κB, peut alors être transloqué au noyau pour se fixer sur les sites de transcriptions des gènes du CMVH ou sur des gènes participant à la réponse immunitaire de l'hôte (**Figure 6**).

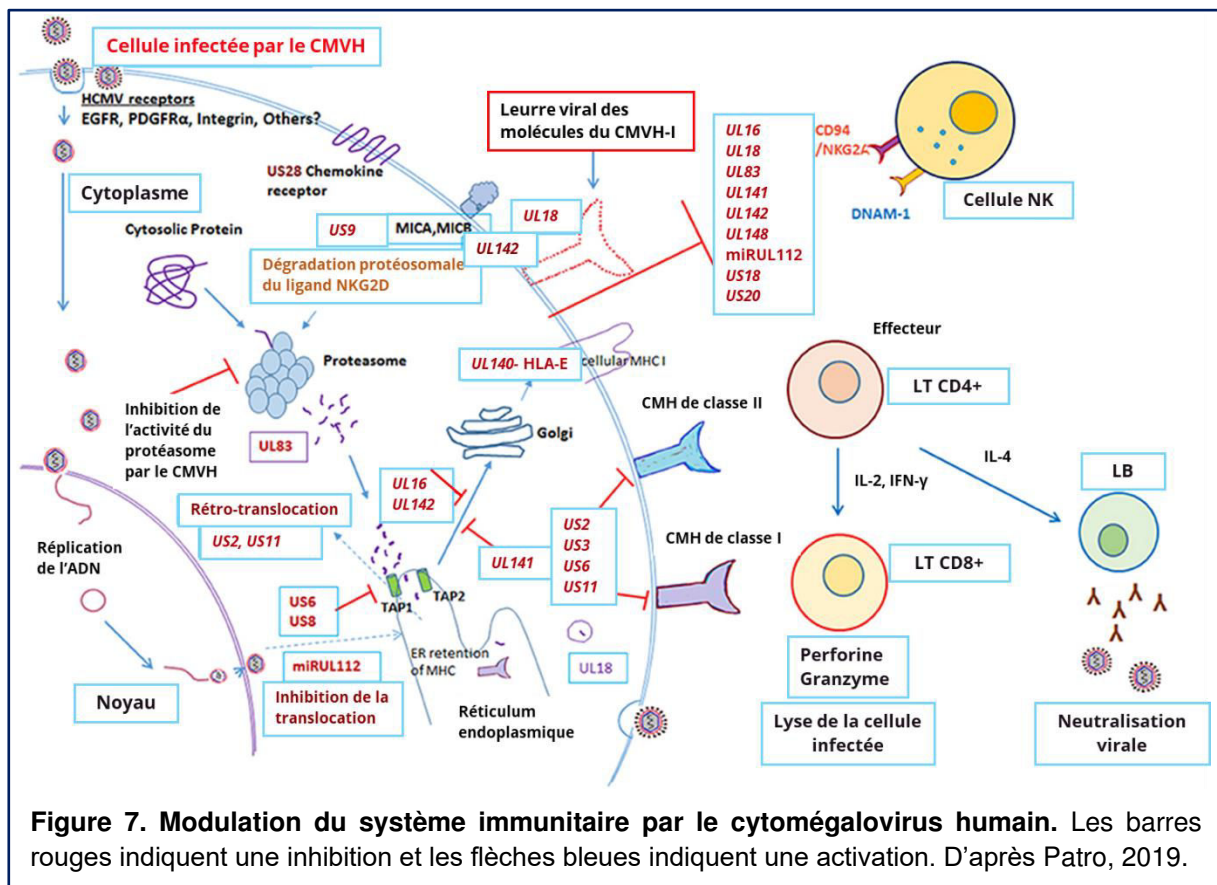
Dans un premier temps, l'activation de cette voie permet l'expression des gènes *immediate-early* du CMVH, dont le promoteur MIEP qui contient un site de fixation au facteur NF- $\kappa$ B (DeMeritt et al., 2004). Dans un second temps, la protéine du tégument pUL26 participe à l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B afin de diminuer la réponse immunitaire de l'hôte (Mathers et al., 2014).

### III.2.2. Inhibition de la mort cellulaire

Le CMVH interagit avec de nombreuses voies afin d'inhiber l'induction de l'apoptose ou de la nécrose cellulaire (Brune and Andoniou, 2017). La mort cellulaire est régulée par les protéines *IE1*, *p72*, et *IE2*, *p86*. Elles inhibent les voies apoptotiques induites par le TNF exprimé par la cellule en réponse à l'infection. Le CMVH encoderait en plus un ligand des récepteurs au TNF, la protéine pUL144 (McCormick and Mocarski Jr., 2007).

### III.2.3. Réponse immunitaire

Le CMVH interagit avec les acteurs de la réponse innée et adaptative dès son entrée dans la cellule. Lors de la fixation à la membrane plasmique, le CMVH se lie aux récepteurs *toll-like* (TLR), via la gB ou la gH, déclenchant une réponse innée. La liaison au TLR2 conduit à l'activation de de la voie NF- $\kappa$ B (Compton and Feire, 2007). L'infection des monocytes par le CMVH favorise l'expression des TLR4, 5 et 6 (Smith et al., 2014). L'activation des TLR conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires et peut aussi induire l'apoptose cellulaire (Brune and Andoniou, 2017). Des polymorphismes dans les gènes codant les TLR peuvent être associés avec une infection à CMVH chez les enfants ou à un plus fort taux de transmission du virus *in utero* (Eldar-Yedidia et al., 2017; Studzińska et al., 2017).



Les cellules *natural killer* (NK) sont un des premiers effecteurs de la réponse innée à être activés lors d'une infection virale. Plusieurs gènes du CMVH vont conduire à l'inhibition de ces cellules NK. Les produits des gènes *UL16*, *UL17*, *UL40*, *UL140* et *UL142* sont des homologues des protéines HLA-I qui, exprimés à la surface de la cellule, inhibent la réponse NK (Jackson et al., 2011; Patro, 2019). Divers autres gènes sont impliqués dans l'échappement à la lyse cellulaire induite par les NK tels que *UL18* et *UL83* (codant la protéine pp65), *US20* ou *UL148* (Patel et al., 2018; Patro, 2019) (**Figure 7**).

Dans un second temps, certaines protéines du CMVH vont inhiber la réponse humorale médiée par les lymphocytes T (LT) CD8+ et CD4+. Les LT CD8+ jouent un rôle crucial dans la protection contre l'infection à CMVH et ont une activité cytotoxique envers les cellules infectées. Un transfert de ces cellules de souris immunocompétentes vers des souris déficientes en CD8+ permet de protéger ces dernières contre une infection à CMV (Jackson et al., 2011; Reddehase and Lemmermann, 2018).



Cependant, les protéines virales codées par les gènes *US2*, *US3*, *US6* et *US11*, induisent la dégradation des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II, lors de leur maturation dans la cellule. Ceci prévient la présentation des peptides viraux à la surface de la cellule infectée et donc empêche leur reconnaissance par les LT CD8+ ou CD4+ (**Figure 7**) (Jackson et al., 2011; Patro, 2019). L'antigène majoritairement reconnu par les LT CD8+ est la protéine pp65 (Jackson et al., 2011).

Les LT CD4+ sont divisés en plusieurs sous-groupes dont les LT *helper* qui participent soit à l'activation des LT CD8+ soit à l'activation des lymphocytes B (LB) producteurs d'anticorps anti-CMVH. Les LT CD4+ sécrètent des cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$  ou l'IFN- $\gamma$  (Jackson et al., 2011).

Le CMVH est aussi capable de produire des protéines homologues aux interleukines tel que LAcmlL-10 (*UL111A*) homologue de l'IL-10. La protéine LAcmlL-10, a une activité immunosuppressive en réprimant l'expression du CMH-I et CMH-II et en interférant avec l'activité des cellules dendritiques (Chang et al., 2004; Patro, 2019).

Le CMVH est donc capable d'échapper à la réponse immunitaire par différentes voies de signalisation de façon à permettre sa réplication au sein de la cellule.

### III.3. Réplication virale

La réplication du virus du CMVH se déroule en trois phases. La phase dite très précoce où les gènes très précoces ou *immediate-early (IE)* vont s'exprimer, la phase précoce avec expression des gènes précoces ou *early (E)* et la phase tardive avec expression des gènes tardifs ou *late (L)*.

#### III.3.1. Phase très précoce

Peu de temps après l'entrée du virus dans la cellule, la protéine du tégment pp71 va être transportée au noyau et cibler les répresseurs Daxx. Les répresseurs recrutent des histones désacétylases pour réprimer la transcription de gènes. Peu de temps après l'entrée du virus dans la cellule, la protéine du tégment pp71 va être transportée au noyau et cibler les répresseurs

Daxx pour éviter la répression des gènes *IE* (Saffert and Kalejta, 2006). Les gènes *IE* sont les premiers transcrits après l'entrée du virus dans la cellule et préparent la cellule pour la réplication virale. Ils ne nécessitent pas la synthèse de nouvelles protéines pour être exprimés et sont indispensables pour la réplication virale. Ils sont répartis entre les locus *IE-A* et *IE-B* situés sur le segment long (UL) du génome du CMVH et au niveau des séquences *IRS* et *TRS* du segment US.

Le locus *IE-A* contient les gènes majeurs *immediate-early (MIE)* *IE1* et *IE2*. Le locus *IE-B* code des protéines impliquées dans la croissance virale. Le couple *IE1/IE2* joue un rôle essentiel dans la réplication virale en régulant l'expression d'autres gènes du CMVH. Le produit du gène *IE1*, en plus d'interagir avec la chromatine et des protéines cellulaires, augmente l'activité du gène *IE2*. La protéine issue du gène *IE2* est responsable de l'activation de gènes *early* et *late*. Il interagit aussi avec des facteurs de transcriptions cellulaires (Mocarski Jr., 2007a).

Les produits des gènes *IRS/TRS* participent à l'activation de promoteurs viraux avec les produits de gènes *MIE*. Le promoteur des gènes *MIE* (MIEP) est sous influence du facteur de transcription cellulaire NF- $\kappa$ B (DeMeritt et al., 2004). Un rétrocontrôle de l'expression des gènes *IE* est assuré par les protéines codées par les gènes *IE1* et *IE2*. Durant cette phase, sont exprimées les protéines codées par les gènes *UL112-113*, qui sont impliquées dans la transactivation du gène *UL54* codant la polymérase virale (Stinski and Meier, 2007b).

### **III.3.2. Phase précoce.**

L'expression des gènes *E* nécessite au préalable l'expression des gènes *IE*. Les gènes *E* sont répartis entre deux groupes, le premier groupe impliqué dans la synthèse de l'ADN viral, le clivage et l'encapsidation du génome viral ainsi que dans l'assemblage des particules virales. Le second groupe met en place l'environnement cellulaire nécessaire à la réplication du génome viral.

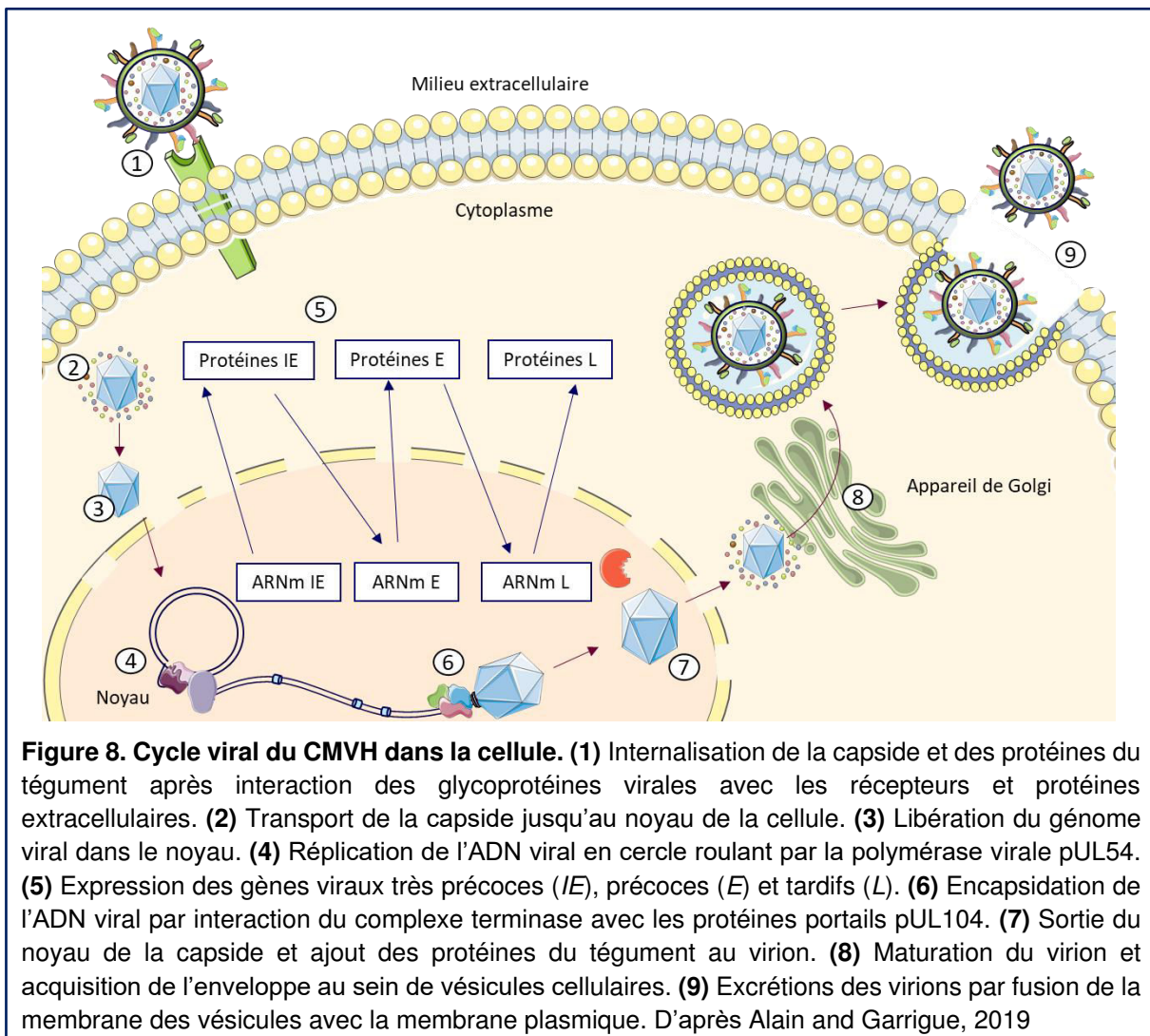
Les gènes *E* comprennent les gènes codant la polymérase virale pUL54, ainsi que le complexe hélicase-primase composé des protéines pUL70/pUL102/pUL105. La protéine accessoire de la polymérase virale, pUL44, est aussi exprimée durant cette phase précoce. Les protéines du



complexe terminase impliquées dans le clivage et l'encapsidation du génome viral sont issues des gènes précoces *UL56*, *UL89* et *UL51*. En plus, les produits des gènes *UL52* et *UL77* participeraient aussi à l'encapsidation de l'ADN viral avec le complexe terminase et les protéines portails pUL104 (White and Spector, 2007).

### III.3.3. Phase tardive

C'est lors de cette phase qu'a lieu la réplication de l'ADN viral. La synthèse d'ADN, en cercle roulant, se déroule dans le noyau de la cellule, à partir de l'origine de réplication *oriLyt* située entre les gènes *UL57* et *UL69* (Mocarski Jr., 2007b). Le complexe hélicase-primase composé des sous-unités protéiques pUL105 et pUL70 ainsi que de la protéine pUL102, permettrait l'ouverture de l'ADN double brin en vue de sa réplication par la polymérase virale (Anders et al., 2007a) (**Figure 8.4**).



**Figure 8. Cycle viral du CMVH dans la cellule. (1)** Internalisation de la capsidite et des protéines du tégment après interaction des glycoprotéines virales avec les récepteurs et protéines extracellulaires. **(2)** Transport de la capsidite jusqu'au noyau de la cellule. **(3)** Libération du génome viral dans le noyau. **(4)** Réplication de l'ADN viral en cercle roulant par la polymérase virale pUL54. **(5)** Expression des gènes viraux très précoces (*IE*), précoces (*E*) et tardifs (*L*). **(6)** Encapsidation de l'ADN viral par interaction du complexe terminase avec les protéines portails pUL104. **(7)** Sortie du noyau de la capsidite et ajout des protéines du tégment au virion. **(8)** Maturation du virion et acquisition de l'enveloppe au sein de vésicules cellulaires. **(9)** Excrétions des virions par fusion de la membrane des vésicules avec la membrane plasmique. D'après Alain and Garrigue, 2019

L'ADN viral est synthétisé par la polymérase pUL54 dont l'activité est stimulée par sa protéine accessoire pUL44. La protéine pUL44 serait un substrat de la kinase virale pUL97 (Anders et al., 2007b). Le génome viral est ensuite clivé et encapsidé par le complexe terminase (pUL56/pUL89/pUL51). Il est clivé une première fois entre les séquences *pac1* et *pac2* situées aux extrémités du génome viral. Une capsidie vide est recrutée et l'unité de génome est encapsidée au travers des protéines portails pUL104 (**Figure 8.6**). Le génome est ensuite clivé une seconde fois avant d'être totalement intégré dans la capsidie par le complexe terminase (Ligat et al., 2018).

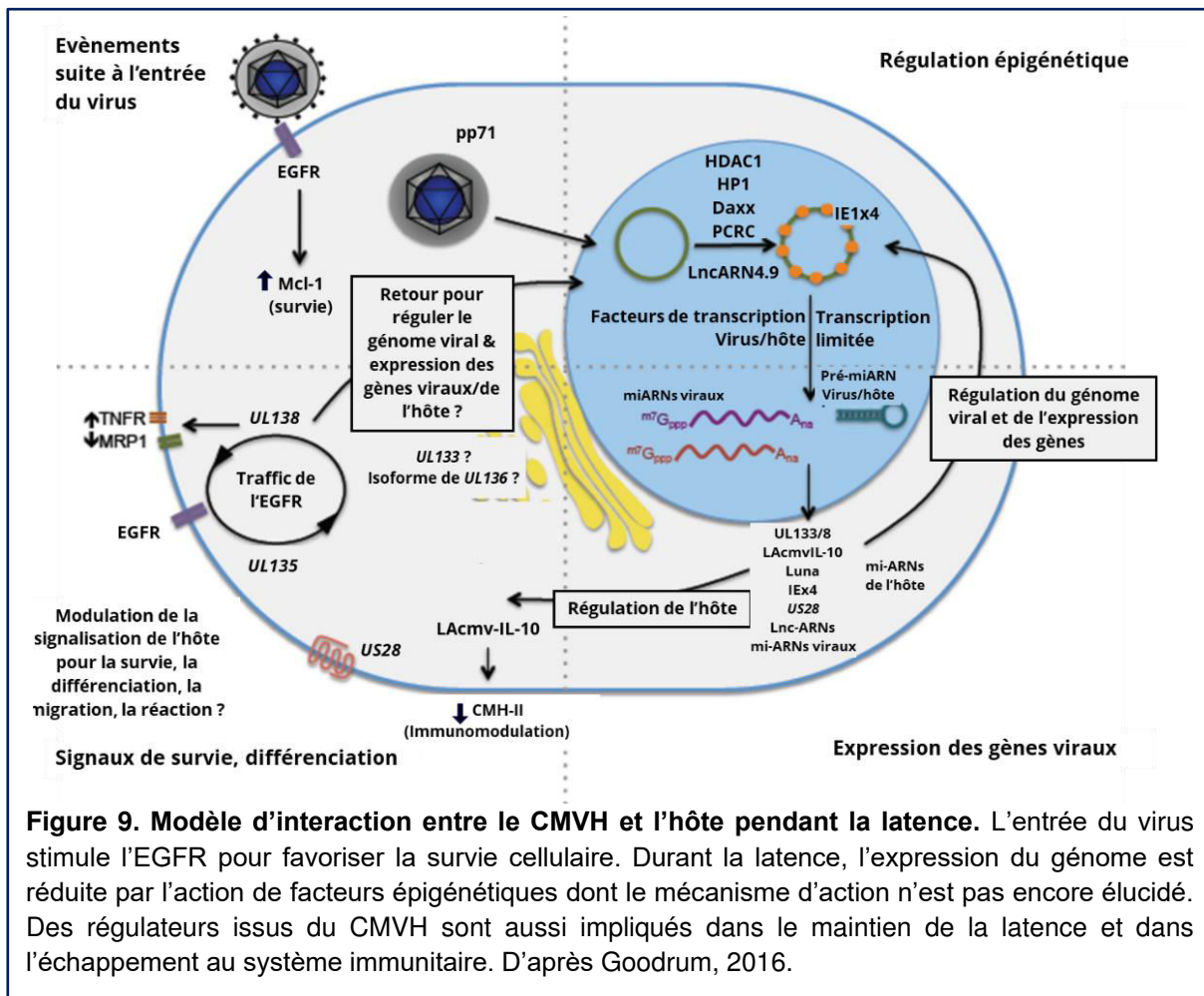
La capsidie est assemblée dans le noyau par association entre les protéines MCP, SCP, TRL1/2 à l'aide des précurseurs des protéines d'assemblage. Les protéines portails pUL104 associées en pentons sont incorporées dans la capsidie. La protéine du tégument pUL69, produite pendant la phase tardive, permet la translocation de la capsidie du noyau vers le cytoplasme après encapsidation du génome viral (**Figure 8.7**).

La nucléocapsidie s'entoure des protéines du tégument dans le noyau avant d'être acheminée dans le cytoplasme où d'autres protéines du tégument vont venir s'associer à la capsidie. La particule virale achève sa maturation au niveau de l'appareil de Golgi avec ajout de l'enveloppe virale (**Figure 8.8**) avant transport des virions dans des vésicules pour être excrétés hors de la cellule (**Figure 8.9**) (Mocarski Jr., 2007a).

#### III.4. Phase de latence du CMVH et réactivation virale

Le CMVH, après sa réplication et une dissémination dans l'organisme, persiste à l'état latent toute la vie de l'individu. Le virus reste latent majoritairement dans les cellules souches hématopoïétiques. Le faible nombre de virus latents rend délicat l'étude de la latence du CMVH. Cependant, certains gènes s'exprimant lors de la phase de latence ont été identifiés. Ainsi, les cellules infectées expriment les gènes situés dans les locus *UL133-UL138*, *UL144*, *US28* ainsi que les

gènes codant la protéine LAcmvIL-10 (*UL111A*), homologue de l'IL-10, une petite protéine IE1 (IE1x4) et les ARN long non-codants (lnc) 2.7Kb et 4.9Kb (Goodrum, 2016).



**Figure 9. Modèle d'interaction entre le CMVH et l'hôte pendant la latence.** L'entrée du virus stimule l'EGFR pour favoriser la survie cellulaire. Durant la latence, l'expression du génome est réduite par l'action de facteurs épigénétiques dont le mécanisme d'action n'est pas encore élucidé. Des régulateurs issus du CMVH sont aussi impliqués dans le maintien de la latence et dans l'échappement au système immunitaire. D'après Goodrum, 2016.

Le rôle du transcrite non-codant lncARN4.9 en association avec le complexe PRC2 serait de permettre une méthylation des histones présentes au niveau du promoteur MIEP. Ceci contribuerait à la répression des gènes *IE* et de la mise en latence du virus (Rossetto et al., 2013). La protéine pUL135 par interaction avec l'EGFR diminue l'expression du récepteur à la surface de la cellule en favorisant sa dégradation, à la différence de pUL138 qui augmente l'expression de l'EGFR à la surface cellulaire (**Figure 9**). La perte du gène *UL135* conduit au maintien de l'état latent (Rak et al., 2018).

Le CMVH interagit avec la cellule pour échapper au système immunitaire. La protéine LAcvIL10, bloque la réponse de mort cellulaire mais aussi induit une diminution l'expression du CMH-II (**Figure 9**) (Dupont and Reeves, 2016; Goodrum, 2016).

La réactivation virale pourrait être déclenchée lors de changements dans la cellule, induits par la différenciation des progéniteurs des cellules myéloïdes en monocytes ou macrophages. Le promoteur MIEP n'est plus réprimé et permet donc l'expression des gènes *IE*. La protéine pUL138 augmente l'expression de l'EGFR ainsi que du récepteur TNFR1, favorisant ainsi l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Goodrum, 2016) (**Figure 9**).

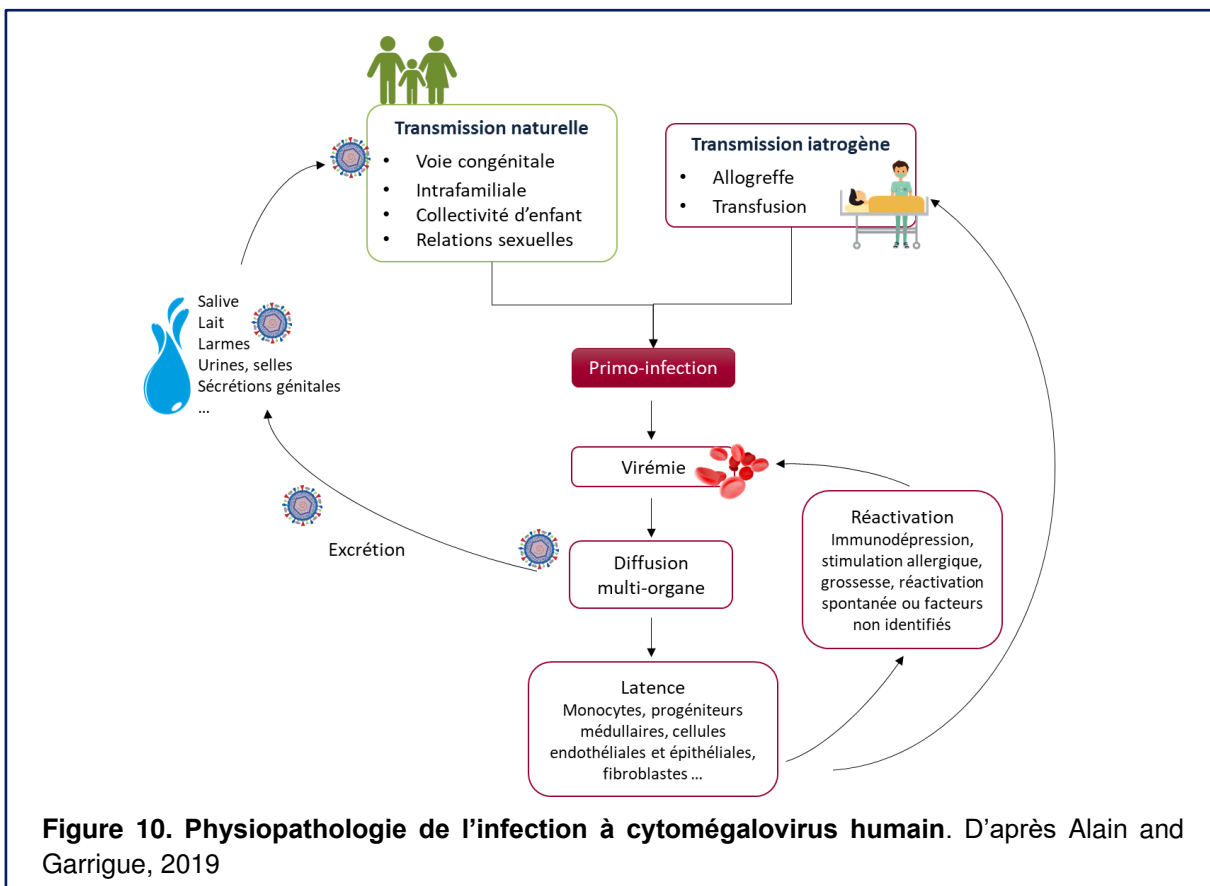
Dans les cellules dendritiques, la voie ERK-MAP kinase est activée après stimulation par l'IL-6. Cette voie cible les promoteurs, dont le MIEP du CMVH, répondants au facteur de transcription CREB (Dupont and Reeves, 2016).

## Chapitre II : Epidémiologie et physiopathologie de l'infection à CMVH

Le CMVH est présent chez 40 à 100% des individus à travers le monde avec un pourcentage variant en fonction des pays et du statut socio-économique des individus (Cannon et al., 2010). La plus forte prévalence, 90%, est constatée dans les pays de la région Est de la Méditerranée ainsi qu'en Afrique et en Chine (Zuhair et al., 2019). L'infection à CMVH ne semble pas présenter de variations saisonnières. De plus, la prévalence du CMVH dans la population a tendance à augmenter avec l'âge des individus (Soper, 2013).

### I. Transmission du CMVH

La transmission du virus du CMVH se fait selon deux voies : par transmission horizontale ou verticale (transmission naturelle) ou par transmission iatrogène à la suite d'un acte médical (**Figure 10**). Lors d'une transmission naturelle, le virus du CMVH se transmet par les sécrétions corporelles telles que les larmes, la salive, le lait maternel ou encore les sécrétions génitales (Alain and Garrigue, 2019).



Le CMVH est dit ubiquitaire et lors d'une primo-infection, se réplique dans divers types cellulaires avant de diffuser via le sang dans de nombreux organes. Le virus est alors excrété dans les fluides corporels et peut être de nouveau transmis à un autre individu avant de redevenir latent (**Figure 10**). En dehors de l'infection congénitale transmise *in utero*, et de l'allaitement pour les nouveaux nés, les jeunes enfants, qui excrètent du virus dans la salive et dans les urines, sont la source majeure de contamination en population générale (Soper, 2013).

Lors d'une greffe d'organe ou de tissus, ou lors d'une transfusion de sang non déleucocyté, le virus latent du donneur peut se réactiver et ainsi se transmettre à un nouvel individu (**Figure 10**).

## **II. Manifestations cliniques chez l'immunocompétent**

La primo-infection chez l'individu immunocompétent est le plus souvent asymptomatique. Toutefois, l'infection à CMVH peut se manifester par un syndrome mononucléosique avec de la fièvre, une splénomégalie, des maux de gorge ou de tête.

Le virus persiste toute la vie de l'individu et peut se réactiver. La réactivation du CMVH chez les personnes âgées peut rendre ces dernières plus fragiles et donc plus sensibles à d'autres infections (Thomasini et al., 2017). De plus, même pour des patients apparemment immunocompétents, la réactivation du CMVH peut se produire si ces patients sont malades (Limaye et al., 2008).

## **III. Infection par CMVH chez les transplantés.**

### **III.1. Risques et manifestations cliniques de l'infection à CMVH chez les patients transplantés**

Les complications post-greffe dues au CMVH peuvent entraîner un rejet de greffe et sont la première cause de morbidité et de mortalité chez les patients transplantés. L'immunosuppression induite lors d'une transplantation d'organe peut faciliter le développement d'une infection à CMVH. Il est en est ainsi pour transplantés d'organes solides mais aussi lors de greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH). L'infection à CMVH peut être le résultat d'une primo-infection ou une



réactivation du virus présent dans les tissus du donneur ou du receveur. L'incidence est plus forte pour les patients recevant une greffe de poumon ou de poumon/cœur (50 à 75%), et pouvant aller jusqu'à 50% pour les greffés de pancréas (Azevedo et al., 2015).

Une infection par le CMVH peut se manifester de deux façons (Ljungman et al., 2017) :

- **Par une infection asymptomatique à CMVH** : avec une réplication du virus sans symptômes apparents dus au CMVH.
- **Par une maladie à CMVH** : on distinguera dans ce cas la maladie invasive à CMVH avec une atteinte des organes (rétinite, hépatite, atteinte du tractus digestif...), du syndrome CMVH caractérisé par la présence d'au moins deux des critères parmi les suivants :
  - Une fièvre supérieure à 38°C pendant au moins 2 jours
  - Une asthénie ou une altération de l'état général
  - Une leucopénie ou une neutropénie : sur 2 prélèvements avec 24 h d'intervalle
  - Un taux de leucocytes  $< 3\,500/\text{mm}^3$  (ou chute  $> 20\%$  si taux initial  $< 4\,000/\text{mm}^3$ )
  - Un taux de polynucléaires neutrophiles  $< 1\,500/\text{mm}^3$  (ou chute  $> 20\%$  si taux initial  $< 1\,500/\text{mm}^3$ )
  - La présence de lymphocytes atypiques de plus de 5%
  - Une thrombopénie
  - Un taux de plaquettes  $< 100\,000/\text{mm}^3$  (ou chute  $> 20\%$  si taux initial  $< 115\,000/\text{mm}^3$ )
  - Ou une élévation des transaminases de plus de 2 fois la normale (sauf chez l'individu greffé hépatique)

Le statut sérologique du couple donneur /receveur est considéré comme facteur prédictif des risques dus au CMVH et guide la mise en place d'une prophylaxie (**Tableau 1**). En effet, le risque de développer une maladie à CMVH est dépendant du statut sérologique du donneur et du receveur (Krishna et al., 2019). Les patients séronégatifs pour le CMVH (R-) recevant une greffe issue d'un donneur séropositif (D+) sont les plus à risque en transplantation d'organe solide (SOT) (Humar et al., 2009).

La prise en charge du patient peut commencer quelques jours avant la greffe avec la mise en place d'une prophylaxie qui s'étalera sur 3 à 6 mois post-greffe (**Tableau 1**). Dans le cas d'une présence du virus mais sans symptômes, un traitement anticipé, dit « préemptif », peut représenter une alternative mais nécessite un suivi très régulier du patient pour détecter une réplication virale et la mise en place du traitement avant l'apparition de symptômes (**Tableau 1**). Le seuil de charge virale permettant de prédire la survenue d'une maladie à CMVH n'étant pas strictement défini, c'est l'augmentation de la charge virale circulante qui justifiera la mise en œuvre du traitement préemptif.

**Tableau 1 : Recommandation pour la prévention de l'Infection à CMVH pour les transplantés d'organes solides.** D'après Kotton et al., 2018.

Organe	Statut	Risque	Recommandations	Alternative
<b>Tous</b>	D-/R-	Bas	surveillance clinique	stratégie préemptive
<b>Rein</b>	D+/R-	Haut	6 mois de GCV/VGCV ou stratégie préemptive	
	R+	Intermédiaire	3 mois de VGCV ou stratégie préemptive	
<b>Foie</b>	D+/R-	Haut	3-6 mois de VGCV ou stratégie préemptive	
	R+	Intermédiaire	3 mois de VGCV ou stratégie préemptive	
<b>Pancréas</b>	D+/R-	Haut	3-6 mois de VGCV	stratégie préemptive
	R+	Intermédiaire	3 mois de VGCV ou stratégie préemptive	
<b>Cœur</b>	D+/R-	Haut	3-6 mois de GCV/VGCV	stratégie préemptive
	R+	Intermédiaire	3 mois de GCV/VGCV ou stratégie préemptive	
<b>Poumon</b>	D+/R-	Haut	6-12 mois de GCV/VGCV +/- IgG spécifique	stratégie préemptive
	R+	Intermédiaire	Minimum 6 mois de GCV/VGCV	
<b>Intestin, tissus</b>	D+/R-	Haut	Minimum 6 mois de GCV/VGCV +/- surveillance après prophylaxie	stratégie préemptive +/- IgG spécifique
	R+	Haut	3-6 mois de GCV/VGCV +/- surveillance après prophylaxie	

Pour les receveurs de CSH, la greffe de cellules souches CD34+ est la plus fréquente. Une réactivation du CMVH présent dans les cellules du donneur peut donc être induite par la différenciation cellulaire des CD34+ pour reconstituer le système immunitaire. La réactivation du CMVH pour les patients receveurs de CSH peut atteindre 43% des cas (Takenaka et al., 2015). Il est possible de transférer des LT spécifiques du donneur séropositif pour aider à combattre l'infection à CMVH, mais cela peut engendrer des complications post-greffe. Il est aussi possible de ne transmettre que les LT CD8+ anti-CMVH (Krishna et al., 2019).



Ainsi, l'apparition d'une maladie à CMVH dépend du type de greffe, du statut sérologique du couple donneur/receveur mais aussi de la concentration et du type d'immunosuppresseurs délivrés en post greffe.

### **III.2. Immunité des patients transplantés**

Le contrôle de l'infection à CMVH en post-transplantation requiert l'action des facteurs de l'immunité innée et adaptative.

Les Toll-like récepteurs (TLR) et les cellules natural killer (NK) sont les principaux acteurs de l'immunité innée. Des polymorphismes dans les gènes des TLR sont associés avec un risque plus élevé de développer une maladie à CMVH de même qu'un faible taux de NK (Fernández-Ruiz et al., 2015, 2016).

Les lymphocytes B et les cellules T CD4+ et CD8+ ont aussi un rôle clé dans la lutte contre l'infection à CMVH. Les lymphocytes B (LB), acteurs de l'immunité adaptative, vont produire des anticorps dirigés contre le complexe pentamérique et les protéines gH et gB. Ces immunoglobulines IgG produites par les LB sont nécessaires au contrôle de l'infection à CMVH. Un faible taux d'IgG peut être associé au développement de maladie à CMVH et une hypogammaglobulinémie avec un fort risque de patients qui seront réfractaires au traitement antiviral. Le traitement de ces patients avec des immunoglobulines peut améliorer leurs chances de rémission (Kotton et al., 2018).

### **III.3. Diagnostic de l'infection à CMVH chez le patient transplanté**

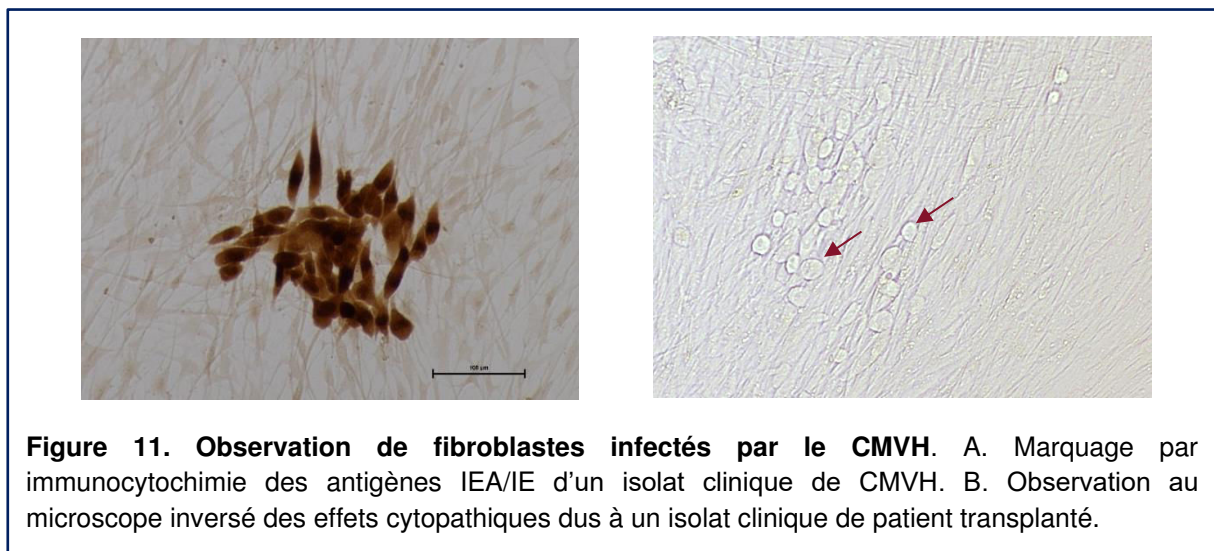
Une évaluation du statut sérologique du couple donneur/receveur avant transplantation est nécessaire pour la prédiction de survenue de complications dues au CMVH. Le statut sérologique est effectué par dosage des immunoglobulines G et M (IgG et IgM) avant la greffe (Azevedo et al., 2015; Kotton et al., 2018).



### III.3.1 Détection directe du CMVH

La détection directe du CMVH peut se faire par plusieurs méthodes qui peuvent être complémentaires :

- **Culture virale** : à partir de sang, urine, liquide amniotique. On recherche l'apparition de cellules cytomégaliqes avec des foyers d'infection en bac de poisson typiques du CMVH (**Figure 11**). Cette technique est peu utilisée en routine car elle est dépendante de l'excrétion du virus dans les liquides corporels et les résultats sont longs à obtenir. Elle garde son intérêt pour isoler un virus et réaliser un antivirogramme en cas de résistance.



**Figure 11. Observation de fibroblastes infectés par le CMVH.** A. Marquage par immunocytochimie des antigènes IEA/IE d'un isolat clinique de CMVH. B. Observation au microscope inversé des effets cytopathiques dus à un isolat clinique de patient transplanté.

- **Détection/quantification de l'ADN viral** : par amplification quantitative (qPCR) de l'ADN du CMVH présent dans le sang total, le plasma, le liquide céphalo-rachidien (LCR), les biopsies de l'organe atteint, l'humeur aqueuse en cas de rétinite. Il est recommandé d'utiliser une trousse commerciale avec des résultats en UI/mL. Du fait de la persistance de différences entre les laboratoires malgré l'usage d'unités internationales des UI/mL, il est préférable que les patients soient toujours suivis dans le même laboratoire. La qPCR est devenu l'outil diagnostique principal pour le suivi des transplantés. Cependant son interprétation est parfois difficile, notamment dans le LBA pour lequel il n'existe pas de seuil définissant une pneumopathie (Schlischewsky et al., 2013), ou les biopsies coliques, qui peuvent être contaminées par le sang

périphérique. L'examen anatomopathologique de biopsies peut ici s'avérer très utile pour conclure à la responsabilité du CMVH dans l'atteinte clinique observée.

- **Examen cytologique et histologique** : détection par immunohistochimie des antigènes du CMVH dans les cellules ou tissus ou observation d'effet cytopathique. Peut permettre la confirmation d'une atteinte d'organe.

### III.3.2 Suivi immunologique des patients transplantés

Le suivi immunologique des patients transplantés pourrait permettre un meilleur contrôle de l'infection à CMVH après la transplantation (Kotton et al., 2018). Le suivi est effectué par différentes méthodes :

- **QuantiFERON-CMV** : détection des IFN- $\gamma$  sécrétés par les lymphocytes T CD8+ après une stimulation peptidique. Permettant d'analyser la réponse immune spécifique, il est prédictif de la survenue d'une virémie à CMVH. Il a été proposé en transplantation pulmonaire comme biomarqueur permettant de suspendre la prophylaxie (Westall et al., 2017) en cas de bonne réponse CD8+.
- **Enzyme-linked immunosorbent spot (ELISpot)** : permet une quantification des LT CD4+ et CD8+ producteurs d'IFN- $\gamma$ . Les cellules B et T isolées sont stimulées avec des peptides spécifiques du CMVH puis le taux d'IFN- $\gamma$  ainsi produit est quantifié. A la différence du QuantiFERON-CMV, l'ELISpot ne peut différencier les CD4+ des CD8+.

### III.4. Non réponse au traitement pour les patients transplantés

La non-réponse au traitement est une problématique majeure dans la prise en charge de l'infection à CMVH. Deux cas sont alors possibles : soit le CMVH développe une résistance au traitement antiviral soit il est dit réfractaire au traitement (résistance virologique non établie).

Une publication collégiale récente définit les termes de résistance et d'infection réfractaire (Chemaly et al., 2019). Les infections réfractaires sont classées en quatre catégories en fonction des symptômes identifiés, de la charge virale et de la réponse au traitement (**Tableau 2**).

Dans les cas de suspicion de résistance, un génotypage de la souche de CMVH permet d'identifier si la souche est porteuse de mutations de résistance. Il est conseillé de conserver des échantillons durant le suivi du patient afin de pouvoir effectuer un diagnostic rétrospectif en cas de non réponse au traitement (Chemaly et al., 2019).

Le risque de survenue de résistances est augmenté par la durée prolongée du traitement antiviral, un traitement inadapté ou une réplication virale active et continue. Le traitement immunosuppresseur est aussi en faveur d'une réplication active du virus (Azevedo et al., 2015).

**Tableau 2. Définition d'infection ou de maladie à CMVH réfractaires et de résistance au traitement.** D'après Chemaly et al., 2019

Termes	Définitions
Infection à CMVH réfractaire	Augmentation de la virémie du CMVH <sup>a</sup> après au moins 2 semaines de traitement avec une posologie appropriée
Probable infection à CMVH réfractaire	Charge virale persistante <sup>b</sup> après au moins 2 semaines de traitement avec une posologie appropriée
Maladie à CMVH réfractaire avec atteinte des organes	Dégradation des signes et symptômes à CMVH ou progression dans les organes cibles après au moins 2 semaines de traitement avec une posologie appropriée
Probable maladie à CMVH réfractaire avec atteinte des organes	Pas d'amélioration des signes et symptômes après au moins 2 semaines de traitement avec une posologie appropriée
Résistance aux antiviraux	Altération du génome viral qui diminue la sensibilité aux antiviraux pour une ou plusieurs molécules <sup>c</sup>

Abréviation : CMVH, cytomégalovirus humain

<sup>a</sup> augmentation, sur une durée supérieure à 2 semaines, de plus de 1log<sub>10</sub> de l'ADN viral du CMVH dans le sang ou le sérum et déterminé par un changement de log<sub>10</sub> par rapport au pic de charge virale de la 1<sup>ère</sup> semaine de charge virale et mesurée dans le même laboratoire avec le même essai.

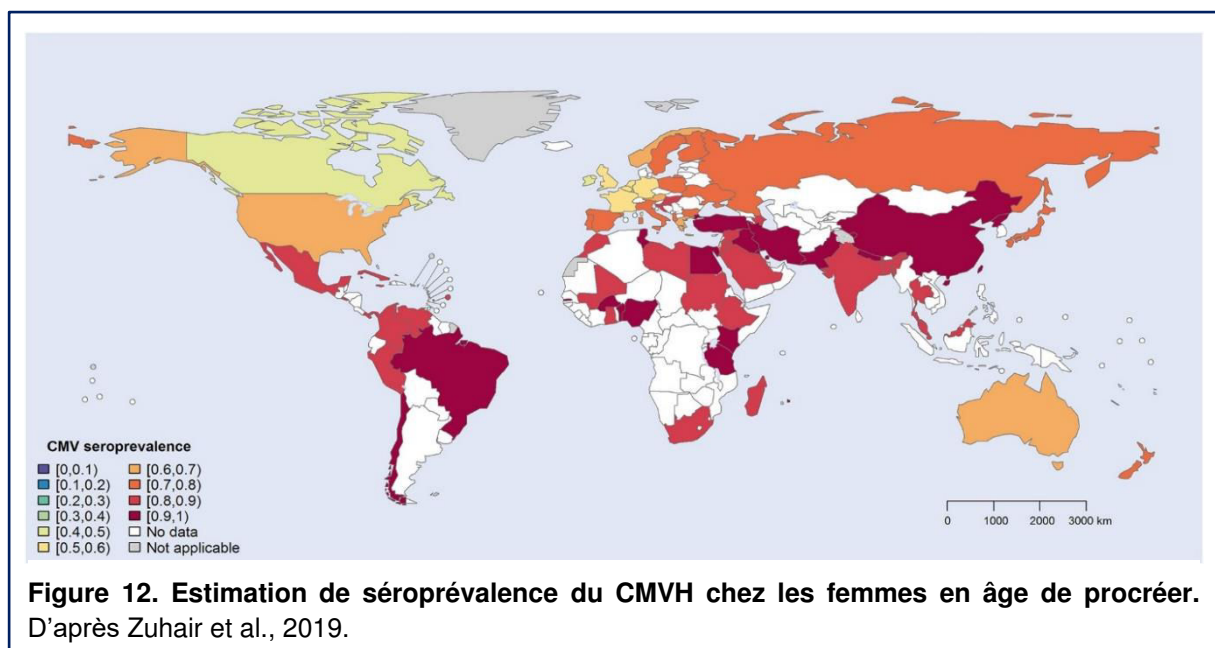
<sup>b</sup> Charge virale constante ou supérieure au pic de charge virale détectée à la 1<sup>ère</sup> semaine mais augmentation du titre d'ADN virale inférieur à 1log<sub>10</sub> avec une mesure faite dans le même laboratoire et avec le même essai.

<sup>c</sup> détection d'une mutation connue pour être impliquée dans l'anabolisme d'un antiviral (eg. phosphorylation du GCV médié par UL97), cible d'un antiviral (eg. UL54, UL97, UL56/UL89/UL51) ou qui compense l'inhibition d'une fonction biologique (eg. UL27).



### Chapitre III : Infection congénitale à CMVH

L'infection congénitale à CMVH (cCMV) touche 0,7% des nouveau-nés avec un taux plus élevé dans les pays à forte séroprévalence (Dietrich and Schieffelin, 2019; Leruez-Ville and Ville, 2017). L'infection à CMVH peut être le résultat d'une primo-infection de la femme enceinte. Cependant, la transmission verticale du CMVH peut aussi être due à une réinfection par une autre souche ou la réactivation de la souche déjà présente. On parle alors d'infection maternelle non-primaire. Le CMVH semble être plus transmis durant la deuxième moitié de la grossesse (Britt, 2018).



La séroprévalence du CMVH varie chez les femmes en âge de procréer comme pour le reste de la population mondiale (**Figure 12**). Le taux d'infection *in utero* est environ de 30% pour les femmes faisant une séroconversion pendant la grossesse (Dietrich and Schieffelin, 2019). Le risque de transmission pourrait être accru pour les femmes avec une forte excrétion virale dans les urines et le sang (Britt, 2018). Les femmes ayant de jeunes enfants sont particulièrement exposées au risque d'infection, les enfants en bas âge étant excréteurs du virus dans la salive et les urines.

Parmi Les nouveau-nés infectés, environ 13% seront symptomatiques à la naissance et en porteront des séquelles permanentes (Dollard et al., 2007). Parmi les enfants asymptomatiques à la naissance, 10 à 15% développeront des séquelles à long terme telle qu'une perte de l'audition.

## I. Manifestations cliniques de l'infection congénitale à CMVH

Les symptômes dus à l'infection congénitale à CMVH ont été classés en fonction des symptômes apparaissant des suite de l'infection par Rawlinson et al., 2017 (**Tableau 3**).

**Tableau 3 : Classement des manifestations cliniques dues au cCMV** D'après Rawlinson et al., 2017

Termes	Symptômes
Infection congénitale à CMVH asymptomatique	Pas de manifestation clinique, et audition normale
Infection congénitale à CMVH asymptomatique avec trouble de l'audition	Pas d'anomalies cliniques apparentes sauf aune perte de l'audition du plus de 21 décibels
Maladie congénitale à CMVH symptomatique légère	Une ou deux manifestations cliniques isolées parmi les suivantes : faible nombre de plaquettes, légère hépatomégalie, augmentation du taux d'alanine amino-transférase
Maladie congénitale à CMVH symptomatique modéré à sévère	Symptômes multiples : thrombopénie, splénomégalie, pétéchie, hépatite Ou atteintes du système nerveux central confirmées par des anomalies à la radiographie ou détection d'ADN viral dans le liquide céphalo-rachidien

Ainsi, l'infection congénitale à CMVH peut être à l'origine de plusieurs symptômes :

- **Perte de l'audition** : l'infection congénitale à CMVH est la première cause de perte d'audition d'origine virale. Elle peut être unilatérale ou bilatérale et sans traitement, se détériore avec le temps. Elle peut être accompagnée d'autres symptômes (voir ci-après) (Dietrich and Schieffelin, 2019).

- **Troubles du développement neural** : l'atteinte du système nerveux central (SNC) peut amener à l'apparition de graves séquelles telles que des microcéphalies, une léthargie ou hypotonie. Certains enfants ont des troubles intellectuels avec un faible score de quotient intellectuel. Des calcifications peuvent se développer dans les zones périventriculaires du cerveau mais aussi des kystes dans différentes zones du cerveau (Dietrich and Schieffelin, 2019).



- **Troubles de la vision** : les séquelles visuelles sont moins fréquentes chez les enfants asymptomatiques que symptomatiques à la naissance. Cependant, elles n'ont pas tendance à se détériorer à la différence des troubles de l'audition. Les symptômes les plus fréquents sont un strabisme ou une atrophie du nerf optique.

## II. Prévention de l'infection congénitale à CMVH

Une première approche pour diminuer les risques d'infection à CMVH repose sur un changement des habitudes de comportement. La prévention de l'infection chez des femmes enceintes à 11 ou 12 semaines de grossesse en contact avec des enfants de moins de 3 ans, a permis de réduire le taux de transmission du CMVH (Revello et al., 2015). Les femmes étaient informées sur la nature du virus ainsi que des risques d'une infection congénitale. Les recommandations étaient de se laver les mains fréquemment après contact avec des enfants en bas âge, ainsi que les surfaces touchées par les enfants. Il a été demandé d'éviter d'embrasser les enfants et ne pas mettre à la bouche les couverts des enfants.

Une étude faite en France, a aussi montré les effets bénéfiques de recommandations d'hygiène sur le taux de transmission du virus pour les femmes enceintes et séronégatives lors de leur première consultation. Sur 3 ans d'étude rétrospective, le taux de séroconversion durant la grossesse n'était que de 0,2%. Sans prévention, le taux est d'environ 1% (Vauloup-Fellous et al., 2009). Même si les recommandations d'hygiène peuvent être bénéfiques sur le taux de transmission de l'infection, un screening systématique de toutes les femmes enceintes n'est pas recommandé pour une détection de primo-infection, la transmission verticale pouvant avoir lieu lors d'une primo-infection mais aussi lors d'une réactivation virale ou d'une réinfection (Rawlinson et al., 2017).

Des recommandations ont été établies par un comité international en 2015. Il est recommandé d'informer les femmes enceintes quant aux risques d'infection à CMVH. Les conseils d'hygiène consistent à ne pas partager la nourriture ainsi que les couverts des jeunes enfants,



éviter le contact avec la salive et se laver les mains surtout lors du change des enfants. Tout traitement préventif est déconseillé en routine ainsi que l'administration d'antiviraux en traitement curatif. Le valganciclovir est conseillé uniquement pour les enfants symptomatiques ayant des séquelles modérées à sévères (Rawlinson et al., 2017).

Des recommandations françaises du Haut Conseil de Santé Publique ont été publiées en 2018. La diffusion large des conseils d'hygiène dans le cadre d'une prévention universelle, sans détermination préalable du statut sérologique CMVH, est recommandée. Cependant, le dépistage systématique n'a pas été recommandé pendant la grossesse ou à la naissance, en dehors des cas de dépistage positif de surdité néonatale bilatérale ou unilatérale (HCSP, 2018).

### III. Diagnostic de l'infection congénitale à CMVH

#### III.1. Diagnostic de l'infection maternelle

Lors de symptômes pseudo-grippaux (fièvre, maux de tête, fatigue) ou d'une échographie laissant suggérer une infection à CMVH, il est conseillé de doser les immunoglobulines G et M (IgG et IgM) spécifiques du CMVH. Cependant, les cas de faux positifs ou faux négatifs ne sont pas exclus du fait de la faible spécificité de certains dosages ou d'une réaction croisée des IgM avec une autre infection virale. Un test d'avidité des IgG peut permettre d'effectuer une discrimination entre une faible avidité au début de l'infection (dans les 3 mois) et une forte avidité témoin d'une infection ancienne ou d'une réinfection (Leruez-Ville and Ville, 2017 ; Rawlinson et al., 2017).

#### III.2. Diagnostic de l'infection du fœtus

La détection d'une infection fœtale peut se faire par différentes méthodes :

- **Par détection d'ADN viral dans le liquide amniotique :** une PCR effectuée sur un prélèvement de liquide amniotique par amniocentèse peut permettre de mettre en évidence de façon assez fiable la transmission du CMVH *in utero*. La mise en culture du liquide sur cellules peut permettre une isolation du virus mais reste moins fiable qu'une PCR. La sensibilité du diagnostic

par PCR est estimée à près de 95%. Les cas de faux négatifs seraient corrélés à une infection tardive lors de la grossesse (Leruez-Ville and Ville, 2017).

- **Imagerie médicale** : des symptômes imputables à une infection à CMVH du fœtus peuvent être détectés par échographie. Une faible croissance du fœtus peut être le témoin d'une infection du placenta voire du fœtus lui-même. Les malformations neurologiques peuvent être visibles en échographie comme des calcifications intracérébrales, une ventriculomégalie ou une microcéphalie (Leruez-Ville and Ville, 2017). Devant des images douteuses en échographie, une IRM peut être envisagée au 3<sup>e</sup> trimestre pour évaluer les atteintes cérébrales.

- **Diagnostic du nouveau-né** : le screening systématique des nouveau-nés pourrait augmenter la prise en charge de la perte d'audition due à une infection à CMVH (Cannon et al., 2014). Le consensus de 2017 recommande donc un diagnostic de l'infection à CMVH pour les nouveau-nés (Rawlinson et al., 2017).

Dans le cas de suspicion d'infection à CMVH, une PCR est effectuée afin de détecter le virus dans le sang ou les urines du nouveau-né. La détection du virus dans la salive montre aussi une bonne sensibilité (97%) et spécificité (99%) (Boppana et al., 2011). Il est tout de même conseillé d'effectuer le diagnostic le plus tôt possible pour éviter les risques de détection d'une infection post-natale (Rawlinson et al., 2017).

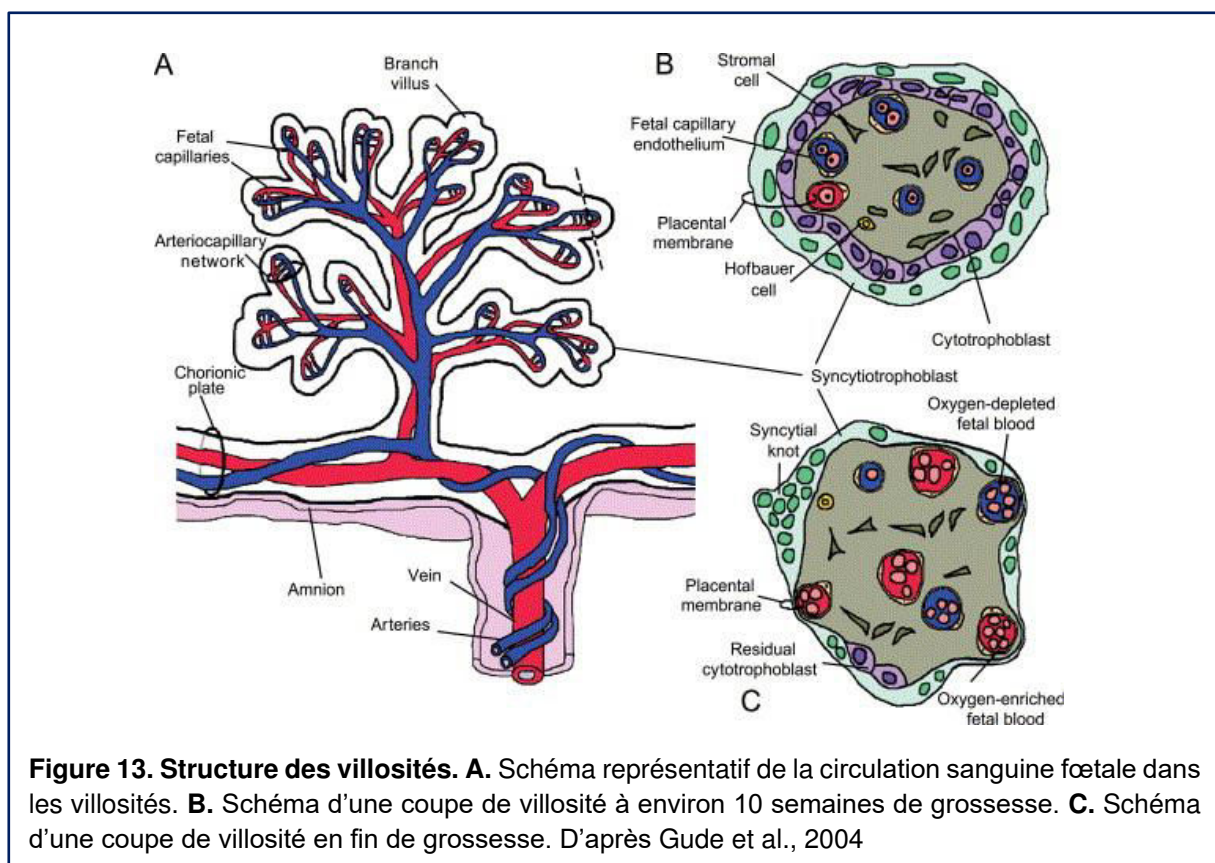
## IV. Transmission du CMVH *in utero*

La transmission du virus du CMVH de la mère au fœtus implique la traversée de l'interface, ou barrière, materno-fœtale qu'est le placenta. Les villosités placentaires, baignant dans le sang maternel, sont le premier tissu fœtal que va rencontrer le virus lors de l'infection. Ces villosités évoluent au cours de la grossesse afin de répondre aux besoins du fœtus en développement.

### IV.1. Structure et développement du placenta

- **Structure du placenta mature :**

Le placenta est composé de structures fœtales dérivées du sac chorionique qui forment la plaque chorionique, et de tissus maternels de l'endomètre qui forment la plaque basale. La plaque chorionique contient les vaisseaux fœtaux qui se développent radialement autour des vaisseaux ombilicaux. Entre la plaque chorionique et la plaque basale, se trouve l'espace intervillosaire contenant les villosités baignant dans le sang maternel. Le sang maternel est apporté dans les cavités via les artères spiralées.



Les villosités sont recouvertes par le syncytiotrophoblaste, une couche de cellules en syncytium. C'est aux extrémités de ces villosités qu'ont lieu les échanges materno-fœtaux. Côté fœtal, le sang pauvre en oxygène circule au travers des artères ombilicales pour arriver dans les capillaires des villosités où ont lieu les échanges materno-fœtaux. Le sang s'enrichi en oxygène et retourne au fœtus par les veines chorioniques puis par la veine ombilicale (**Figure 13.A**) (Gude et al., 2004).

Les villosités sont composées à la fin du 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse de la couche de syncytiotrophoblastes (STB), de cytotrophoblastes, des cellules endothéliales formant les capillaires et de tissu liant ces structures. Les cellules de Hofbauer sont un type de macrophages présent au sein des villosités (**Figure 13.B**). Les villosités matures, perdent la couche de cytotrophoblastes pour que les capillaires soient les plus proches possible des STB et donc du sang maternel (**Figure 13.C**) (Arora et al., 2017; Gude et al., 2004).

Le placenta mature forme une structure d'environ 22 cm de diamètre, 2,5 cm d'épaisseur et pèse autour de 500g (Burton and Fowden, 2015)

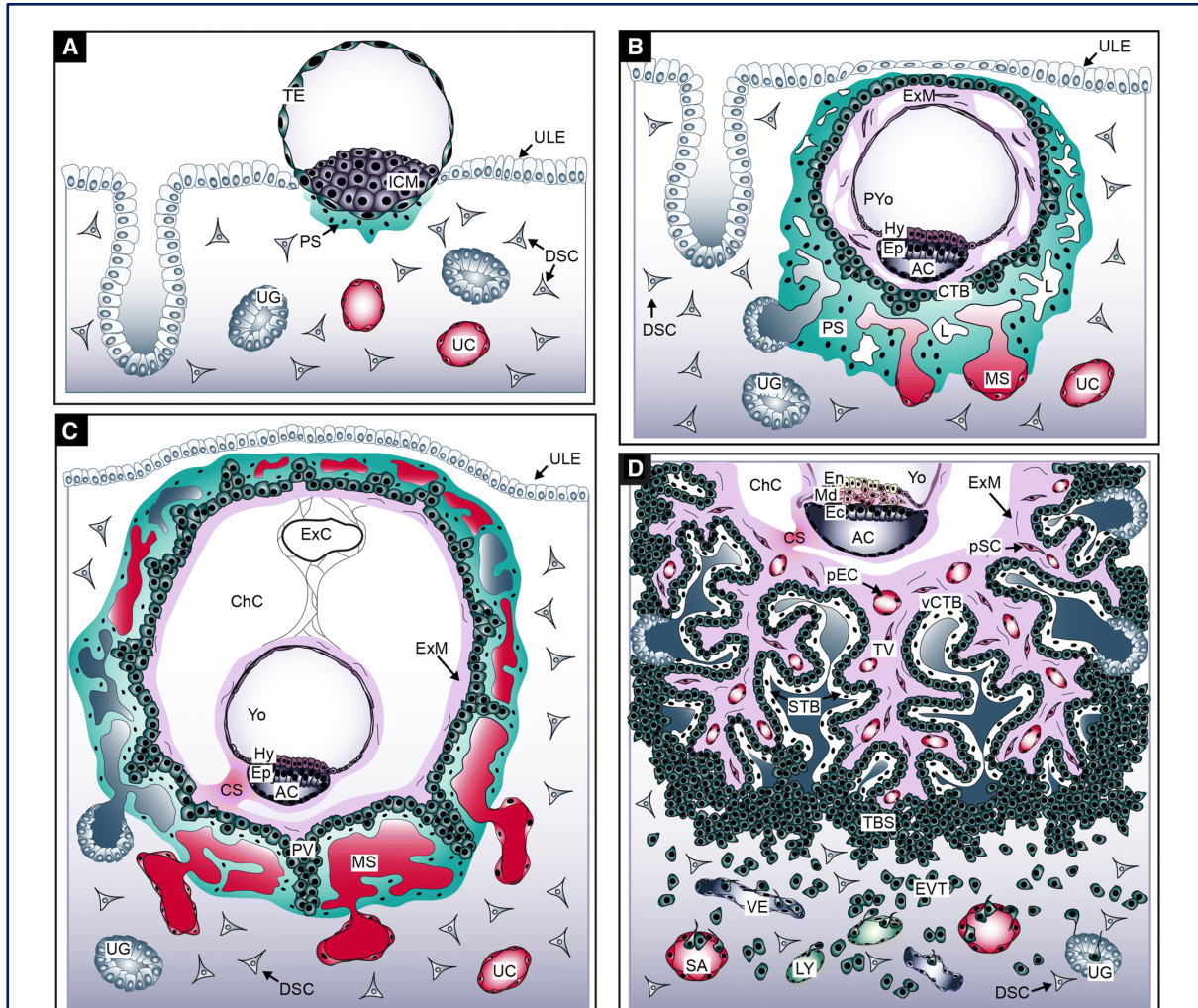
- **Développement des villosités :**

Le développement du placenta débute dans les 6 à 7 jours suivant la conception, lors de l'implantation du blastocyste dans la paroi utérine. Le blastocyste issu de la fécondation de l'ovule par un spermatozoïde est alors composé de deux types cellulaires : la masse cellulaire interne (ICM) et autour les cellules du trophoctoderme (TE).

Suite à l'implantation, les cellules souches du TE vont se différencier en cytotrophoblastes (CTBs) et en syncytium primitif (PS) (**Figure 14.A**, page 52). Les cellules du PS vont se développer pour aller envahir la décidue maternelle. La masse cellulaire interne se différencie en épiblaste et hypoblaste. L'épiblaste se développera en embryon (**Figure 14.B**, page 52).

Des vacuoles vont se former dans le syncytium primitif pour former les espaces lacunaires.

Le développement des villosités débute autour du jour 10 post-conception avec la prolifération des CTBs qui vont former les villosités primaires (**Figure 14.C**).



**Figure 14. Développement du placenta humain durant les 3 premières semaines de grossesse. A.** Implantation du blastocyste dans l'utérus. **B.** Développement des premières structures du placenta et du disque embryonnaire. **C.** Formation des villosités primaires.

**D.** Développement des villosités tertiaires ou matures.

AC cavité amniotique. ChC cavité chorionique. CTB cytotrophoblastes. DSC cellules stromales de la décidue. Ec ectoderme. En endoderme. Ep épiblaste. EVT trophoblastes extravillositaires. ExM mésoderme extra-embryonique. Hy hypoblaste. L système lacunaire. LY vaisseau lymphatique. Md mésoderme. MS sinus sanguin maternel. pEC cellules endothéliales placentaires. PV villosités primaires. SA artère spiralée. TV villosité tertiaire. UC capillaire utérin. UG glande utérine. VE vaisseaux veineux. vCTB CTB villositaires. D'après Knöfler et al., 2019.

L'expansion des villosités se poursuit dans la décidue pour former les villosités secondaires.

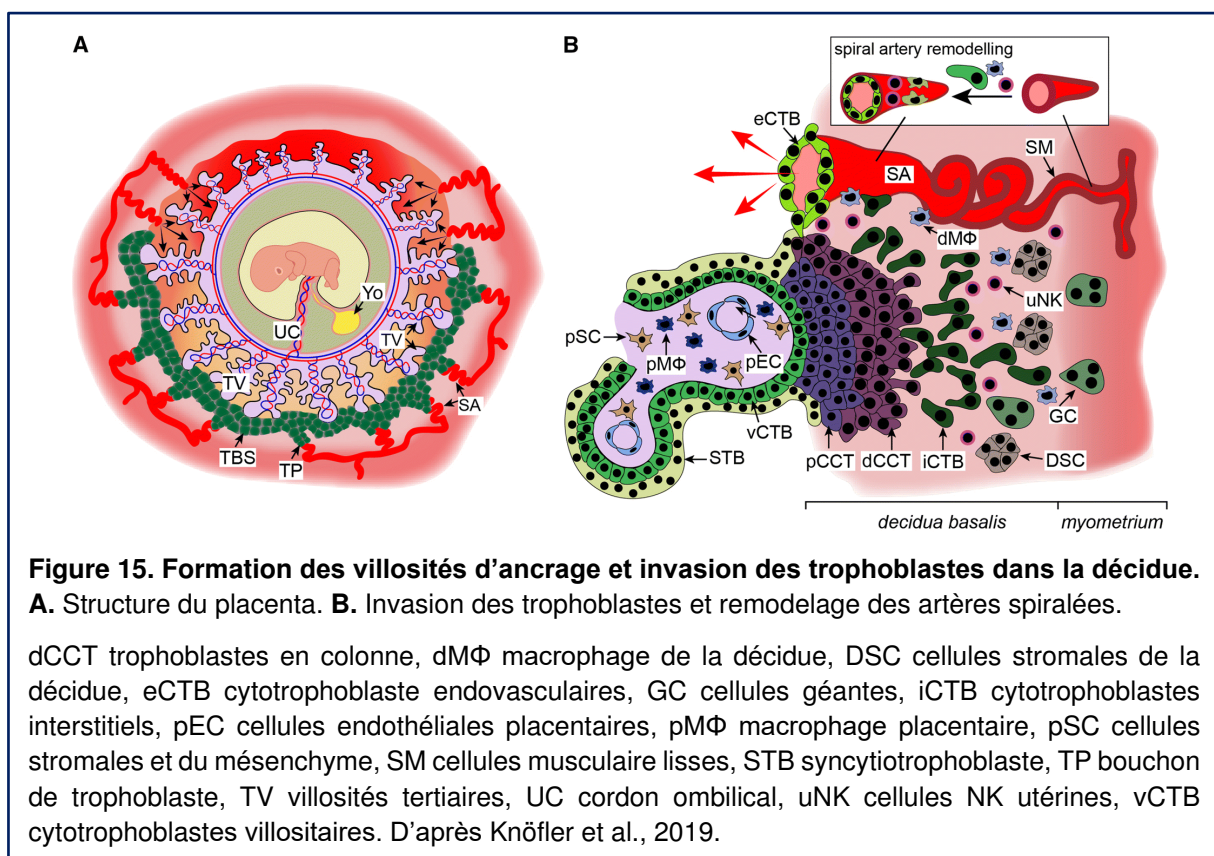
Le mésoderme extra-embryonique dérivé de l'hypoblaste, envahi les villosités primaires et aide à la formation des villosités secondaires.

Les CTBs vont se différencier en syncytium et former la couche de syncytiotrophoblastes (STB) à la surface des villosités. Les syncytiotrophoblastes constituent l'interface avec le sang maternel et vont sécréter la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) ainsi que du lactogène (Knöfler et al., 2019).

Une partie des CTBs situés aux extrémités des villosités, dérive en trophoblastes invasifs extravillositaires (EVTs) à environ 15 jours post-conception. Les EVTs vont eux-mêmes se différencier en CTBs interstitiels (iCTBs) qui vont envahir la décidue et coloniser les artères spiralées maternelles. Une partie de ces iCTBs traverse la couche de syncytiotrophoblastes pour former une colonne qui s'ancrera dans la décidue. Ces iCTBs attachés à la plaque basale permettent de former les villosités d'ancrage à la différence des villosités flottantes qui baignent dans le sang maternel (**Figure 14.D**). Les iCTBs ancrés dans la décidue sont au contact des macrophages et des cellules utérines *natural killer* (uNK) afin de réguler la réponse immunitaire. Les EVTs sont aussi au contact des glandes de la décidue ainsi que du réseau lymphatique de la mère. Cette dernière étape permet de réguler le système immunitaire maternel (**Figure 15**, page 54) (Gude et al., 2004; Knöfler et al., 2019).

Les iCTBs sont recrutés au niveau des artères spiralées, par les uNK et les macrophages et participent au remodelage de ces vaisseaux. Dans ces artères, ils vont peu à peu remplacer les cellules endothéliales maternelles pour permettre un meilleur apport sanguin au niveau des espaces intervillositaires. Cependant, les artères spiralées sont bouchées par des CTBs le temps que les villosités soient matures et que les espaces intervillositaires soient prêts à accueillir le sang maternel (**Figure 15**, page 54). De plus, cela permet à la vascularisation du placenta de se développer, sans risque de production de ROX (*reactive oxygene species*) qui pourraient être délétères dans le développement fœtal. Le bouchon de CTBs se résorbe à la fin du 1<sup>er</sup> trimestre de gestation et permet aux villosités tertiaires de baigner dans le sang maternel et d'avoir ainsi un apport suffisant en oxygène (Gude et al., 2004; Knöfler et al., 2019).

Aux environs de 17 jours post-conception, les villosités évoluent en villosités tertiaires contenant des vaisseaux sanguins placentaires. Les vaisseaux sanguins sont issus de l'évolution du mésoderme extra-embryonnaire qui va former des tubes primitifs de cellules endothéliales. Ces tubes seront consolidés par des péricytes et formeront le réseau sanguin du placenta (**Figure 15**). Le réseau vasculaire du placenta dérive du mésoderme extra-embryonnaire et se développe durant les quatre premières semaines de grossesse. La connexion avec la circulation fœtale ne se fera qu'après 32 jours post-conception. La croissance du réseau vasculaire se poursuit tout au long de la grossesse (Gude et al., 2004; Knöfler et al., 2019).



A la fin du 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse le placenta devient donc hémochorial avec une nutrition du fœtus par contact direct des villosités et du sang maternel. A la fin de la grossesse, les capillaires des villosités sont en contact direct avec les syncytiotrophoblastes pour diminuer la distance lors des échanges de nutriments entre le sang maternel et fœtal (Knöfler et al., 2019). La couche de syncytiotrophoblastes joue aussi un rôle préventif contre d'éventuelles infections microbiennes (Arora et al., 2017).



- **Fonctions endocrines du placenta :**

Le placenta produit diverses hormones dont la progestérone, la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) ou le lactogène. La progestérone est excrétée dans la circulation maternelle et fœtale afin d'éviter les contractions utérines. L'hormone hCG est une glycoprotéine produite par les trophoblastes et est surtout sécrétée dans la circulation fœtale. La fusion des CTBs est induite en partie par la hCG qui est produite au début de la grossesse avec un pic à 9 semaines pour chuter autour de 12 semaines et de nouveau augmenter en fin de grossesse. Le lactogène est synthétisé par les syncytiotrophoblastes et participe au développement embryonnaire. Il serait aussi impliqué dans l'angiogenèse. Le placenta produit aussi diverses hormones de croissance ainsi que des cytokines et chimiokines (Gude et al., 2004).

- **Immunité du placenta :**

A l'interface materno-fœtale sont localisées nombre de cellules de l'immunité participant soit à la protection contre les pathogènes soit participant à la tolérance materno-fœtale. Les cellules immunitaires constitueraient environ 40% de la décidue. Les cellules NK de la décidue (dNK) seraient la population majeure de cellules de l'immunité. Sont aussi présents des macrophages, des lymphocytes T CD4+ et CD8+. Les cellules dNK ne s'attaquent pas aux CTBs présents dans la décidue et participent à la tolérance vis-à-vis des cellules fœtales (Manaster and Mandelboim, 2010).

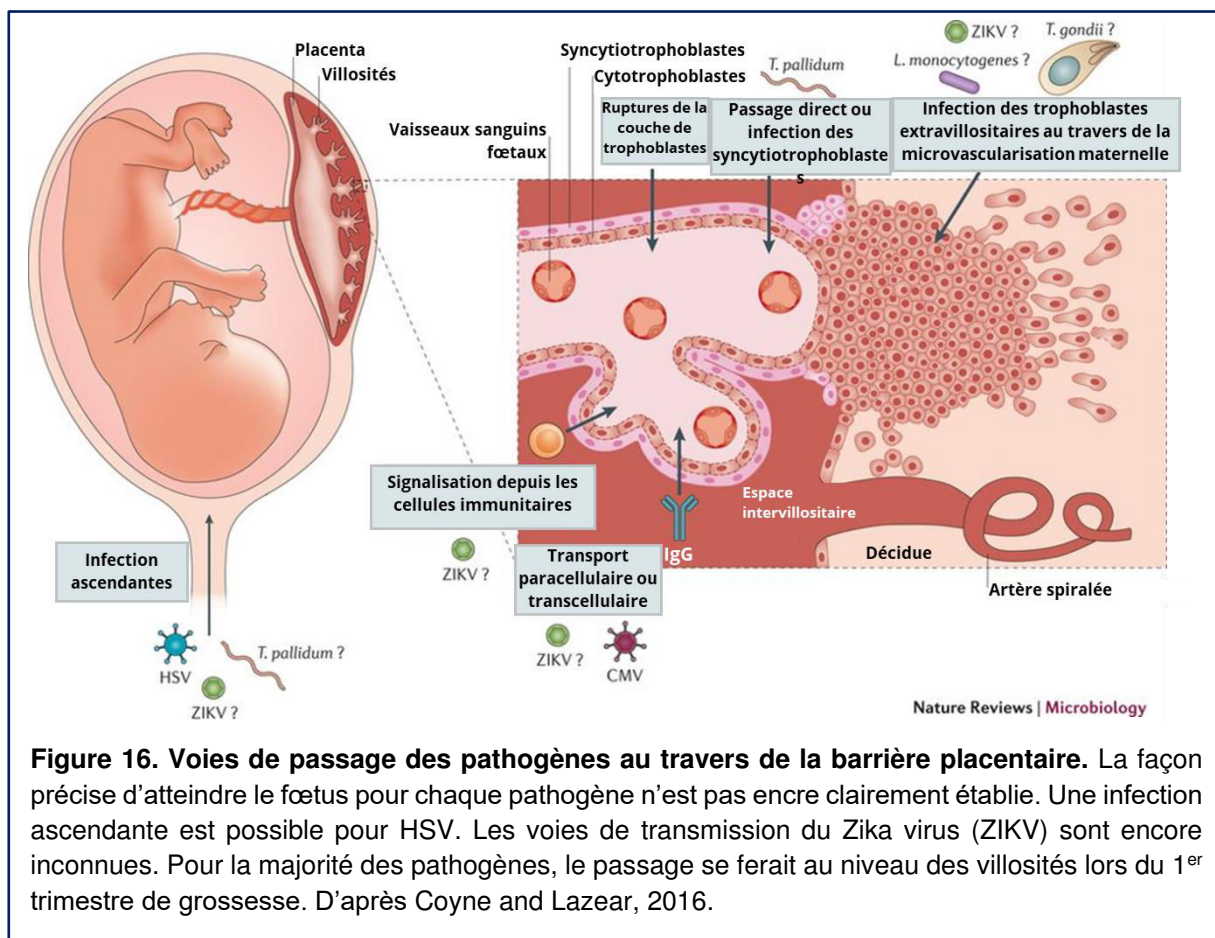
Les macrophages présents dans l'environnement du placenta ont un phénotype immunosuppresseur (M2) maintenu par les cytokines de la décidue. La neutralité des cellules NK est maintenue par les macrophages afin de protéger les CTB de l'attaque des NK. Les CTB mais aussi les macrophages expriment les chimiokines CLCL12/SDF-1 et CXCR4 pour le recrutement de cellules immunitaires.

Les cellules dNK sont moins cytotoxiques que les cellules NK périphériques. Cependant, elles conservent leur activité cytotoxique lors d'un contact avec des cellules infectées par exemple par le CMVH. Les cellules de l'immunité adaptative sont aussi présentes. Les cellules T CD4+ et CD8+

sont associées à un faible taux de transmission du virus lors d'une réponse lymphoproliférative. S'ajoute à la réponse immunitaire les IgG qui ont un rôle crucial d'immunité passive. Les IgG peuvent traverser la barrière placentaire en se liant aux récepteurs FcRn exprimés par les syncytiotrophoblastes. Les FcRn sont moins exprimés au début de la grossesse qu'en fin de grossesse (Itell et al., 2017a).

#### IV.2. Voies de transmission des pathogènes et rôle des syncytiotrophoblastes contre les infections

Les principaux pathogènes capables de traverser la barrière placentaire et responsables d'une infection congénitale, sont regroupés sous le terme TORCH. Il désigne le *Toxoplasma gondii*, le virus de la rubéole, le CMV et HSV-1 et 2 (Coyne and Lazear, 2016) et les autres dont *Listeria monocytogenes*, *Treponema pallidum*, VZV, VIH, les entérovirus et le parvovirus B19 (Coyne and Lazear, 2016).



**Figure 16. Voies de passage des pathogènes au travers de la barrière placentaire.** La façon précise d'atteindre le fœtus pour chaque pathogène n'est pas encore clairement établie. Une infection ascendante est possible pour HSV. Les voies de transmission du Zika virus (ZIKV) sont encore inconnues. Pour la majorité des pathogènes, le passage se ferait au niveau des villosités lors du 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse. D'après Coyne and Lazear, 2016.

L'infection du fœtus est en partie inhibée par les syncytiotrophoblastes qui ont un rôle protecteur contre de nombreux agents pathogènes. Ainsi, ils sont non permissifs aux infections par *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*, ou par des virus tels que HSV1, le virus Zika (ZIKV) ou le CMVH. Le ZIKV est capable d'infecter les villosités de 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse, dont les CTBs, mais ne peut infecter les syncytiotrophoblastes (Tabata et al., 2016). Il en est de même pour le CMVH (Fisher et al., 2000). Le parasite *Toxoplasma gondii*, est aussi impuissant pour infecter les syncytiotrophoblastes, cependant une lésion dans la couche de syncytiotrophoblastes peut permettre au parasite d'accéder au centre de la villosité et de pouvoir s'y répliquer. Le moment de l'infection durant la grossesse peut donc déterminer la gravité de cette infection pour le fœtus (**Figure 16**) (Arora et al., 2017).

### **IV.3. Evolution du CMVH dans le placenta et modifications induites.**

Le risque d'infection à CMVH entre le début et la fin de la grossesse n'est pas constant. Le risque est plus élevé en fin de grossesse qu'en début de grossesse (Enders et al., 2011).

L'infection du placenta par le CMVH peut interférer avec le développement correct du placenta lors de la grossesse. Des changements physiopathologiques peuvent avoir lieu tels qu'une inflammation du placenta, des calcifications, des villosités non vascularisées ou encore des œdèmes (Pereira et al., 2017). Le CMVH favorise l'expression de nombreuses cytokines dont certaines sont retrouvées dans le liquide amniotique (TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12, CXCL-10, CCL2 et 4, GM-CSF...) (Scott et al., 2012). Un fort taux de cytokines pro-inflammatoires dans le liquide amniotique peut être un signe de complications lors de la grossesse. De plus, un placenta infecté aura tendance à être en hypoxie ce qui peut conduire à un défaut de croissance du fœtus (Pereira, 2018).

Le CMVH infecte la décidue et est capable de se répliquer dans les CTBs présents dans la décidue (Pereira et al., 2017; Weisblum et al., 2011). Il perturbe aussi le développement des villosités d'ancrage. Le CMVH est aussi capable de se répliquer dans les cellules progénitrices des

trophoblastes. Ceci inhibe la capacité des CTBs à former des syncytia. L'infection des cellules progénitrices conduit à une baisse d'hCG sécrétées normalement par les syncytiotrophoblastes ce qui laisse suggérer une baisse du nombre de ces cellules. Le phénotype des cellules progénitrices peut être restauré par traitement avec un anticorps anti-gB (Pereira et al., 2017).

Dans la décidue, le virus infecte les cellules épithéliales et se transmet de cellules à cellules jusqu'aux CTB invasifs. Cependant, seul les CTBs des villosités flottantes exprimeraient les intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 3$  nécessaires à l'entrée du virus dans la cellule. Ces intégrines ne sont pas exprimées par les CTB qui servent d'ancrage aux villosités. Les syncytiotrophoblastes expriment le récepteur de l'EGFR que peut reconnaître le CMVH mais n'auraient pas les  $\beta$ -intégrines nécessaires pour la fusion du virus avec la membrane (Maidji et al., 2007).

Les syncytiotrophoblastes participent aux échanges nutritionnels entre la mère et le fœtus et expriment le récepteur FcRn permettant le passage des IgG maternels servant d'immunité passive. Les IgG de la mère auraient un rôle à double tranchant avec soit la prévention de l'infection soit sa facilitation. Les particules virales, liées aux IgG, seraient capables d'utiliser les FcRn pour rentrer dans les syncytiotrophoblastes, les CTBs ainsi que dans les macrophages des villosités (Maidji et al., 2006).

Les cellules des villosités infectées par le CMVH seraient essentiellement les cellules endothéliales et des fibroblastes, des macrophages et trophoblastes. La villite (infection des villosités) est plus fréquente chez les femmes ayant eu un nouveau-né symptomatique après une infection congénitale à CMVH. Le nombre de cellules infectées est aussi inversement proportionnel au moment de l'infection durant la grossesse (Uenaka et al., 2019).

Le CMVH pourrait aussi profiter de l'inactivité des macrophages M2 rendus incapables de répondre à l'induction de l'IFN produit normalement lors d'une infection virale.

## Chapitre IV : Traitements de l'infection à CMVH

Les molécules antivirales ciblant le CMVH sont virostatiques et ciblent la polymérase virale pUL54. De nouvelles molécules dirigées contre d'autres cibles sont en cours d'essais cliniques ou ont obtenu des autorisations de mise sur le marché pour un cadre d'utilisation bien précis. Il n'existe pas encore de vaccins commercialisés contre l'infection à CMVH mais plusieurs sont en cours de développement ou d'essais cliniques.

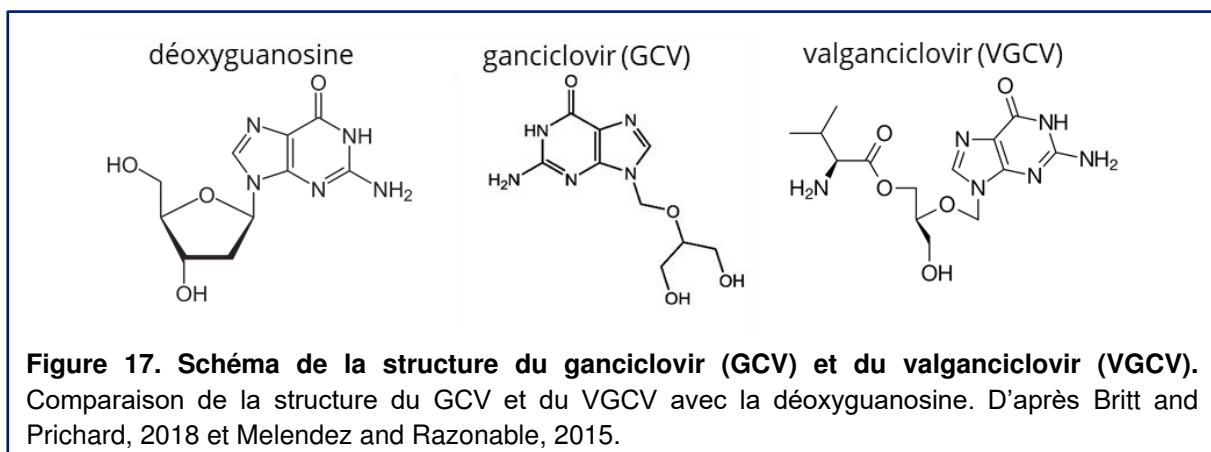
### I. Inhibiteurs de la polymérase virale pUL54

Les premières molécules utilisées dans le traitement de l'infection à CMVH ont pour cible la polymérase virale pUL54. Ils inhibent l'élongation de l'ADN viral soit par compétition avec les nucléosides soit en bloquant les sites d'actions de la polymérase. Ces molécules sont toutes virostatiques.

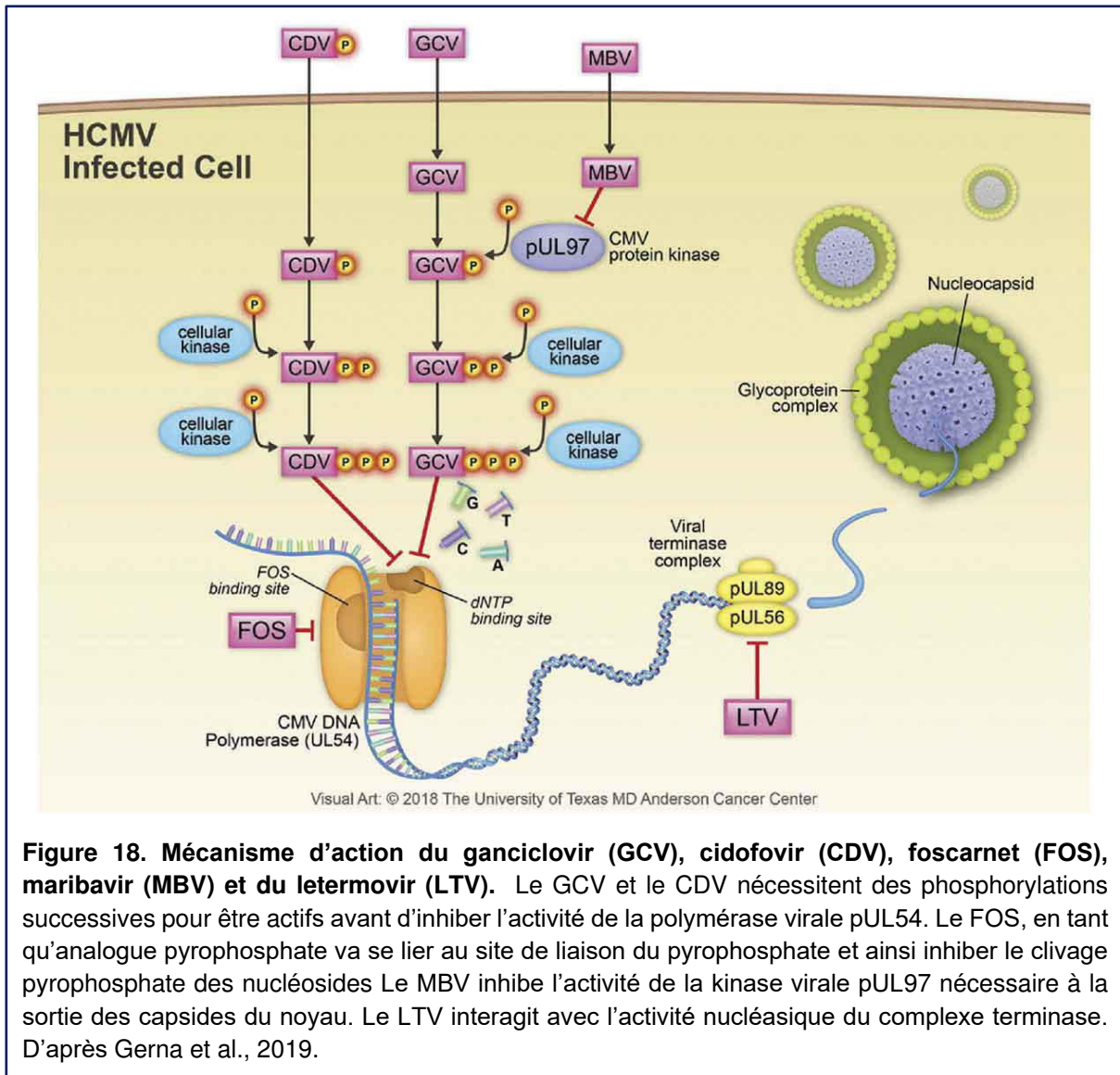
#### I.1. Ganciclovir et valganciclovir

Le ganciclovir (GCV) est le traitement de référence de l'infection à CMVH. Délivré pour la première fois pour le traitement de la rétinite à CMVH pour les patients atteints du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) (Dhillon, 1994), il est aujourd'hui utilisé dans un cadre plus large.

Le GCV, ou 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxyméthyl)-guanine, est un analogue nucléosidique synthétique de la 2-déoxyguanosine (**Figure 17**). Il va inhiber l'élongation de l'ADN viral par la polymérase pUL54 par compétition avec la 2-déoxyguanosine.



Pour être actif, le GCV doit être triphosphorylé. Il subit une première phosphorylation par la kinase virale pUL97 puis deux autres phosphorylations effectuées par des kinases cellulaires (**Figure 18**) (Britt and Prichard, 2018; Krishna et al.).



Le GCV est délivré par voie intraveineuse dans le traitement de l'infection à CMV ou en prophylaxie pour les patients SOT. En traitement préventif, la posologie recommandée est de 5mg/kg toutes les 24 heures, en traitement curatif la recommandation est de 5mg/kg toutes les 12 heures (Kotton et al., 2018).

Une prodrogue orale du GCV, le valganciclovir (VGCV), offre une bonne biodisponibilité avec des taux plasmatiques de GCV équivalents à ceux obtenus par voie intraveineuse. Le VGCV doit subir

une étape d'hydrolyse avant d'être phosphorylé par pUL97 puis par les kinases de la cellule hôte (Jung and Dorr, 1999; Krishna et al.). Le VGCV est aussi utilisé en clinique pour les patients transplantés d'organes solides. Il est délivré *per os* à 900 mg toutes les 12 heures en traitement curatif et toutes les 24 heures en préventif. Pour les patients ayant subi une greffe de rein, les doses sont adaptées en fonction de la clairance rénale (Kotton et al., 2013, 2018).

Chez le nouveau-né ayant une infection symptomatique congénitale à CMVH, le GCV (ou VCGV) a démontré une bonne efficacité pour diminuer les atteintes neurologiques. Ainsi, des doses de 6mg/kg de GCV toutes les 12 heures par voie intraveineuse (IV) pendant 6 semaines, ou de 16 mg/kg de VCGV *per os* 2 fois par jour, ont montré une amélioration de l'audition sur un suivi allant jusqu'à 24 mois (Kimberlin et al., 2003, 2015). L'efficacité du VGCV a aussi été démontré pour des enfants ayant une perte d'audition (sans aucuns autres symptômes du au CMVH). Le traitement par le VGCV a permis d'éviter une détérioration de l'audition avec parfois une amélioration des fonctions auditives (Pasternak et al., 2018).

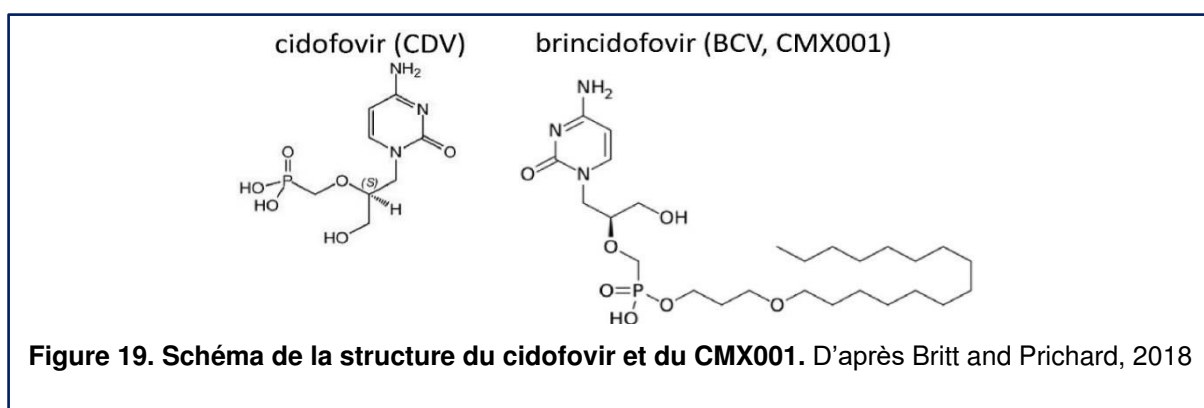
Malgré l'efficacité de ces deux molécules, les effets secondaires qu'elles induisent ne sont pas négligeables et peuvent entrainer l'arrêt du traitement. Le GCV et VCGV peuvent entrainer l'apparition d'une neutropénie ou d'une thrombopénie, et ont un effet myélosuppresseur (Britt and Prichard, 2018; Kotton et al., 2018; Krishna et al.).

En plus d'une toxicité éventuelle, des mutations décrites sur les gènes *UL54* et *UL97* peuvent conférer différents niveaux de résistances au GCV (ou au VCGV) (Chou, 2015a; Chou et al., 2017; Lurain and Chou, 2010). Un cas de résistance au VCGC a aussi été décrit chez l'enfant dans le traitement d'une infection congénitale à CMVH (Morillo-Gutierrez et al., 2017).

En dépit des effets secondaires et de l'apparition de résistance au traitement, le GCV reste une molécule de choix dans le traitement de l'infection à CMVH.

## I.2. Cidofovir et brincidofovir

Le cidofovir ou CDV, est un analogue nucléosidique de la désoxycytidine monophosphate. A la différence du GCV, il possède déjà un groupement phosphate dans sa structure (**Figure 19**). Le CDV est donc phosphorylé directement par les kinases cellulaires sans phosphorylation préalable par la kinase pUL97 (**Figure 18**, page 60) (Britt and Prichard, 2018). Il agit par compétition avec la désoxycytidine lors de l'élongation de l'ADN viral par pUL54. Après deux incorporations de CDV dans l'ADN viral, l'élongation est significativement moins efficace (Xiong et al., 1997).



Le CDV possède un large spectre d'activité et est efficace non seulement contre le CMV mais aussi contre d'autres virus tels que le papillomavirus, l'adénovirus, le polyomavirus et l'orthopoxvirus (Andrei et al., 2015; Britt and Prichard, 2018).

Le CDV a une faible biodisponibilité ainsi qu'une faible perméabilité membranaire. Le transport intracellulaire du CDV est facilité par des transporteurs d'anions organiques 1 (OAT1), présents dans les cellules des tubules rénaux. Les cellules exprimant ces récepteurs sont plus sensibles au CDV (Zhang et al., 2015). Ceci peut expliquer la néphrotoxicité induite par le CDV. Du fait de cette toxicité, le CDV est plus souvent donné en seconde intention ou pour des patients réfractaires au GCV (Bonatti et al., 2017; Britt and Prichard, 2018).

De par la toxicité et la faible biodisponibilité du CDV, un dérivé du CDV moins néphrotoxique a été développé. Le brincidofovir (BCDV) ou CMX001 (hexadécyclopropyl CDV) possède un groupement lipidique qui lui confère une meilleure biodisponibilité (Gerna et al., 2019a) ainsi



qu'une absence de néphrotoxicité car il n'est pas un substrat des transporteurs OAT1 (Tippin et al., 2016). Comme le CDV, il possède un large spectre antiviral et a donc une activité contre certains poxvirus, le polyomavirus ou HSV (Lanier et al., 2010; Gosert et al., 2011; Prichard et al., 2011; El-Haddad et al., 2016).

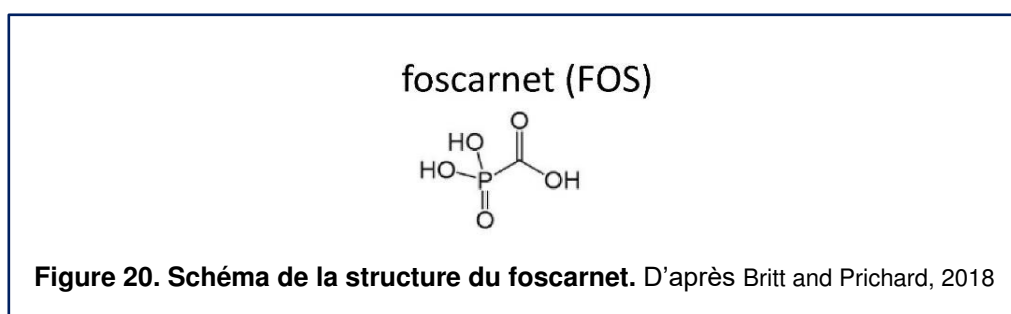
La première étude de pharmacocinétique et de toxicité chez l'Homme ne démontrait aucun effet secondaire lié à la dose (1 mg/kg tous les 6 jours) et aucune néphrotoxicité (Painter et al., 2012). Le BCDV a été donné en traitement préemptif pour des patients receveurs de CSH séropositifs au CMVH avec une posologie de 100 mg deux fois par semaine. Les symptômes dus au CMVH ont été significativement réduits avec toutefois l'apparition d'effets indésirables (diarrhée) avec une posologie supérieure à 200 mg/semaine (Marty et al., 2013). Cependant, la phase III d'essai clinique, démontre une efficacité antivirale mais sans supériorité du BCDV face au placebo en prévention de l'infection à CMVH. Le BCDV permet une chute du taux d'infection du CMVH jusqu'à 14 semaines de traitement mais avec une rechute de la charge virale après l'arrêt de la prophylaxie (suivi de 14 à 24 semaines). La toxicité gastro-intestinale induite par le BCDV rend difficile de conclure sur le bénéfice de la molécule. Une administration par voie IV du BCDV pourrait réduire les effets indésirables liés à la molécule (Marty et al., 2019).

Les mutations de résistances au CDV et BCDV sont situées exclusivement sur le gène *UL54*. Ces deux molécules n'interagissant pas avec la kinase pUL97, aucune mutation de résistance au CDV ou BCDV n'a été relevée sur le gène *UL97*. Cependant des résistances croisées avec le GCV et parfois avec le foscarnet sont possibles sur le gène *UL54* (Chou et al., 2016 ; Fischer et al., 2016 ; Lurain and Chou, 2010).



### I.3. Foscarnet

Le foscarnet (FOS) ou acide phosphonoformique, est un analogue pyrophosphate (**Figure 20**). Utilisé pour traiter l'infection à CMVH ainsi que la plupart des virus de la famille des *Herpesviridae* comme le VZV, il a aussi montré des effets anti-VIH (Gnann Jr., 2007; Wagstaff and Bryson, 1994). Le FOS se lie au site de liaison du pyrophosphate de l'ADN polymérase pUL54 et empêche ainsi le clivage du pyrophosphate des nucléosides triphosphates lors de l'élongation de l'ADN viral (**Figure 18**, page 60).



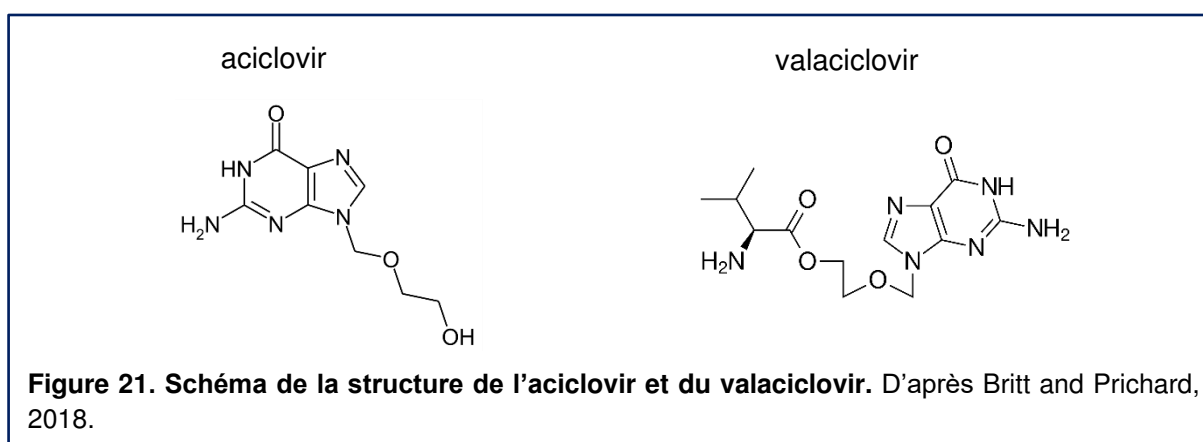
Le FOS ne requiert aucune modification dans sa structure pour être actif (Britt and Prichard, 2018; Gerna et al., 2019a).

Donné dans un premier temps pour le traitement de la rétinite à CMVH chez les patients VIH, le FOS est donné le plus souvent après un échec thérapeutique du GCV pour les patients transplantés.

Les mutations de résistances au FOS sont situées dans le gène *UL54* et peuvent donner lieu à des résistances croisées avec le GCV (Chou, 2015a; Hantz et al., 2010; Lurain and Chou, 2010). Le FOS est néphrotoxique et peut induire une myélosuppression et des ulcérations des muqueuses (Britt and Prichard, 2018; Gerna et al., 2019a).

#### I.4. Aciclovir et valaciclovir

L'aciclovir (ACV) et sa prodrogue plus couramment utilisée, le valaciclovir (VACV) (**Figure 21**), ciblent, comme le GCV, la polymérase virale du CMVH et doivent être triphosphorylés pour être actifs. L'ACV est la référence pour le traitement de l'infection à HSV et il est 40 fois moins efficace sur le CMVH *in vitro* et n'est donc pas utilisé dans le traitement de l'infection à CMVH (Britt and Prichard, 2018). Avant la mise sur le marché du VGCV, le VACV a cependant été proposé en prophylaxie primaire de l'infection à CMVH (Kervan et al., 2016).

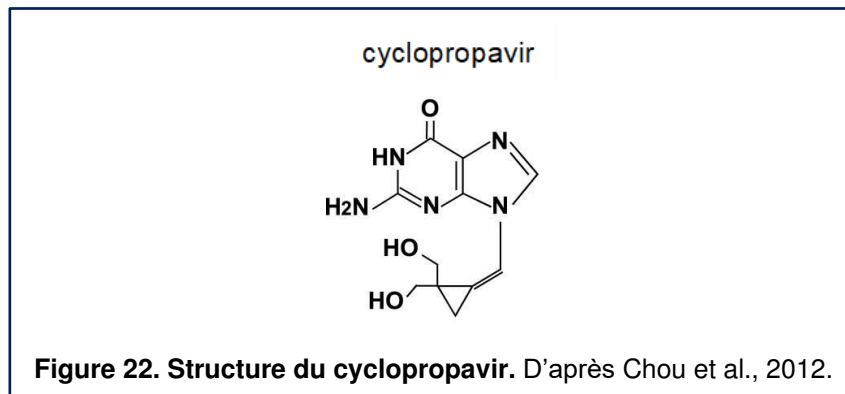


L'utilisation de VACV à 2 g quatre fois par jour pendant 90 jours réduit l'apparition de maladie à CMVH dans le groupe séropositif ou séronégatif vis-à-vis du CMVH en comparaison de l'utilisation d'un placebo (suivi des patients jusqu'à 6 mois) (Lowance et al., 1999). Cependant, il ne présente pas d'avantages majeurs en prophylaxie en comparaison avec le VGCV (Reischig et al., 2015).

Le VACV a été évalué chez la femme enceinte. Il a été délivré à des femmes enceintes avec une confirmation de l'infection du fœtus pour une posologie de 2 g quatre fois par jours jusqu'à l'accouchement. Même si aucune baisse de la charge virale dans le liquide amniotique n'a été relevé, le VACV a pu réduire significativement la charge virale dans le sang fœtal (Jacquemard et al., 2007). Plus tard, une seconde étude démontre la bonne tolérance de ce traitement. Les femmes retenues pour l'étude ont été soit exposées au VACV ou à l'ACV 4 semaines avant la conception ou tout au long de la grossesse. L'exposition à ces deux antiviraux n'a pas été sources d'apparition d'anomalies congénitales pour les nouveau-nés (Pasternak and Hviid, 2010). De plus, à très fortes

doses le VACV a démontré un bénéfice dans le traitement de l'infection congénitale à CMV. Donnée à 8 g par jour chez les femmes enceintes avec un fœtus présentant des signes d'infection à CMV, 34 nouveau-nés sur 43 étaient asymptomatiques à la naissance avec une chute de la charge virale dans le sang. Le VACV a été bien toléré même à fortes doses (Leruez-Ville et al., 2016).

### I.5. Cyclopropavir

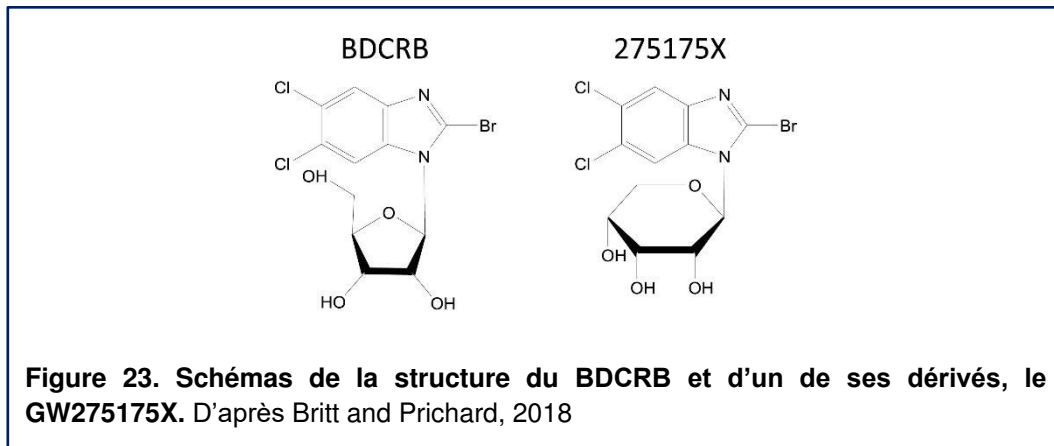


Le cyclopropavir ou filociclovir est un analogue méthylène-cyclopropane de la guanine (**Figure 22**). Il est efficace contre plusieurs cytomégalovirus tels que le CMV, le CMV du rat (RCMV), de la souris (MCMV) ou encore du rhesus macaque (RhCMV), ainsi que les herpesvirus HHV-6 et HHV-8. Comme le GCV, il doit être triphosphorylé pour être actif avec une première phosphorylation par pUL97 (Gentry et al., 2010) et cible la polymérase virale pUL54 (Britt and Prichard, 2018; Chou et al., 2012). La phase Ib d'essai clinique montre que des doses allant jusqu'à 750 mg/jour sur une durée de 22 jours n'induisent que des effets secondaires légers (Rouphael et al., 2019).

## II. Inhibiteurs du complexe terminase

Face aux problèmes de toxicité et à l'apparition de plus en plus fréquente de résistances aux antiviraux ciblant la polymérase virale, il est nécessaire de développer de nouvelles molécules anti-CMV. Le complexe terminase, composé des protéines pUL56/pUL89/pUL51, est strictement viral et ne possède aucune homologie avec des protéines cellulaires. Il est donc une cible de choix dans le développement de nouvelles thérapeutiques anti-CMV.

## II.1. BDCRB



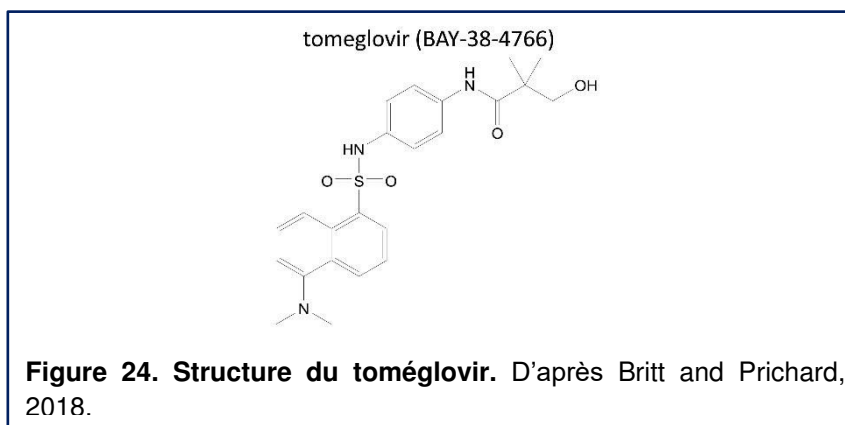
Le 2-bromo-5,6-dichloro-1- $\beta$ -d-ribofuranosyl benzimidazole ou BDCRB (**Figure 23**) inhibe l'action du complexe terminase par interaction avec la sous-unité pUL89 (Underwood et al., 1998). Il fait partie des premières molécules découvertes pour inhiber le complexe terminase et n'a pas besoin d'être phosphorylé pour être actif (Krosky et al., 2002). *In vivo*, le BDCRB possède une activité contre le GPCMV du cobaye (Nixon and McVoy, 2004).

Des mutations de résistances au BDCRB ont été identifiées sur les gènes *UL56* et *UL89* ce qui suggère que pUL89 serait aussi une cible de cette molécule (Krosky et al., 1998).

Un dérivé du BDCRB est en développement, le GW275175X (2-Bromo-5,6-dichloro-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)-1H-benzimidazole) (**Figure 23**) qui serait plus stable. Des résistances ont été mises en évidence dans les gènes *UL56* et *UL89* et aucune étude clinique n'est en cours pour le moment (Britt and Prichard, 2018).

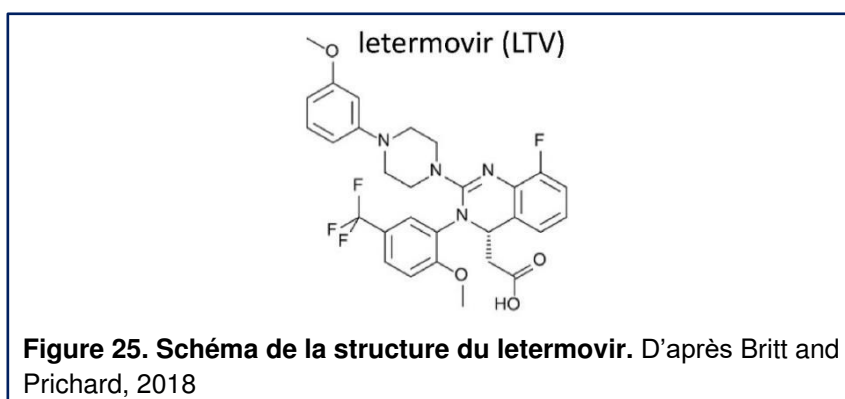
## II.2. BAY-38-4766

Le composé BAY-38-4766 ou toméglovir (**Figure 24**), cible le complexe terminase et montre une activité anti-CMVH et anti-MCMV (Reefschlaeger et al., 2001). Il est plutôt bien toléré chez l'animal. Des mutations de résistances croisées avec le BDRCB et le LTV ont été identifiées *in vitro* sur *UL56* et *UL89* (Chou, 2017a).



## II.3. Letermovir

Le letermovir (LTV), AIC246 ou MK-8228 (**Figure 25**), est un antiviral de la classe des quinazolines. Il cible pUL56, la grande sous-unité du complexe terminase (**Figure 18**, page 60) (Goldner et al., 2011). *In vitro*, le LTV est efficace à des doses 400 fois inférieures aux doses efficaces du GCV (LTV  $EC_{50}$  = 4,5nM ; GCV  $EC_{50}$  = 2 $\mu$ M) (Lischka et al., 2010). Cependant, le LTV ne possède qu'une activité anti-CMVH et n'est actif contre aucun autre virus (Marschall et al., 2012).



Le LTV a été utilisé en prophylaxie à 60 mg, 120 mg ou 240 mg/jour par voie orale et pour des patients receveurs de CSH séropositifs au CMVH pour une durée de traitement de 12 semaines. La

dose de 240 mg/jour a permis de réduire le taux d'infection à CMVH (Chemaly et al., 2014). D'autres essais ont démontré l'intérêt du LTV dans la prévention des complications dues au CMVH pour les receveurs de CSH. Ainsi, pour des doses de 480 mg/jour ou de 240 mg/jour en combinaison avec la cyclosporine pour une durée de 100 jours de traitement, le LTV a un effet protecteur et ce, jusqu'à 24 semaines de suivi post-transplantation (Marty et al., 2017).

Le LTV a donc été évalué en 2009 (Phase IIa) sur une cohorte de patients transplantés de rein, puis 2010 en ATU pour les patients transplantés de poumons avec une maladie à CMVH et des résistances multiples aux antiviraux (Melendez and Razonable, 2015).

Finalement, le LTV a été approuvé par la FDA en janvier 2017 et par l'EMA en janvier 2018 dans le cadre d'un traitement prophylactique des receveurs de CSH. Le LTV est le premier antiviral ciblant le complexe terminase à avoir une autorisation de mise sur le marché. Il est administré à 480 mg/jour entre 0 et 28 jours post-transplantation pour une durée allant jusqu'à 100 jours après la greffe pour les receveurs de CSH séropositifs au CMVH (Gerna et al., 2019a). Il est aussi en étude de phase II pour l'efficacité et la toxicité chez les patients réfractaires aux traitements et avec une maladie à CMVH (Coppock and Blumberg, 2019). Le LTV en prophylaxie primaire et secondaire pour les receveurs de CSH démontre son efficacité jusqu'à 14 semaines de suivi (Lin et al., 2019).

Le LTV n'est pas associé avec une myélosuppression et aucune résistance croisée avec un autre antiviral couramment utilisé en clinique, n'a été décrite à ce jour. Cependant, des mutations de résistances ont été mises en évidence *in vitro* sur le gène *UL56* avec une apparition rapide des mutations en culture virale (Chou, 2015b). D'autres mutations sont présentes sur les gènes *UL89* et *UL51* (Chou, 2017b). Des mutations ont été identifiées *in vivo* sur le gène *UL56* (Cherrier et al., 2018; Frietsch et al., 2019).

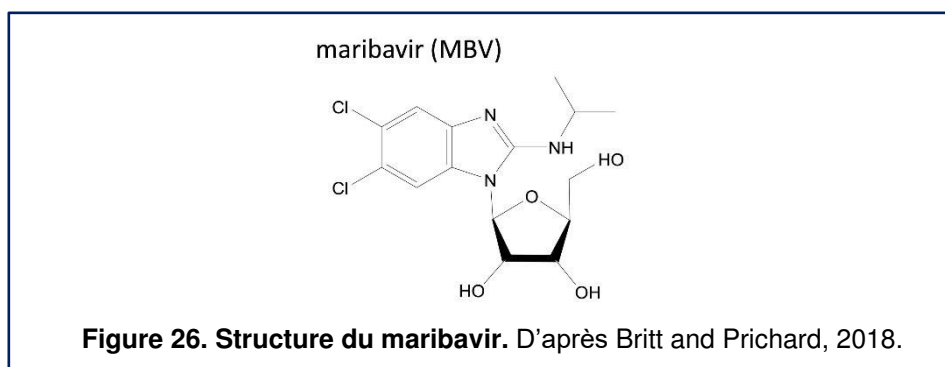


### III. Autres inhibiteurs

Des inhibiteurs d'autres protéines du CMVH ou ciblant des voies cellulaires sont utilisés en clinique ou en cours de développement.

#### III.1. Maribavir

Le maribavir (MBV) ressemble à la structure du BDCRB (**Figure 26**) mais cible la kinase virale pUL97 (**Figure 18**, page 60) (Britt and Prichard, 2018).



La première étude de phase III a échoué à la suite d'un défaut de posologie (100 mg/2xjour) et de design de l'étude de phase II (Marty and Boeckh, 2011; Marty et al., 2011). Une nouvelle étude de phase II, effectuée sur des receveurs de CSH résistants ou réfractaires aux autres antiviraux, a pu déterminer que la dose idéale serait de 400 mg 2x/jour (Papanicolaou et al., 2019). D'autres études ont démontré l'efficacité du MBV en traitement préventif pour des receveurs de CSH séropositifs au CMVH sans effet myélosuppresseur de la molécule (Winston et al., 2008).

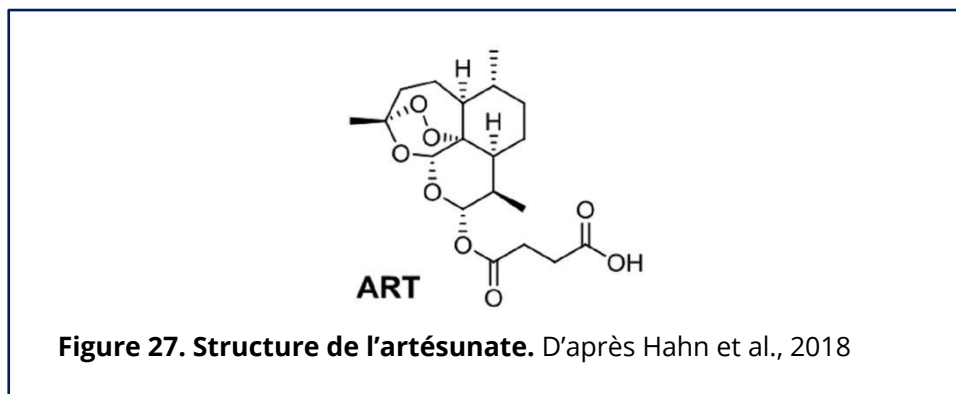
Une nouvelle étude de phase III a été initiée en avril 2017 avec des résultats prévus en 2021 portant sur la comparaison du MBV et VGCV pour les receveurs de CSH en traitement préemptif (Clinical Trial.gov Identifier : NCT02927067). Une autre étude de phase III (Clinical Trial.gov Identifier: NCT02931539) a été initiée en décembre 2016 avec une posologie de 200 mg 2x/jour pour les receveurs de CSH ou les patients transplantés d'organes solides réfractaires au traitement (impossibilité de diminuer de plus d'un  $\log_{10}$  la charge virale après 14 jours de traitement) ou pour des patients avec une résistance documentée ou en 1<sup>ère</sup> intention de traitement (Gerna et al., 2019a).



Comme le MBV inhibe l'activité de la kinase pUL97, il est contre-indiqué d'associer le MBV avec le GCV qui nécessite une phosphorylation par pUL97 pour être actif. Des cas de résistances au MBV ont été rapportés avec la présence de mutations dans le gène *UL97*. Ces mutations ont été identifiées *in vivo* (Chou et al., 2019; Maertens et al., 2019).

### III.2. Artésunate

L'artesunate (ART) est un dérivé de l'artémisine, principe actif de *Artemisia annua* (**Figure 27**). Utilisé dans un premier temps pour traiter le paludisme, il lui a été découvert une activité *in vitro* anti-CMVH ainsi qu'anti-Epstein-Barr virus ou contre les virus des hépatites C et B (Efferth et al., 2002, 2008; Kaptein et al., 2006).



L'ART ne cible pas directement le CMVH mais une voie cellulaire de support de la réplication virale : la voie NF- $\kappa$ B (Hutterer et al., 2015). En inhibant cette voie, l'ART limite l'expression du MIEP (*Major Immediate Early Promoter*) nécessaire à l'initiation de la réplication du virus (DeMeritt et al., 2004).

L'ART est principalement donné en seconde intention à la suite d'un échec thérapeutique. Son utilisation peut être utile dans le traitement de patients résistants aux autres molécules avec cependant des cas d'échec au traitement (Germi et al., 2014; Shapira et al., 2008; Wolf et al., 2011).

### III.3. Sirolimus, évérolimus et leflunomide

L'évérolimus et le sirolimus sont deux inhibiteurs de la voie mTOR. Cette voie est activée lors de l'entrée de CMVH dans la cellule et son inhibition permet de restaurer la réponse au stress induit par l'entrée du virion.

L'utilisation de l'évérolimus dans la prise en charge de l'infection à CMVH a permis de diminuer le nombre d'infections à CMVH pour certaines études de greffe cardiaque ou rénale. Un cas de négativation virale sous évérolimus lors d'une infection à CMVH par un virus multirésistant a été rapporté mais il est difficile de conclure directement quant à son effet anti-CMVH (Malvezzi et al., 2016; Webster et al., 2006).

Le sirolimus montre lui aussi un effet protecteur dans la prise en charge de l'infection à CMVH pour les patients transplantés à des doses comprises entre 6 et 18 ng/mL et par semaine à long terme (plus de 100 jours de traitement) (Piñana et al., 2018). L'utilisation seule du sirolimus n'est pas suffisante pour le traitement de l'infection à CMVH, il est donc nécessaire de diminuer le traitement immunosuppresseur, dans la mesure du possible, en parallèle de l'administration du sirolimus (Shendi et al., 2019).

Un autre immunosuppresseur, le leflunomide présente un intérêt dans l'aide à la prise en charge de patients avec des infections à CMVH résistantes ou réfractaires. Utilisé comme traitement de l'arthrite rhumatoïde il a montré qu'il pouvait avoir un effet anti-CMVH contre des souches de patients résistantes au GCV (Waldman et al., 1999). Le leflunomide a permis de réduire la charge virale de façon significative en combinaison avec le foscarnet pour un patient résistant ayant une rétinite à CMVH et des mutations de résistances sur les gènes *UL97* et *UL54* (Rifkin et al., 2017). Il a aussi démontré son utilité dans la prise en charge de patients transplantés de poumons (Silva et al., 2018).

## IV. Immunoglobulines

Les immunoglobulines anti-CMVH ont été principalement proposées dans le traitement ou la prévention de l'infection congénitale. Après des greffes d'organes solides, elles ne sont recommandées qu'en cas d'hypogammaglobulinémie. Après une greffe de CSH, elles peuvent être proposées en association avec les antiviraux pour le traitement de la pneumopathie à CMVH, désormais devenue rare grâce au traitement préemptif, mais menaçant le pronostic vital (Razonable and Humar, 2019).

Il existe deux types d'immunoglobulines anti-CMVH sur le marché. Les immunoglobulines standard données par voie intraveineuse (IVIg) et les immunoglobulines hyperimmunes (HIG). Les HIG sont plus concentrées en IgG spécifiques du CMVH que ne le sont les IVIg (Germer et al., 2016; Schampera et al., 2019). Parmi les HIG, le Cytogam® (CSL Behring LLC) et le Cytotect® CP (Biotest AG) sont capables d'inhiber l'infection à CMVH *in vitro* (Germer et al., 2016; Schampera et al., 2019). Le Cytotect® CP semble avoir un fort taux d'IgG ciblant le complexe pentamérique. Une déplétion des IgG liants ce complexe diminue la capacité neutralisante de ces HIG sur les cellules épithéliales (ARPE-19) (Schampera et al., 2019).

L'efficacité *in vitro* du Cytotect® CP et du Cytogam® commence à être démontrée et ces HIG ont une activité neutralisante plus importante que les IVIg (Germer et al., 2016; Miescher et al., 2015; Schampera et al., 2019). *In vivo*, les HIG semblent avoir un effet protecteur pour le fœtus lors d'une primo-infection de la mère (Buxmann et al., 2012). Le Cytotect® CP a été évalué *in vivo* sur 592 femmes ayant fait une primo-infection avant la 17<sup>ème</sup> semaine de grossesse. L'administration du Cytotect® CP après une injection unique de 200 unités/kg, diminue l'apparition de symptômes dus au CMVH chez le nouveau-né (suivi jusqu'à 1 an) (Visentin et al., 2012). Cependant, une étude randomisée effectuée sur 123 femmes ayant fait une primo-infection entre la 5<sup>ème</sup> et 26<sup>ème</sup> semaine de grossesse, n'a pas démontré de baisse significative du taux d'infection congénitale à CMVH suite à un traitement au Cytotect® CP. Le Cytotect® CP a conduit à l'apparition d'effets secondaires tels qu'un faible poids de naissance pour les nouveau-nés traités (Revello et al., 2014). Ces résultats ont

été démentis par une nouvelle étude effectuée sur 50 femmes, avec une posologie de 200 unités/kg et au moins deux prises durant la grossesse, sans apparition d'effets secondaires (faible poids de naissance ou naissance prématurée) dus aux HIG (Chiaie et al., 2018). Même si l'utilisation systématique d'HIG n'est pas recommandée durant la grossesse (Rawlinson et al., 2017), le Cytotect® CP pourrait aider à la prévention de l'infection congénitale à CMVH.

De plus le Cytotect® CP a prouvé son intérêt en *rescue therapy* pour les patients receveurs de CSH réfractaires ou résistants aux traitements (Alsuliman et al., 2018). Cette préparation est disponible en France sous autorisation temporaire d'utilisation nominative, en prévention ou en traitement de l'infection à CMVH (ANSM, ATUn Cytotect ® CP Biotest).



## V. Développement des vaccins anti-CMVH

Le développement d'un vaccin contre le CMVH est une priorité dans la prise en charge de l'infection à CMVH. Son besoin se fait notamment ressentir pour les femmes enceintes pour lesquelles aucun traitement homologué n'est mis en place. La protection des patients transplantés d'organes solides ou receveur de CSH est aussi une nécessité face à l'apparition de plus en plus fréquente de résistances aux traitements ainsi que du faible nombre de nouvelles molécules mises sur le marché. De nombreux vaccins sont en cours de développement ou d'essai clinique (**Tableau 4**) (Luisi et al., 2017).

Les vaccins sont développés soit à partir de virus atténués, soit à partir d'antigènes recombinants du CMVH ou en utilisant l'ADN ou les ARN du CMVH.

**Tableau 4. Vaccins en développement ou en essai clinique.** D'après Luisi et al., 2017.

Type	Developer	Composants	Statut
Virus dérivé	Aviron/MedImmune	Virus chimérique Towne/Toledo	Phase I
	Merck	V160 (réplication virale défective avec expression pentamère)	Phase I
Sous-unité recombinante	Sanofi	gB/MF59	Phase II
	GSK	gB/AS01	Phase I
	Humabs	Pentamère	Préclinique
	Redbiotec/Pfizer	Pentamère (forme VLP de cellules d'insecte)	Préclinique
Gènes viraux	Vical/Astellas	gB/pp65 (DNA TransVax)	Phase II
	Vical	gB/pp65 (DNA CyMVectin)	Préclinique
	City of Hope	Pentamer or pp65/IE (MVA vector)	Préclinique/Phase I
	Alphavax	gB/pp65-IE1 (alphaviral VRP AVX601)	Phase I

Les deux principales souches virales utilisées dans la mise au point de virus atténués sont les souches AD169 et Towne. Des patients greffés de rein et vaccinés avec la souche Towne atténuée, ont bénéficié d'une bonne protection quant à l'apparition d'évènements indésirables dus au CMVH.

Cependant, aucune efficacité n'a été démontrée dans la prévention de l'infection pour des femmes exposée à des enfants en bas âge (Plotkin and Boppana, 2018).

Le vaccin V160 développé par Merck, est composé de la souche AD169 atténuée avec une restauration de l'expression du complexe pentamérique. La phase I, a été conduite sur des adultes séropositifs ou séronégatifs vis-à-vis du CMVH. Les particules virales issues du vaccin ne sont pas excrétées dans les urines des patients séronégatifs au CMVH. Le vaccin a été plutôt bien toléré et semble induire une réponse T spécifique. Il nécessite d'être évalué dans la prévention de l'infection chez les femmes enceintes (Adler et al., 2019).

Un vaccin constitué de la protéine gB associée à l'adjuvant MF59 a été utilisé en phase II pour des patients transplantés de rein ou de foie et séropositifs ou séronégatifs vis-à-vis du CMVH. La durée de virémie pour les patients D+/R- a été réduite, permettant une réduction de la durée de traitement (GCV ou VGCV). Ces premiers résultats n'ont été effectués que sur un faible nombre de patients mais c'est derniers ont produit un niveau significatif d'anticorps anti-CMVH (Bernstein et al., 2016; Griffiths et al., 2011). Ce vaccin a été utilisé chez des femmes ayant accouché depuis 1 an et à fort risque d'infection par le CMVH. Le vaccin n'a pas permis de réduire le taux d'infection à CMVH, il a cependant été bien toléré (Pass et al., 2009).

Le vaccin TransVax constitué de plasmides exprimant la gB et l'antigène pp65, en essai de phase II chez des patients receveurs de CSH et séropositifs au CMVH, est bien toléré mais nécessite un essai de phase III à plus grande échelle pour conclure sur le bénéfice de la vaccination (Kharfan-Dabaja et al., 2012).

Le vaccin ASP0113 est composé de plasmides codants la gB et la protéine pp65. En phase II randomisée, il a été utilisé en prévention pour des patients séronégatifs recevant une greffe de rein séropositive au CMVH. Malheureusement, aucune différence significative dans la prévention de la virémie n'a été démontrée pour le vaccin en comparaison avec le placebo. Le vaccin a été administré en post-transplantation ce qui pourrait ne pas être la bonne indication (Vincenti et al., 2018).



Le CMVPepVax est composé d'une partie de la protéine pp65 se liant au CD8+ fusionnée avec un épitope de la toxine tétanique avec un agoniste du TLR9. La vaccination de patients HSCT séropositifs au CMVH a eu un effet protecteur avec une baisse des traitements antiviraux et une plus faible réactivation virale. La composition du vaccin permet une stimulation des cellules T spécifiques de pp65 ainsi que des cellules NK et donc une meilleure réponse immunitaire (Nakamura et al., 2016).

## VI. Conclusion sur les traitements anti-CMVH

Les antiviraux couramment utilisés comme le GCV et sa prodrogue le VGV, le CDV ou le FOS ont démontré leur efficacité dans le traitement de l'infection à CMVH. Cependant, de nombreux effets indésirables viennent assombrir le tableau tels que la toxicité de ces molécules et l'apparition de mutations de résistances (**Tableau 5**).

Ces antiviraux ciblant les mêmes protéines virales, les résistances sont parfois croisées avec

**Tableau 5. Cibles virales des antiviraux anti-CMVH, résistances et toxicité.**

Molécule	Cible	Localisation des résistances	Toxicités principales	Efficacité antivirale
GCV-VGCV	pUL54	<i>UL54-UL97</i>	Neutropénie, thrombopénie, néphrotoxique, neurologique (Billat, 2015) (Mourez et al., 2019)	CMVH
CDV	pUL54	<i>UL54</i>	Néphrotoxique (Britt, 2018),	CMVH, HSV, VZV
FOS	pUL54	<i>UL54</i>	Néphrotoxique, ulcères muqueux, Hypocalcémie, Hypomagnésémie (Mourez et al., 2019)	Herpesvirus
ACV	pUL54	<i>UL54 et UL97</i>		CMVH, HSV, VZV
LTV	Complexe terminase	<i>UL56 et UL89 in vitro UL51</i>	Non documentés	CMVH, très faibles sur autres virus
MBV	UL97	<i>UL97 et UL27 (in vitro)</i>		
ART	Voie KF-KB	non trouvée		Paludisme, CMVH, hépatites B, C, SIDA

d'autres molécules et conduisent à un échec thérapeutique.

De nouvelles molécules ont eu leur autorisation de mise sur le marché, comme le LTV, mais pour une utilisation restreinte. Le MBV, après l'échec des essais cliniques est de nouveau mis à l'épreuve. Aujourd'hui, aucun vaccin n'est commercialisé, mais certains sont prometteurs dans l'aide à la prise en charge de l'infection à CMVH.

Devant la disponibilité limitée des traitements antiviraux, le risque persistant de toxicité et de résistance, ainsi que de l'absence de traitement validé pour l'infection congénitale, il reste indispensable de développer de nouvelles molécules. De nouveaux composés sont en cours de développement précliniques avec des mécanismes d'action nouveaux ou des structures modifiées pour diminuer la toxicité tout en conservant l'efficacité et en améliorant la biodisponibilité. Développer et valider des modèles fiables et reproductibles pour sélectionner les molécules les plus efficaces et les moins toxiques justifiant un développement clinique est donc une étape cruciale vers ces progrès thérapeutiques très attendus.





## Chapitre V : Modèles d'étude pour l'évaluation de nouvelles molécules antivirales.

---

De nombreux modèles d'études ont été développés pour étudier l'infection à CMV chez l'homme ou l'animal. Les principaux modèles existants ont été développés pour approfondir les connaissances de l'interaction du virus avec l'hôte. Grâce à ces modèles, nous commençons à mieux comprendre les voies de transmission du CMVH au travers de la barrière placentaire lors de l'infection congénitale. Ainsi en 2016, Cameron A. McConkey et son équipe décrivent un modèle de culture cellulaire tridimensionnelle pour étudier la résistance des syncytiotrophoblastes du placenta aux infections microbiennes (McConkey et al., 2016). Et *in vivo*, la dérégulation de la différenciation cellulaire lors du développement a été étudiée (Cloarec et al., 2016).

### I. Modèles tissulaires d'infection à CMVH

#### I.1. Culture de décidue

Devant la nécessité d'étudier les événements lors d'une infection congénitale précoce par le CMVH, un modèle de culture *ex vivo* de décidue a été développé. Les explants de décidue sont issues d'interruption volontaires de grossesse ayant lieu durant le 1<sup>er</sup> semestre. En plaque 48 puits, environ 5 coupes de 250 µm de décidue sont mises en culture par puits et infectées par des virions libres de CMVH. Ce modèle est capable de supporter une infection par le CMVH et montre l'efficacité du GCV, ACV et d'immunoglobulines contre l'infection à CMVH (Weisblum et al., 2011).

#### I.2. Culture de villosités placentaires

Une des premières études mettant en culture des villosités de placentas, démontre la possibilité d'infecter ces explants avec le CMVH dans le but de pouvoir ensuite évaluer l'impact de celui-ci sur le placenta (Amirhessami-Aghili et al., 1987). En 1999, S.R. Sooranna et al., mettent en culture des villosités placentaires humaines issues du 1<sup>er</sup> ou 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse. Cette étude n'est pas dans un contexte d'infection à CMVH mais démontre la viabilité des explants en culture (Sooranna et al., 1999).



Un modèle de culture utilisant des coupes de villosités issues d'interruption volontaire de grossesse à 12 semaines a été mis au point par l'équipe de Gabrielli (Gabrielli et al., 2001). Les coupes sont infectées directement par des virions extracellulaires de CMVH de la souche Toledo.

Un autre modèle propose une culture de villosités issues de 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse avec une comparaison de méthode d'infection par le CMVH. Ce modèle d'infection utilise la souche de CMVH VHL/E. La méthode retenue, et qui s'approche au mieux de *in vivo*, infecte les villosités au travers d'une couche de fibroblastes infectés au fond des puits de culture. Les villosités sont déposées sur du gelfoam reposant sur les cellules. Dans ce modèle, le placenta de 1<sup>er</sup> trimestre est plus permissif au virus que celui de 3<sup>ème</sup> trimestre. La culture est maintenue jusqu'à 21 jours avec une production constante de virions dans le surnageant (Lopez et al., 2011).

Un autre modèle d'infection à CMVH des villosités de 1<sup>er</sup> trimestre existe avec une infection par les souches AD169 et P\* (isolat clinique). L'infection se fait aussi par une couche de fibroblastes infectés (cellules MRC-5) avec les villosités sur le gelfoam. A la différence de Lopez, et al., le placenta reste en présence des cellules infectées pour toute la durée de l'expérimentation. La culture est maintenue durant 24 à 28 jours avec une production constante de beta-hCG dans le surnageant de culture. Des essais d'efficacité du CDV, du MBV et de la baïcaléine avec ou sans ART (Morère et al., 2015).

## **II. Modèles animaux d'infection à CMVH**

L'étroite spécificité d'hôte du CMV restreint le plus souvent son étude aux hôtes respectifs (McGregor and Choi, 2011).

### **II.1. La souris**

Le modèle murin est le plus utilisé pour l'étude du cytomégalovirus. Les souches murines les plus communément utilisées sont les souris BALB/c immunocompétentes pour l'interaction du virus avec le système immunitaire de l'hôte, et les souris SCID pour l'obtention de souris humanisées. Les principales souches virales de CMV murin (MCMV) utilisées chez la souris sont les



souches K181 et Smith qui sont entièrement séquencées (Rawlinson et al., 1996). Des virus recombinants sont aussi disponibles pour l'étude de l'infection à MCMV (Messerle et al., 1997).

Le MCMV est sensible au GCV. Cependant, pour être actif il est phosphorylé non pas par la protéine M97 (homologue de *UL97*) mais par une kinase cellulaire. Les essais pour remplacer *M97* par *UL97* sont non concluants. Le virus recombinant se réplique difficilement et équivaut à un KO de *M97*. Les souris C57BL/6 sont résistantes à l'infection par le MCMV à cause d'une réaction croisée d'antigène du MCMV qui est un ligand pour un récepteur d'activation des cellules NK. Les souris BALB/c sont utilisées pour l'infection par des souches sauvages de MCMV et les souris SCID pour étudier la pathogénicité du CMVH et l'étude des antiviraux chez l'hôte immunodéprimé (Crawford et al., 2015).

- **Modèles murins d'infection à CMV :**

De par la différence de structure du placenta entre la souris et l'homme, la souris n'est pas un modèle de choix pour la transmission *in utero* du CMV (Georgiades et al., 2002). Malgré cette différence, des modèles murins ont été développés pour mieux comprendre l'impact du CMV sur le développement neural, le cerveau de nouveau-nés de souris présentant des similitudes avec celui de l'homme (Reddehase and Lemmermann, 2018).

Ainsi, une injection de souche de MCMV dans le lobe cérébral droit 24h après la naissance de souris BALB/c montre que le MCMV se réplique dans les neurones du ganglion spinal et dans les cellules épithéliales de la cochlée et conduit à la mort cellulaire des cellules ciliaires (Schachtele et al., 2011). L'infection en intrapéritonéal (IP) avec la souche Smith dans les 12h suivant la naissance des souris BALB/c entraîne une baisse de l'audition et une perte de l'épithélium sensitif. Un traitement aux corticostéroïdes permet de diminuer la gravité des séquelles auditives par chute de l'inflammation due à l'infection virale (Sung et al., 2019). Le GCV a aussi montré son efficacité dans la diminution de séquelles auditives après infection par le MCMV 3 jours après la naissance de souris BALB/c. De plus, le GCV délivré toutes les 12 heures pendant 14 jours conduit à une diminution de la charge virale de la souche K181-GFP (Haller et al., 2019).



Cependant, en raison de l'étroite spécificité d'hôte du cytomégalovirus humain, il est nécessaire de développer des modèles de souris humanisées pour évaluer le potentiel anti-CMVH de nouvelles molécules dans un modèle *in vivo*.

- **Souris humanisées et infection à CMVH :**

De nombreux modèles de greffes de cellules humaines existent chez la souris. Une des premières souris humanisées est la souris SCID-hu greffée avec du thymus et du foie humains. La greffe de thymus et foie fœtaux est effectuée sous la capsule rénale sur des souris âgées de 8 semaines. Le CMVH (souche Toledo) est capable de se répliquer dans le greffon avec une infection persistante et une greffe durable dans le temps (jusqu'à 9 mois). Un traitement au GCV dans l'eau de boisson, ou en IP, a permis de diminuer de façon significative la charge virale dans le greffon (Mocarski et al., 1993).

Dans un contexte d'infection congénitale à CMVH, la présence du virus dans une greffe de villosités placentaires, sous la capsule rénale de souris SCID, dérégule la capacité d'invasion des cytotrophoblastes ainsi que la formation des vaisseaux lymphatiques (Tabata et al., 2012).

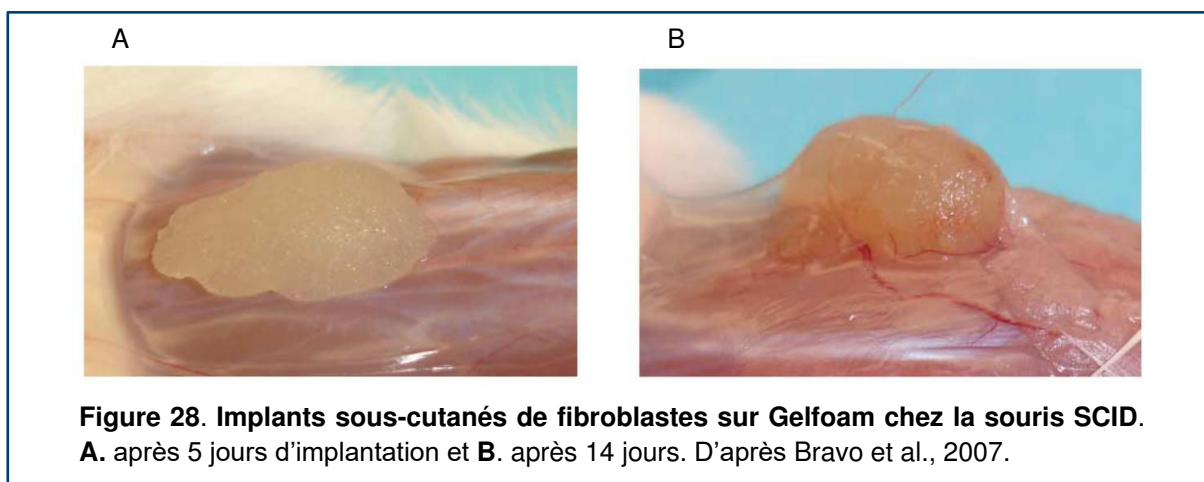
Les souris humanisées ont aussi démontré leur intérêt dans l'étude de la réactivation virale suite aux greffes de CSH. Des souris ont été greffées avec des cellules souches hématopoïétiques dans le but de rétablir le système immunitaire humain. Des cellules B, des monocytes et des macrophages sont capables de se développer dans de telles souris, mais les LT présentent un défaut de maturation car le thymus murin est différent. Une greffe de thymus pour ces souris a donc permis le développement correct de cellules T CD4+ et CD8+ impliquées dans la latence du CMVH (Crawford et al., 2015).

Les modèles murins permettent aussi l'évaluation *in vivo* de certains antiviraux. Deux modèles de greffes ont été utilisés pour tester l'efficacité du GCV et du CDV. Le premier modèle est une souris humanisée (SCID-hu) avec un implant de tissu fœtal dans la chambre antérieure de l'œil. Le deuxième modèle est la souris SCID-hu greffée thymus/foie sous la capsule rénale (Kern et al., 2001). Le CDV est efficace dans les deux modèles pour diminuer la charge virale de CMVH dans les



tissus greffés, alors que le GCV ne permet une diminution du CMVH que dans le modèle d'implant rétinien. La biodisponibilité du GCV est différente dans les deux modèles. Le choix d'un modèle pertinent est donc crucial pour l'évaluation d'une molécule (Crawford et al., 2015).

L'équipe de Bravo et al., a effectué des greffes en sous-cutané de fibroblastes humains cultivés sur gelfoam et infectés par le CMVH. Le CDV induit une diminution de la charge virale plus importante qu'avec le traitement par GCV dans ces implants. L'efficacité de la molécule est aussi dépendante de la vascularisation de la greffe (**Figure 28**) qui est plus développée entre 5 et 14 jours post-greffe qu'entre 0 et 5 jours post-greffe (Bravo et al., 2007).

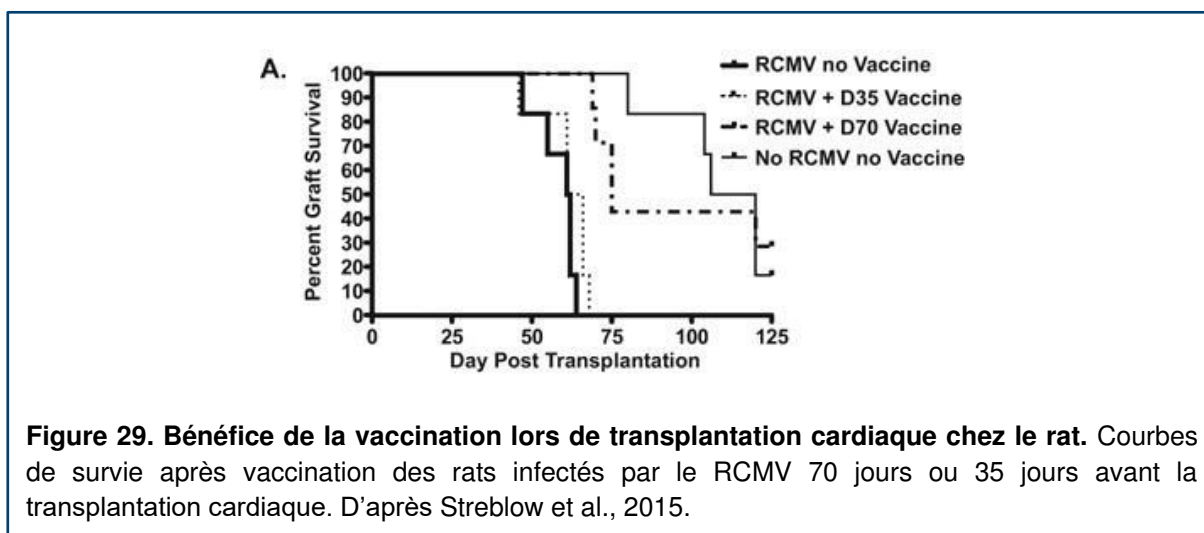


L'efficacité du LTV a été éprouvée sur des souris NOD SCID greffées en sous-cutanée avec des fibroblastes humains cultivés aussi sur gelfoam (Lischka et al., 2010). Cependant ces modèles ne permettent pas d'évaluer le comportement de la molécule dans un tissu complexe.

## II.2. Le rat

Le rat n'est pas utilisé pour l'étude de la transmission du virus au fœtus. En effet, la transmission verticale du RCMV n'est pas clairement établie. Une seule souche de RCMV a été isolée et serait capable de traverser le placenta (Loh et al., 2006).

Cependant, des modèles ont été développés pour étudier l'impact du virus sur le développement de nouveau-nés infectés. Le rat est donc aussi utilisé comme modèle d'étude de l'influence du CMV sur le développement cérébral avec, par exemple, une injection dans les ventricules cérébraux de RCMV (souche Maastricht-GFP) pour mimer une infection congénitale à 15 jours de gestation. L'infection par le RCMV montre une dérégulation de l'activation des cellules microgliales, ainsi qu'une augmentation de l'expression des cytokines (Cloarec et al., 2016). Plus tard, le même modèle mais avec un traitement *in utero* des rats par déplétion de la microglie, avec injection de liposomes contenant du clodronate en intracérébroventriculaire, et suivi d'un traitement à la doxycycline en *per os*, a permis une amélioration du développement cérébral lors d'une infection par le RCMV (Cloarec et al., 2018).



Le rat sert aussi de modèle d'infection à CMV dans le cadre de rejets de greffe. Ainsi, des rats ont été vaccinés avec une souche atténuée de RCMV avant et après une transplantation cardiaque (D+/R-). Le temps de rejet de greffe est réduit de 108 jours à 59 jours pour les rats vaccinés et transplantés avec une greffe infectée par le RCMV. Le bénéfice de la vaccination est conservé jusqu'à 70 jours avant la greffe et avec une seconde injection 28 jours après la première pour « booster » la réponse immune. De plus, des IgG produites par les rats vaccinés et transférées via le sérum à un autre rat avant une transplantation permet de retarder le rejet de la greffe (Figure 29) (Streblow et al., 2015).

### II.3. Le cobaye

Le cobaye est utilisé comme modèle d'infection congénitale à CMV. En plus d'avoir un placenta ayant une structure similaire à l'homme, la gestation est aussi découpée en 3 phases (Leiser and Kaufmann, 1994). Le placenta du cobaye (ou guinea pig) est hémochorial comme chez l'Homme et permet la transmission du CMV de la mère au fœtus. De plus, l'infection congénitale par le CMV du cobaye (GPCMV) est associée aux mêmes séquelles que chez l'Homme, soit, une perte d'audition et des troubles du développement neurologique (Schleiss and McVoy, 2010).

Le cobaye est donc un modèle de choix pour évaluer le bénéfice d'une vaccination dans la transmission du GPCMV *in utero*. Un vaccin constitué d'une souche de GPCMV atténuée et dont les gènes permettant l'évasion à la réponse immunitaire ont été délétés (gènes codant des protéines homologues au CMH-I), permet une production d'anticorps anti-GPCMV. Un vaccin constitué d'une souche virale privée de gènes impliqués dans l'échappement au système immunitaire permet le développement d'une réponse adaptative plus performante qu'avec un vaccin contenant seulement une souche virale atténuée. La vaccination des cobayes aurait de plus un effet protecteur avec un meilleur taux de survie des nouveau-nés (Crumpler et al., 2009). Plus récemment, un vaccin développé selon le modèle du V160 (Merck), permettant l'expression du complexe pentamérique ainsi que trimérique à sa surface, s'est avéré efficace dans la prévention de l'infection congénitale du cobaye (Choi et al., 2019). La présence du complexe pentamérique dans son ensemble conduit à la mise en place d'une réponse immunitaire plus performante et plus complète contrairement aux vaccins ne contenant que la gB qui ne permettent pas la production d'anticorps dirigés contre ce complexe.

Le GPCMV est moins sensible au GCV que ne l'est le CMVH mais de sensibilité identique au CDV. Un traitement par le GCV de cobayes infectés par le GPCMV au début du 3<sup>ème</sup> tiers de gestation, ne permet pas de contrôler la virémie. De même qu'un traitement par le CDV ne permet pas de contrôler totalement la virémie mais conduit à l'augmentation de la survie ainsi que du

temps de gestation des cobayes infectés (Bravo et al., 2006). Toutefois, le traitement au CDV protège les nouveau-nés d'une infection par le GPCMV *in utero* (Schleiss et al., 2006).

Le génome du GPCMV est entièrement séquencé (Kanai et al., 2011; Schleiss et al., 2008). Ainsi, la résistance du GPCMV au GCV (et au MBV) viendrait de la protéine GP97, homologue de pUL97, mais incapable de phosphoryler le GCV (Williams et al., 2003). Les essais de substitutions du gène *M97* par *UL97* ont échoué dans le MCMV (Rawlinson et al., 1997; Wagner et al., 2000). Chez le cobaye, la délétion du gène *GP97* inhibe la réplication virale mais la construction d'un virus chimérique exprimant aussi pUL97 rend le GPCMV sensible au GCV et au MBV (McGregor et al., 2008). Le GPCMV est aussi utilisé pour tester certains inhibiteurs des terminases, notamment dans la compréhension des mécanismes de résistance au BDCRB (Ourahmane et al., 2018). Cependant, le letermovir, est spécifique du CMV humain, et le modèle GPCMV ne peut être utilisé pour cette molécule (Marschall et al., 2012). D'autres molécules ont été évaluées sur le cobaye telles que l'aciclovir et le foscarnet et permettent une diminution de la charge virale (Lucia et al., 1984).

#### **II.4.Macaque rhésus**

L'infection des macaques rhésus par le CMV est semblable à l'homme avec une prévalence de 50% chez les jeunes macaques infectés avant 7 mois et presque 100% pour les macaques âgés d'1 an. Les macaques rhésus sont capables de développer des cellules T CD4+ et CD8+ spécifiques du RhCMV (Itell et al., 2017b). Le RhCMV est excrété dans la salive, les urines, les sécrétions génitales et le lait maternel (Cavicchioli et al., 2015). Cependant, le RhCMV se transmet moins efficacement de la mère au nouveau-né via le lait maternel ou la salive que le CMVH (Kaur et al., 2018).

Environ 60% des ORF du RhCMV sont homologues avec CMVH. L'homologie est aussi présente entre les protéines du complexe pentamérique du CMVH et du RhCMV. Il est donc possible d'évaluer l'efficacité potentielle des vaccins anti-CMVH contre le RhCMV (conservation entre les espèces). Il a déjà été montré que des anticorps anti-gB du RhCMV étaient efficaces contre le CMVH (Itell et al., 2017b; Kropff and Mach, 1997). Une protection de l'infection à RhCMV est possible après





vaccination avec la RhgB et/ou pp65 chez les singes adultes sains (Abel et al., 2011). Une vaccination par un virus modifié exprimant le gène *Rh-UL128C* permet une production d'anticorps neutralisants chez les macaques rhésus (Wussow et al., 2013).

Les fœtus des macaques rhésus infectés *in utero* par le RhCMV développent des séquelles neurologiques similaires aux nouveau-nés humains infectés par le CMVH durant le 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> trimestre de grossesse. L'infection par le RhCMV de femelles gestantes déplétées en LT CD4+ ou immunocompétentes mais séronégatives, conduit à une transmission du virus au fœtus sur les 4 animaux testés pour la déplétion en LTCD4+ et pour 3 des pour les macaques rhésus séronégatifs vis-à-vis du RhCMV. Pour 3 des 4 animaux déplétés en LT CD4+, l'infection a conduit à avortement spontané. Ce modèle d'infection congénitale pourrait permettre l'évaluation des hyper-immunoglobulines (HIG) dans la prévention de l'infection à CMVH (Itell et al., 2017a). Cette expérience démontre le rôle majeur des LT CD4+ dans la protection de l'infection du fœtus *in utero* par le RhCMV (Fan et al., 2017).

### III. Conclusion sur les modèles d'infection à cytomégalovirus

Les modèles d'infection à cytomégalovirus sont nombreux et ciblent différents aspects de l'infection à CMV. Concernant l'infection congénitale, les modèles d'infections tissulaires permettent d'appréhender la physiologie de l'infection à CMVH mais sont peu utilisés pour l'évaluation de nouvelles molécules.

Les modèles animaux ont permis de mieux comprendre les conséquences liées à une infection congénitale ou améliorer la prise en charge des patients transplantés. Cependant, face à la stricte spécificité d'hôte du CVMH il est compliqué d'étudier l'impact *in vivo* de nouvelles thérapies anti-CMVH. Les modèles animaux sont principalement utilisés dans le développement de vaccins. Il est donc indispensable de poursuivre les travaux visant à développer des modèles permettant d'évaluer le potentiel de nouveaux antiviraux contre le CMVH.





## Introduction à l'étude expérimentale

---

L'infection à CMVH est donc un problème majeur de santé publique. Même si l'infection à CMH est souvent asymptomatique, elle peut être la cause de graves conséquences si elle survient chez la femme enceinte ou le patient immunodéprimé. Pour les patients immunodéprimés, les traitements actuels sont efficaces mais montrent leurs limites. Si la plupart sont toxiques et donc contre-indiqués lors de certaines greffes, leur principal désavantage est l'apparition de plus en plus fréquente de mutation de résistances (Fischer et al., 2016; Hantz et al., 2010; Lurain and Chou, 2010).

Concernant l'infection congénitale à CMVH, elle touche 0,7% des naissances à travers le monde. Les conséquences d'une infection *in utero* vont d'une thrombopénie à des séquelles plus graves tels que la surdité ou le retard mental (Leruez-Ville and Ville, 2017). Les traitements couramment utilisés pour lutter contre l'infection à CMVH sont proscrits chez la femme enceinte du fait de leur toxicité. Seuls le VACV à forte dose est délivré à la femme enceinte et le GCV chez le nouveau-né pour diminuer la gravité des séquelles auditives (Kimberlin et al., 2015; Leruez-Ville et al., 2016).

Le développement de nouveaux traitements antiviraux est donc une priorité dans la prise en charge de l'infection à CMVH. Cependant, il est nécessaire d'avoir à disposition des modèles pertinents pour l'étude préclinique de ces nouvelles molécules. Des modèles tissulaires ont été développés afin de mieux comprendre les mécanismes de transmission du virus *in utero* lors d'une infection congénitale. Cependant, même devant la faible disponibilité de traitement pour la femme enceinte, peu sont utilisés pour évaluer l'efficacité des antiviraux.

De plus, le CMV est un virus comportant une étroite spécificité d'hôte ce qui implique de développer de nombreux modèles animaux d'infection à CMV. Le modèle murin infecté par le MCMV, est principalement utilisé dans l'étude de l'interaction du virus avec le système immunitaire de l'hôte. Le rat, est utilisé entre autres pour l'étude des transplantations et le macaque rhésus

pour les essais de nouveaux vaccins. En ce qui concerne l'étude de la transmission verticale du CMV, le modèle le plus couramment utilisé est le cochon d'inde car son placenta comporte une structure similaire à l'homme. Cependant, les antiviraux efficaces contre le CMVH ne le sont pas toujours face au GPCMV, tels que le GCV ou le MBV, à cause d'un défaut d'homologie entre la protéine pUL97 du CMVH et du GPCMV (McGregor and Choi, 2011).

Pour répondre aux problématiques thérapeutiques de l'infection à CMVH, ce travail de thèse s'est donc divisé en deux parties :

- **Partie I** : Développement de modèles d'infection à CMVH pour l'évaluation de nouvelles molécules antivirales.
- **Partie II** : Evaluation du potentiel anti-CMVH de nouvelles molécules antivirales.

Dans la 1<sup>ère</sup> partie nous avons poursuivi la mise en place d'un modèle de culture de villosités flottantes placentaires issues de 1<sup>er</sup> et de 3<sup>ème</sup> trimestres de grossesse. Le but étant de définir le modèle le plus adapté pour l'étude du potentiel anti-CMVH de nouvelles molécules. Nous avons parallèlement finalisé et validé un modèle *in vivo* de greffe de villosités flottantes chez la souris SCID. Ce travail de mise en place de modèles d'infection à CMVH a conduit à la 2<sup>ème</sup> partie de ce travail de thèse.

Dans la Partie II, nous avons évalué le potentiel anti-CMVH de trois molécules. Un dérivé de l'artésunate, le TF27, utilisé comme molécule modèle pour améliorer le développement de nouvelles thérapies anti-CMVH. Nous avons également évalué l'efficacité et la toxicité du LAVR-289, basé sur le mode d'action du cidofovir et dont le potentiel anti-CMVH n'avait jamais été étudié. Enfin, nous nous sommes intéressés au Cytotect CP, une immunoglobuline spécifique du CMVH, en vue d'une utilisation dans un contexte d'infection congénitale.



## Partie I : Modèles d'étude pour l'infection à CMVH

---

### I. Introduction

La première partie de ce travail s'est focalisée sur l'optimisation de modèles d'infection à CMVH dans un but d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules à potentiel anti-CMVH.

Le CMVH possède une étroite spécificité d'hôte mais une fois l'hôte infecté, il est capable de se répliquer dans de nombreuses cellules (Gerna et al., 2019b). Lors d'une transmission verticale, il pourra infecter le placenta et traverser cette barrière pour aller infecter le fœtus. La présence du CMVH dans le placenta peut déréguler l'angiogenèse, entraîner une inflammation, ce qui peut s'avérer délétère pour le développement du fœtus (Pereira, 2018; Pereira et al., 2017). Un des premiers tissus fœtaux à être traversé et être infecté par le CMVH sont les villosités flottantes.

Nous avons donc choisi de développer plusieurs modèles d'étude de l'infection à CMVH en vue de pouvoir évaluer le potentiel de nouveaux antiviraux :

- Un modèle *in vitro* de culture cellulaire
- Un modèle *ex vivo* de culture de villosités flottantes placentaires de 1<sup>er</sup> et de 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse
- Un modèle *in vivo* de greffe de villosités flottantes chez la souris SCID.

Concernant le modèle *in vitro*, nous nous sommes intéressés à deux types cellulaires que sont les fibroblastes embryonnaires issus de poumon et une lignée de cellules épithéliales. Ces types cellulaires ont été utilisés pour évaluer la capacité d'isolats cliniques de CMVH à infecter les fibroblastes ou les cellules épithéliales et à produire des virions dans le surnageant de culture.

L'utilisation de virions extracellulaire est nécessaire lors de l'infection des villosités flottantes dans notre modèle *ex vivo* (Morère et al., 2015). Ce modèle a été modifié une première fois par D. Andouard dans ses travaux de thèse (Andouard, 2015). Dans ce dernier modèle, seule la souche AD169 a été étudiée. Nous avons choisi dans ce travail de compléter ce modèle avec l'étude de l'infection des villosités par deux souches de CMVH à tropisme endothélial. De plus, l'infection

congénitale pouvant avoir lieu tout au long de la grossesse, nous avons choisi d'étudier l'infection de villosités issues de 1<sup>er</sup> et de 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse.

Enfin, nous avons choisi de développer un modèle de greffe de villosités placentaires humaines dans un modèle animal facile à manipuler, soit la souris. Le développement d'un tel modèle est effectué dans une perspective de tester l'efficacité de nouveaux antiviraux dans un modèle *in vivo* après administration *per os* ou en intrapéritonéal (IP) des molécules.

Afin d'éviter le caractère invasif des greffes dans la capsule rénale, un premier modèle a été mis au point au laboratoire chez la souris SCID avec une greffe en sous-musculaire d'explants de villosités flottantes issues de placenta de 1<sup>er</sup> trimestre. Ces essais, effectués par L. Morère dans ses travaux de thèse (Morère, 2016) ont été concluants, avec la confirmation d'une vascularisation du greffon nécessaire dans une optique de traitement antiviral administré en IP ou *per os*. Cependant, la greffe en intra-musculaire nécessite une étape chirurgicale supplémentaire et invasive, à savoir l'incision puis la suture du muscle sous lequel est inséré l'implant. En outre, cette étape peut également générer des douleurs ainsi qu'une gêne pour les souris.

Nous avons donc repris la mise au point du modèle de greffe de tissu placentaire en sous-cutanée avec une vérification de la vascularisation des implants au cours du temps ainsi que de l'évolution de la cinétique virale des souches de CMVH dans ces implants afin de déterminer dans quelle fenêtre de temps l'évaluation du potentiel anti-CMVH de nouveaux antiviraux est la plus pertinente.

## II. Matériels et Méthodes

### II.1. Cellules

Deux types cellulaires ont été employés dans cette partie. Les cellules sont cultivées en étuve à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> et en atmosphère humide.

**Tableau 6 : Composition des milieux de culture des différents types cellulaires utilisés.**

Cellules	Milieu	HEPES	Glutamine	Pénicilline	Gentamycine	SVF décomplémenté
<b>FEH</b>	MEM (Eurobio)	1X	1X	50µg/ml	10µg/ml	7%
<b>ARPE-19</b>	DMEM-F12 (Fisher Scientific)	Inclus dans le milieu de base	Incluse dans le milieu de base	50µg/ml	10µg/ml	10%

- Les cellules MRC-5, fibroblastes humains issus de poumon embryonnaire ou **FEH** (BioMérieux, France). Les FEH sont mises en culture à une densité cellulaire de  $1.10^5$  cellules/mL, en plaques 48 puits (500 µL/puits), 96 puits (250 µL/puits) ou en flacon de culture (7, 20 ou 50 mL). Voir **Tableau 6** pour la composition du milieu.
- Les **ARPE-19**, cellules épithéliales humaines de la rétine (ATCC® CRL-2302™ USA), sont mises en culture à une densité cellulaire de  $5.10^4$  cellules/mL en plaques 48 puits et 96 puits et en flacons de culture (7, 20 ou 50 mL). Voir **Tableau 6** pour la composition du milieu. Concernant l'entretien des ARPE-19, elles sont cultivées en flacon 75 cm<sup>2</sup> jusqu'à subconfluence avant d'être trypsinées. Brièvement, la nappe cellulaire est rincée avec 15 mL de « versène » -EDTA 1/5000 dans du PBS (Versène-EDTA 1/5000, Eurobio, France) puis les cellules sont décollées avec 10 mL de mélange trypsine-EDTA (0,05% trypsine et 0,53 mM EDTA, Eurobio, France). Après une centrifugation de 1000 rpm, pendant 10 min à 37°C, le culot cellulaire est remis en suspension dans 5 mL de milieu, les cellules sont dénombrées pour un ensemencement des plaques ou flacons à  $5.10^4$  cellules/mL. Le milieu est renouvelé après 24 heures puis tous les deux jours.

## II.2. Cultures virales

- Souches virales de laboratoire :

La souche virale AD169 provient de l'ATCC (VR-538, ATCC, USA). Les souches à tropisme endothélial et épithélial, VHL et TB40 sont un don de M. Stéphane CHAVANAS (UMR 1043, CPTP, Toulouse, France) et sont cultivées soit en FEH soit en ARPE-19. Si elles sont cultivées en ARPE-19, elles sont alors dénommées VHL/E ou TB40/E.

- Souches virales issues de patients :

La souche S\*, est issue d'urine de nouveau-né avec une infection symptomatique à CMVH. Les différentes souches issues de patients sont un don du Centre National de Référence des Herpesvirus (CNR Herpesvirus, CHU de Limoges, France).

## II.3. Stock de virions extracellulaires

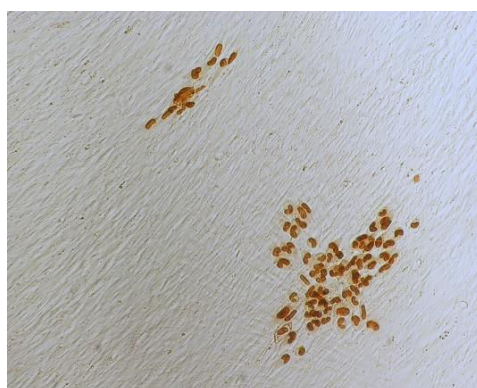
### II.3.1. Production de virion extracellulaires

Les différentes souches virales sont passées successivement sur cellules FEH ou ARPE-19 en flasques de culture de 25 cm<sup>2</sup> puis 75 cm<sup>2</sup> et 175 cm<sup>2</sup>. Chaque passage est effectué en augmentant progressivement la taille du flacon et après avoir atteint 100% d'effets cytopathiques sur les nappes cellulaires. Le dernier passage (sur flacon 175 cm<sup>2</sup>) est effectué une deuxième fois sur la même taille de flacon pour favoriser la réplication virale jusqu'à lyse des cellules. Le surnageant alors est récolté et subit une congélation à -80°C pendant 24h, avant d'être clarifié pendant 10 min à 3500 rpm puis aliquoté et conservé à -80°C.



### II.3.2. Titrage de surnageant viral

Les aliquotes de surnageant viraux sont décongelés et dilués en en dilution de raison 10 en milieu de culture pour FEH ou ARPE-19. Les dilutions sont ensuite déposées sur cellules FEH ou ARPE-19 confluentes en plaque 48 puits. Les plaques sont centrifugées 45 min à 3500 rpm à 37°C avant de remplacer le milieu de culture. Les plaques sont incubées 5 jours dans une étuve à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> et en atmosphère humide. Les cellules sont alors fixées en acétone glaciale 90% à -20°C pendant 20 min. Les puits sont vidés et utilisés de suite pour marquage par immunocytochimie ou conservés à -20°C.



**Figure 30 : Foyers d'infection de la souche TB40 en cellules FEH après 5 jours d'incubation.** Microscope inversé, grossissement x100, marquage des antigènes IEA/EA du CMVH par immunocytochimie.

- **Marquage par immunocytochimie :**

Ce marquage est effectué directement dans les puits de plaque, en évitant tout contact prolongé des cellules avec l'acétone à température ambiante et sans jamais laisser sécher la nappe cellulaire. Les cellules sont incubées 30 min dans l'étuve à 37°C en présence d'un anticorps primaire de souris ciblant les antigènes *Immediate early* et *early* (IEA/EA) (Argène, BioMérieux, France) dilué au 1/50<sup>ème</sup> dans 150 µL de PBS sans calcium ni magnésium pour un essai en plaque 48 puits (Eurobio, Courtabœuf, France). Après deux rinçages de 10 min au PBS, les cellules sont incubées 30 min avec un anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à la peroxydase (Dako, France). Deux autres rinçages de 10 min au PBS sont encore nécessaires avant d'ajouter du 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) en suivant les recommandations du fournisseur. Dès apparition de la

coloration dans les noyaux cellulaires, le DAB est remplacé par du PBS avant comptage des foyers d'infection (**Figure 30**, page 95). La détermination du nombre de foyers d'infection par millilitres, correspond aux PFU/mL (*plaque forming unit/mL*).

#### **II.4. Collection Biologique de placentas**

Les placentas de 1<sup>er</sup> trimestre sont issus d'interruption volontaire de grossesse (IVG) (entre 8 et 14 semaines de grossesse) et les placentas de 3<sup>ème</sup> trimestre sont récupérés après une césarienne et sans complications pendant la grossesse. Les placentas sont obtenus en collaboration avec la Collection Biologique de l'Hôpital Mère-Enfant (CB-HME, CHU, Limoges) dans le cadre d'une convention de collaboration et avec le consentement des patientes.

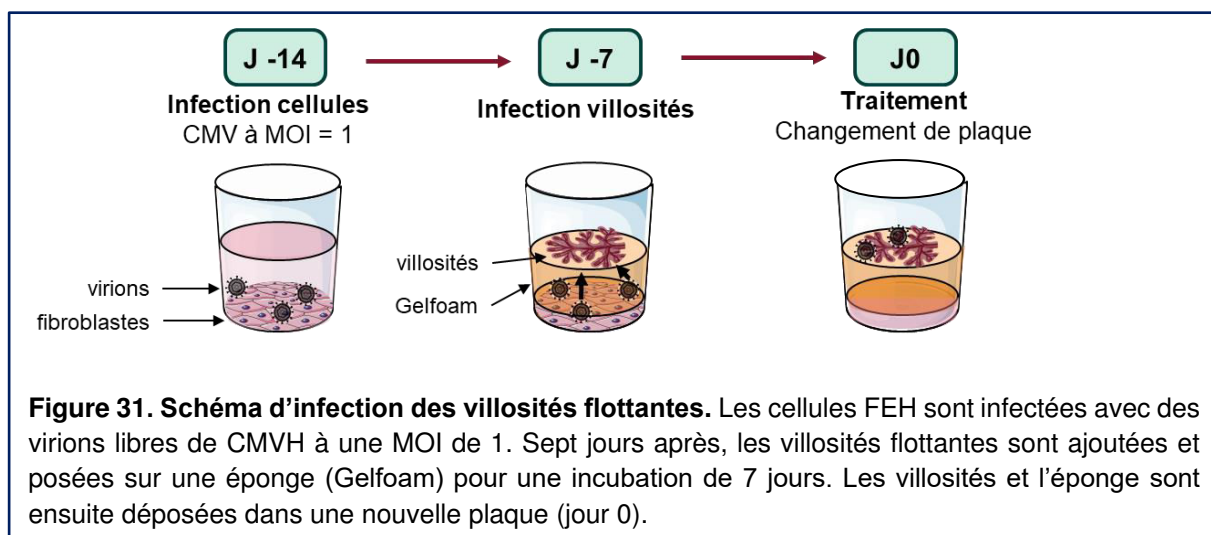
Les villosités flottantes sont extraites des placentas et mises en culture dans du milieu minimum essentiel (MEM, Eurobio, France) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal, 1% de L-glutamine, 50 µg/mL pénicilline et 10 µg/mL gentamycine.

Les villosités issues de femmes séronégatives pour le CMVH sont utilisées pour les essais antiviraux *ex vivo* et celles issues de femmes séropositives pour le CMVH pour les essais de cytotoxicité. Le statut sérologique est déterminé par dosage des IgG anti-CMVH par chimiluminescence (Liaison® XL, Diasorin, Italie).



## II.5. Modèle d'infection des villosités

Le modèle *ex vivo* de culture de villosités placentaires est adapté de (Morère et al., 2015) et a été modifié par D. Andouard (Andouard, 2015). Les cellules FEH en plaque 48-puits sont infectées par les virions extracellulaires des souches AD169, TB40/E ou VHL/E à une multiplicité d'infection (MOI) de 1. Les plaques sont centrifugées 45 min à 3500 rpm et à 37°C avant de changer le milieu de culture. Après 7 jours d'incubation à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, une éponge (Spongostan dental™, Ethicon) est ajoutée dans chaque puits avec un explant de villosité flottante d'environ 5 mm<sup>3</sup>. Après 7 autres jours d'incubation à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, l'éponge et la villosité sont transférées dans une nouvelle plaque sans FEH et avec du milieu de culture. Cette dernière étape correspond au « jour 0 » de l'essai (**Figure 31**).



**Figure 31. Schéma d'infection des villosités flottantes.** Les cellules FEH sont infectées avec des virions libres de CMVH à une MOI de 1. Sept jours après, les villosités flottantes sont ajoutées et posées sur une éponge (Gelfoam) pour une incubation de 7 jours. Les villosités et l'éponge sont ensuite déposées dans une nouvelle plaque (jour 0).

Pour déterminer la cinétique de répllication virale, les explants sont collectés à différents temps à partir du jour 0 soit aux jours 4, 10 et 13 et conservés à -80°C. Les surnageants sont aliquotés et conservés à -80°C avant dosage des  $\beta$ -hCG. Les essais sont effectués en triplicats sur 3 placentas différents par type d'expérience.

## II.6. Charge virale dans les explants

- **Extraction d'ADN total** : les explants sont lysés dans une solution de 1,6 mg/mL de protéinase K (activité >60 0mAU, Qiagen) avec 200 mM de Tris et 10% de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) dans de l'eau ppi pour un volume final de 500  $\mu$ L, et incubés à 56°C jusqu'à dégradation

complète de l'échantillon. L'extraction d'ADN total est effectuée à partir de 500  $\mu$ L de lysat pour un volume d'élution de 50  $\mu$ L, à l'aide la technologie NucliSENS® sur l'appareil *EasyMag* (BioMérieux) en suivant le protocole « *specific B* ».

- **La PCR quantitative duplex** ciblant le gène *UL83* du CMVH et le gène de l'albumine, a été optimisée (dans l'équipe par Andouard et al.) d'après deux protocoles publiés de qPCR TaqMan (Mengelle et al., 2003; Mazet-Wagner et al., 2006). Il est ajouté 5  $\mu$ L de chaque extrait d'ADN total à la solution de *Perfecta Multiplex toughmix* (Quanta Biosciences, USA), avec 250 nM de chaque amorce, 200 nM de chaque sonde et de l'eau ppi pour un volume final de 25  $\mu$ L. Le programme de qPCR effectué sur l'appareil *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad laboratories) est le suivant : 30s à 95°C suivi de 45 cycles de 45s à 60°C. Le nombre de copies des gènes de CMVH ou d'albumine est quantifié à l'aide de gammes de plasmides portants le gène *UL83* ou le gène *albumine* et à l'aide du logiciel *CFX Manager Software* (Bio-Rad laboratories). Les séquences des amorces sont : *UL83* (5'-GTCAGCGTTCGTGTTTCCCA-3' ; 5'-GGGACACAACACCGTAAAGC-3') et *albumine* (5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3' ; 5-AAACTCATGGGAGCTGCTGGT T-3'). Les séquences des sondes sont : CMVH [Cyanine5]-CCCGCAACCCGCAACCCTTGATG-[BHQ3] 3' et albumine [6FAM]-CCTGTCATGCCACACAAATCTCTCC-[TAMRA] (Sigma-Aldrich).

## II.7. Dosage des $\beta$ -hCG pour l'évaluation de la cytotoxicité

La concentration de  $\beta$ -hCG présentes dans le surnageant de culture des villosités est mesurée par technique ELISA « sandwich » électroluminescente sur microparticules magnétiques (Cobas, Roche, France). Les résultats sont exprimés en mUI par millions de cellules (en référence avec la quantification du nombre de copies de gènes d'albumine par qPCR). Le traitement effectué sur les villosités placentaires est considéré cytotoxique si le taux de  $\beta$ -hCG est significativement inférieur aux taux sécrétés par les villosités contrôles sans traitement.

## II.8. Souris

Les souris utilisées pour les greffes sont une lignée de souris immunodéficientes SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) âgées de 6 à 8 semaines et pesant entre 18 et 25 g. Les souris SCID sont élevées au sein de l'animalerie SOPF (*Specific and Opportunistic Pathogen Free*) du service BISCEm (Biologie Intégrative Santé Chimie Environnement, Université de Limoges) et sous couvert de l'autorisation APAFIS#13911-201803051633607v2 délivrée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

## II.9. Procédure de greffe

Les souris sont pesées pour déterminer la dose de produit anesthésique à injecter en intrapéritonéal (IP) soit un mélange 100 mg/kg de kétamine et 15 mg/kg de xylazine. Une fois la souris anesthésiée, de la cyclosporine en pommade ophtalmique (Optimune®, MSD, USA) est appliquée sur les yeux des souris et une zone de 2 cm<sup>2</sup> est rasée sur le dos des souris à la base du cou et désinfectée avec de la bétadine. Une petite incision est réalisée à l'aide de ciseaux afin d'insérer un explant placentaire de villosité de 1<sup>er</sup> trimestre d'environ 5 mm<sup>3</sup>. La plaie est suturée avec du fil de suture résorbable (Vicryl™ 4-0, 19mm, 3/8c, Johnson & Johnson, France) par un ou deux points. Une injection en IP de 100 µL de buprénorphine à 0,015 mg/mL est effectuée avant d'envelopper la souris dans du papier absorbant pendant la phase de réveil. De l'amoxicilline à 35 mg/100mL est ajoutée dans l'eau de boisson pour prévenir les risques infectieux. Les souris sont surveillées pendant la phase de réveil puis quotidiennement en post-greffe.

## II.10. Essais de vascularisation

La L-norleucine (Sigma, France) est dissoute à 40 mg/mL dans une solution de HCL à 0,1N. Puis 600 µL de solution de L-norleucine sont ajoutés à 200 µL d'huile d'olive pour éviter toute irritation ou régurgitation lors du gavage. Deux fois 50 µL de norleucine dans l'huile d'olive sont donnés *per os* aux souris. Un contrôle négatif est effectué dans les mêmes solvants et sans

norleucine. Quatre heures post-gavage les souris sont euthanasiées par augmentation progressive de la concentration en CO<sub>2</sub> dans la cage.

Les greffons sont récupérés par une incision au niveau de la zone de greffe, puis plongés dans l'azote liquide dans un cryotube. Les greffons sont ensuite broyés, dans 500 µL d'eau ppi, à l'aide d'un potter-elvehjem (broyeur-homogénéisateur) dans la glace. Le broyat est filtré sur colonne 5 min à 1000 rpm.

Le dosage de la L-norleucine est effectué par le Dr Pierre-Antoine Faye sur la plateforme de Biochimie et Biologie Moléculaire (CHU, Limoges). Le dosage de L-norleucine est réalisé par chromatographie liquide haute performance (HPLC) associée à spectrophotométrie en utilisant l'analyseur d'acides aminés *Sykam* (Sykam Chromatography, Allemagne) ainsi que le logiciel *Clarity Amino* version 6.1. Brièvement, l'échantillon (50 µL) est analysé en utilisant une colonne échangeuse de cations haute résolution (Sykam Chromatography, Allemagne) associée à un gradient de solutions tampon adaptées (Tampon A 0.12 N, pH 2.95; Tampon B 0.30 N, pH 4.2; Tampon C 0.30 N, pH 7.95 ; Solution de régénération 0.5 N, pH 12 ; Sykam Chromatography, Allemagne), la S-2-aminoethylcysteine est utilisée comme étalon interne (SAEC, Sigma, USA). La chromatographie est effectuée à débit constant (0.45 mL/min) et chaque séquence dure 2 heures. Après dérivatisation à la nihydrine, la L-norleucine est identifiée par son temps de rétention et le ratio des aires 570/440 par rapport à la courbe produite par l'étalon interne.

## II.11. Cinétique virale dans le greffon

Les explants placentaires de villosités flottantes sont disposés dans une plaque 48-puits contenant du milieu de culture (cf. paragraphe II.1, page 93) contenant 2000 PFU/mL de surnageant viral de la souche TB40/E. Après 24h d'incubation à 37°C (5% de CO<sub>2</sub>, atmosphère humide), les explants infectés sont greffés chez la souris. Un lot de 4 souris (3 souris avec un greffon infecté et une souris avec un greffon sain) est ensuite euthanasié 7 jours post-greffe et un second lot 14 jours post-greffe, par augmentation progressive de la concentration en CO<sub>2</sub>.



Les explants sont récupérés comme décrit dans les essais de vascularisation (paragraphe II.10, page 99). La charge virale dans les explants est effectuée après extraction de l'ADN total et qPCR duplex tel que décrit pour les essais *ex vivo* en placenta (paragraphe II.6, page 97).

## **II.12. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism* (GraphPad Software, USA) en utilisant le test « *two-way ANOVA* ».







### III. Résultats

#### III.1. Culture de souches sauvages de CMVH.

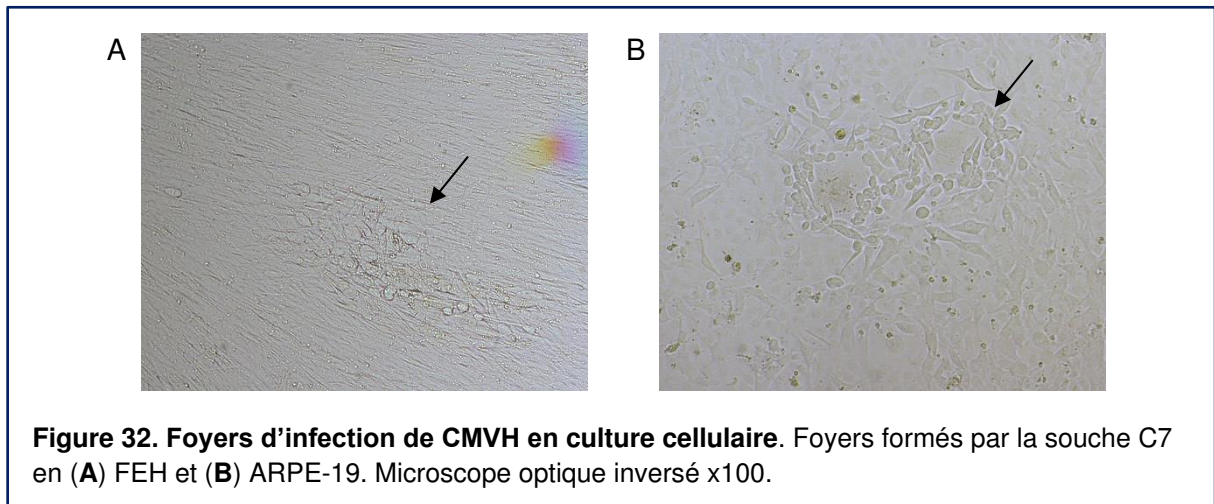
Des souches de CMVH issues de patients transplantés ou d'infection congénitale, ont été cultivées sur différents types cellulaires. Nous avons ainsi voulu déterminer si les souches sauvages pouvaient conserver leur tropisme épithélial après quelques passages en fibroblastes (cellules FEH) (**Tableau 7**).

**Tableau 7. Collection de souches de CMVH de patients et essai de production de virions libres.** Les souches C1 à C10 sont issues d'infection congénitale à CMVH et les souches T1 et T2 de patients transplantés. Le nombre de passages en cellules FEH avant cession par le CNR est précisé. Les souches sont ensuite divisées et cultivées en cellules FEH et ARPE-19. La production de virions libres est effectuée après passages successifs sur ARPE-19 avant titrage.

N° souche CMVH	Type prélèvement	charge virale (log)	nombre de passages en culture à réception	Présence de foyers en FEH	Présence de foyers en ARPE-19	Production de virions libres	Titrage PFU/mL
C1	liquide amniotique	NR	P2	oui	oui	oui	<100
C2	liquide amniotique	NR	P3	oui	oui	non	
C3	liquide amniotique	NR	P3	oui	oui	non	
C4	urine	7,42	P5	oui	non	oui	<100
C5	urine	4,29	P3	oui	non	non	
C6	urine	4,35	P3	oui	non	non	
C7	urine	7,58	P2	oui	oui	oui	<100
C8	liquide amniotique	NR	P3	oui	oui	non	
C9	salive	4,4 (sang total)	P1	oui	oui	non	
C10	liquide amniotique	5,97	P2	oui	oui	oui	<100
T1	aspiration bronchique	3,99	P3	oui	non	non	
T2	Transplanté Rein	4,82	P3	oui	non	non	

Les souches de CMVH issues d'infection congénitale et prélevées dans le liquide amniotique ont toutes formé des foyers sur ARPE-19 (cellules épithéliales) après culture en cellules FEH (fibroblastes). Pour chacune de ces souches, le nombre de passages en FEH est de 3 maximum. Les souches de CMVH issues d'urine de nouveau-nés, n'ont pas toutes conservé un tropisme épithélial. Seule la souche C7, à faible passage en FEH (P2) et avec une forte charge virale dans le prélèvement de départ (7,58 log), a pu se multiplier dans les cellules ARPE-19 (**Figure 32**, page 104).

Les deux souches issues de patients transplantés (T1 et T2) avec des complications dues à une infection à CMVH n'ont pas pu infecter les cellules épithéliales (**Tableau 7**).

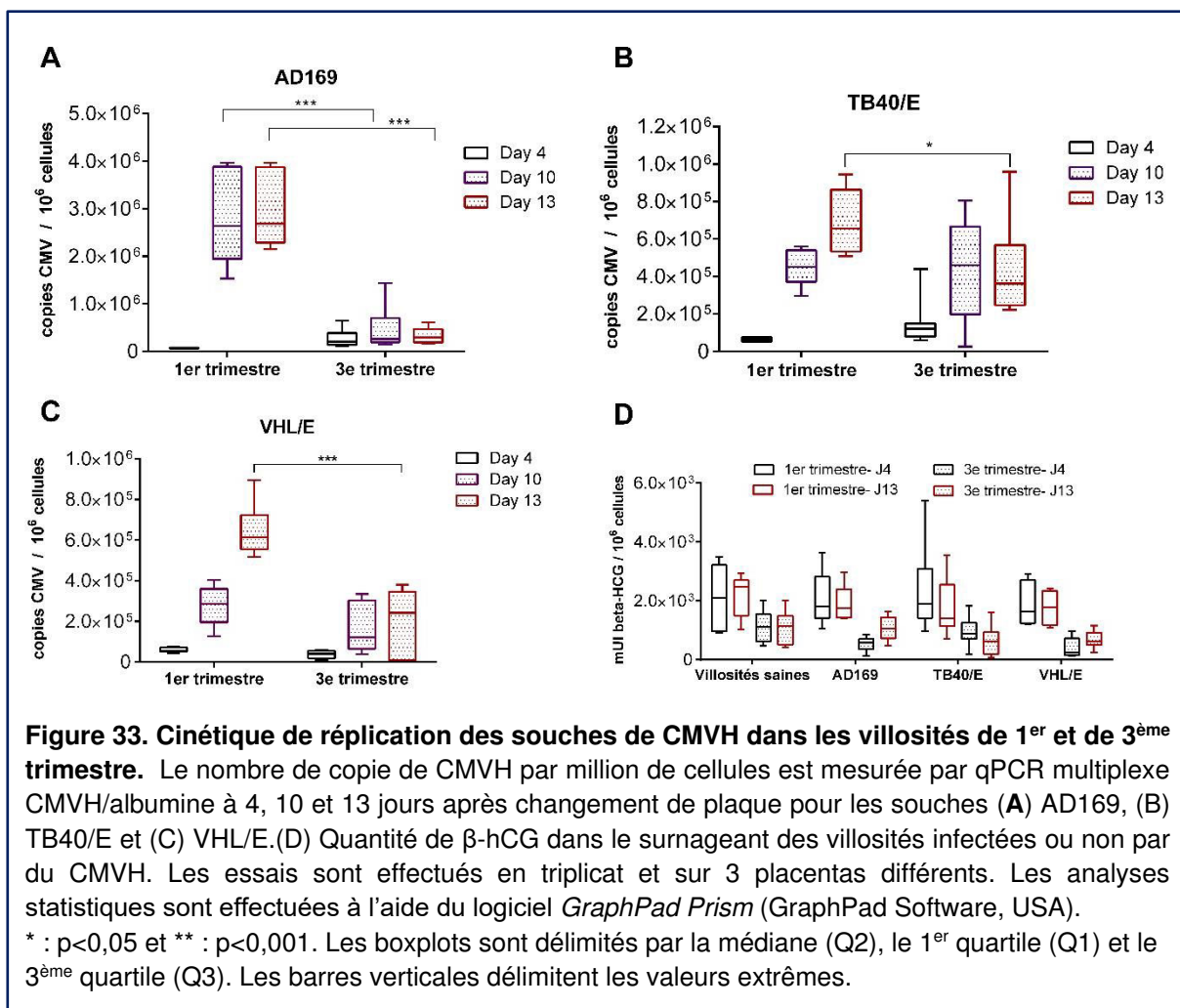


Pour chaque souche, nous avons effectué des passages successifs sur cellules FEH ou pour celles infectant les cellules épithéliales, sur ARPE-19 dans le but de produire des virions libres. Pour les rares souches de CMVH ayant produit des virions libres dans le surnageant de culture, le titre viral était faible,  $<100$  PFU/mL, que ce soit avec une production en FEH ou ARPE-19 (**Tableau 7**).

L'impossibilité d'obtenir des virions libres d'isolat clinique en quantité suffisante ( $>5.10^5$  PFU/mL) ne nous permet pas d'utiliser ces souches de CMVH dans notre modèle de culture de villosités placentaires. En effet, l'infection des cellules FEH se faisant à une MOI de 1 dans notre modèle *ex vivo*, nous avons besoin d'un titre viral supérieur à  $5.10^5$  PFU/mL pour infecter les cellules.

### III.2. Comparaison des cinétiques d'infection sur villosités de 1<sup>er</sup> et de 3<sup>ème</sup> trimestre

Après infection par les souches de CMVH de référence (AD169, VHL/E et TB40/E), nous avons mesuré la charge virale dans les villosités de 1<sup>er</sup> et de 3<sup>ème</sup> trimestres à différents temps après changement de plaque (Jour 0, **Figure 31**). En référence au modèle existant au préalable au laboratoire (Andouard, 2015; Morère et al., 2015), nous avons augmenté la MOI de 0.1 à 1 pour l'infection des cellules FEH avant mise en contact avec les villosités. Cette modification a été effectuée en vue d'améliorer l'infection des villosités de 3<sup>ème</sup> trimestre.



Les trois souches virales, AD169, TB40/E et VHL/E sont donc capables d'infecter les villosités placentaires. Nous observons toutefois des différences entre les villosités de 1<sup>er</sup> et de 3<sup>ème</sup> trimestres mais aussi entre les souches virales (**Figure 33**).

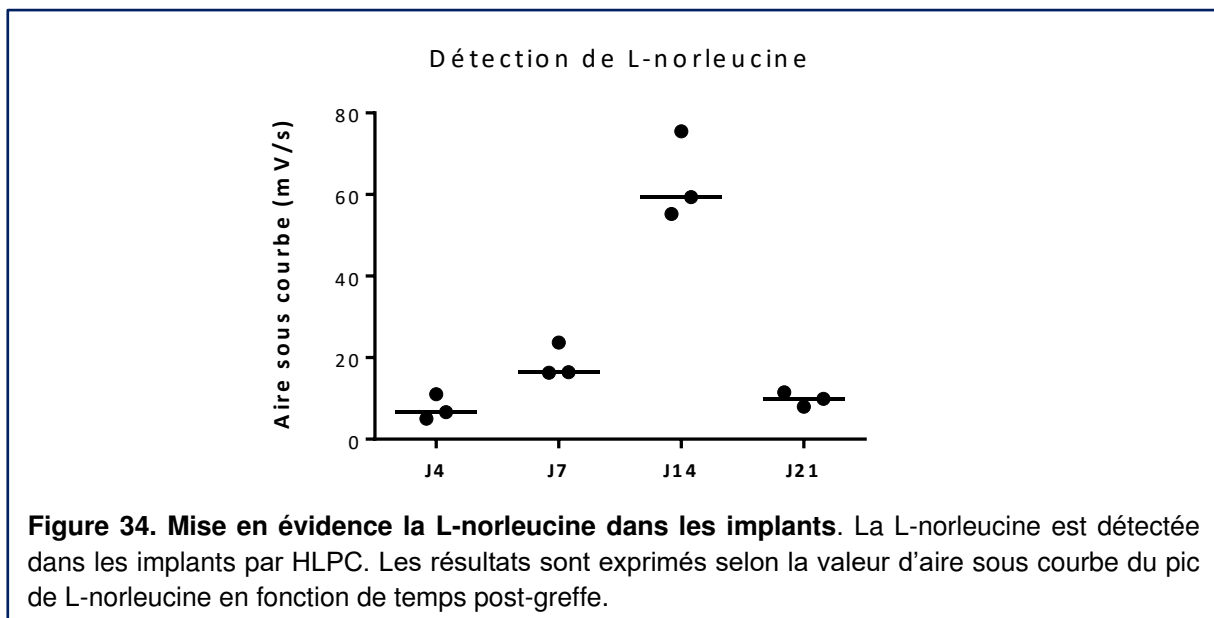
Dans le 1<sup>er</sup> trimestre, la souche AD169 atteint un pic d'infection après 10 jours avec une charge virale de  $2,6 \cdot 10^6$  copies de CMVH/millions de cellules qui est maintenue à J13 (**Figure 33.A**). Dans les villosités de 3<sup>ème</sup> trimestre, la charge virale est 4 fois inférieure pour l'AD169 en comparaison avec le 1<sup>er</sup> trimestre (**Figure 33.A**). La souche VHL/E se réplique aussi plus faiblement dans le 3<sup>ème</sup> trimestre en comparaison avec le 1<sup>er</sup> trimestre. Pour VHL/E, mais aussi pour TB40/E, la charge virale est significativement supérieure à J13 dans le 1<sup>er</sup> trimestre par rapport à la charge virale du 3<sup>ème</sup> trimestre (**Figure 33.B et C**). Les souches AD169 et VHL/E ne se répliquent donc pas efficacement dans les explants de 3<sup>ème</sup> trimestre en regard de la charge virale en 1<sup>er</sup> trimestre.

De plus, les souches de CMVH infectent différemment les villosités. La souche AD169 infecte les explants de 1<sup>er</sup> trimestre avec une charge virale supérieure aux souches VHL/E et TB40/E. L'infection des explants par les souches de CMVH n'impacte pas le taux de  $\beta$ -hCG quel que soit le type de placenta (1<sup>er</sup> ou 3<sup>ème</sup> trimestre). Même si le taux de  $\beta$ -hCG est plus faible au 3<sup>ème</sup> trimestre par rapport au 1<sup>er</sup> trimestre, aucune baisse significative de  $\beta$ -hCG n'est visible après infection par le CMVH par rapport aux explants non infectés (**Figure 33.D**).

### III.3. Modèle souris

#### III.3.1. Vérification de la vascularisation des greffons après implantation sous-cutanée

Les essais dits de « vascularisation » ont été effectués par détection d'un acide aminé de synthèse exogène, la L-norleucine, au cours du temps dans l'implant. Compte tenu des résultats préalablement obtenus par L. Morère, nous avons choisi de vérifier la présence de la L-norleucine à 4h post-gavage et à différents temps post-greffe (J4, J7, J14 et J21). En effet, lors de la mise au point de cette technique, la L-norleucine a été détectée dans le sang ainsi que dans les implants en sous-musculaire 4h après le gavage des souris.

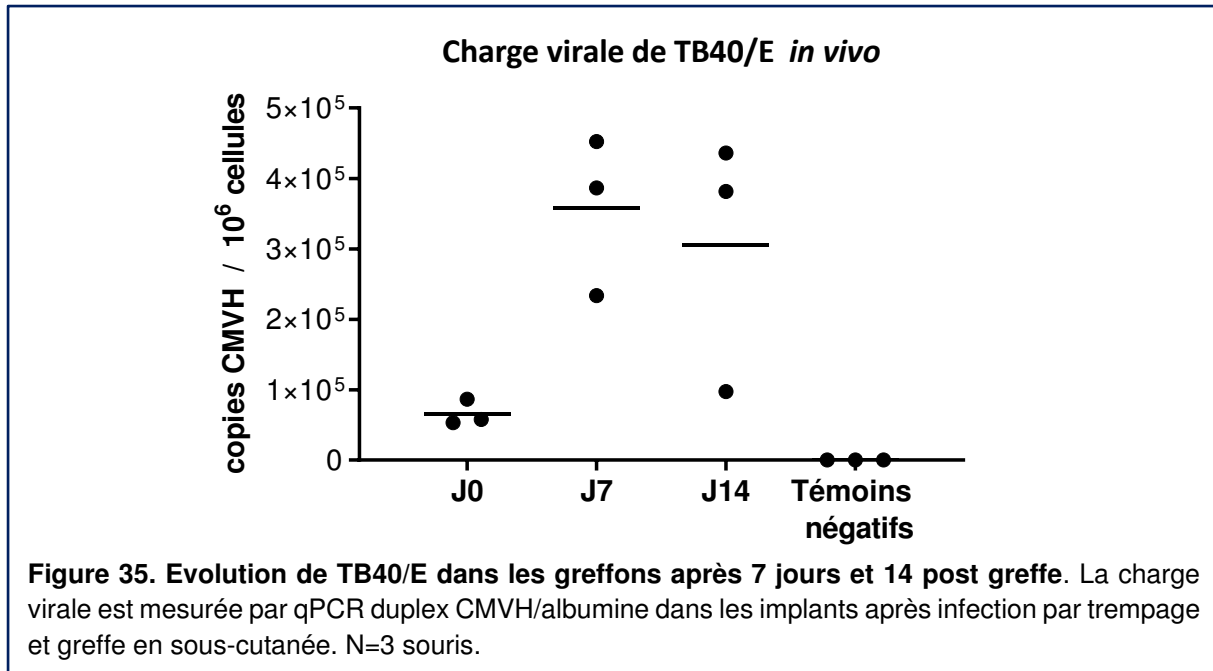


Le taux de L-norleucine détectée dans l'implant augmente progressivement au cours du temps jusqu'à atteindre un pic à 14 jours post-greffe puis décroît entre 14 et 21 jours post-greffe. A J4 et J21 post-greffe, le taux de L-norleucine détectée est faible en comparaison des points à J14.

Nous avons donc choisi de continuer le développement du modèle en conservant les temps J7 et J14 post-greffe.

### III.3.2. Cinétique virale dans les greffons

Suite aux essais en placentas, nous avons choisi de conserver la souche TB40/E pour les essais dans notre modèle murin. Nous avons quantifié la charge virale dans les implants à J7 et J14, jours pour les lesquels la L-norleucine a été détectée.



La souche TB40/E est capable de se répliquer dans l'implant greffé en sous-cutané et persiste jusqu'à 14 jours post-greffe. La charge virale dans les greffons semble constante avec un taux médian d'infection entre  $3 \cdot 10^5$  et  $4 \cdot 10^5$  copies CMVH/millions de cellules (**Figure 35**).

#### IV. Conclusion Partie 1

Dans la perspective d'évaluer le potentiel de nouveaux antiviraux dans un contexte d'infection congénitale à CMVH, nous avons voulu améliorer le modèle de culture de villosités flottantes placentaires existant dans l'unité de recherche (Andouard, 2015; Morère et al., 2015).

Dans un premier temps nous avons testé la capacité de souches de CMVH sauvages, issues d'infection congénitale ou d'infection du patient transplanté, à infecter des cellules épithéliales puis à produire des virions extracellulaires. Seules les souches avec un faible nombre de passages préalables (<2 ou 3) sont capables d'infecter les cellules épithéliales. Aucune des souches n'a produit de virions extracellulaires en quantité suffisante pour infecter les villosités *ex vivo*, le titre nécessaire pour l'étape d'infection étant supérieur à  $5.10^5$  PFU/mL (pour une infection avec une MOI de 1. Nous avons donc poursuivi l'optimisation et les essais avec la souche de laboratoire AD169 à tropisme fibroblastique, et les souches TB40/E et VHL/E à tropisme endothélial.

Les trois souches virales utilisées, AD169, TB40/E et VHL/E sont capables d'infecter les villosités flottantes *ex vivo*. La mesure de la cytotoxicité propre aux différentes souches reste faible, permettant ainsi de mesurer ultérieurement la cytotoxicité propre des différents antiviraux. Les villosités flottantes de 3<sup>ème</sup> trimestre étant moins permissives quel que soit le virus, et correspondant à une période de la grossesse où l'infection du fœtus a moins de conséquences neurologiques, nous les avons abandonnées pour la suite du projet.

L'analyse de la diffusion de la L-norleucine dans le modèle *in vivo* de greffe sous-cutanée de villosités humaines de 1<sup>er</sup> trimestre montre que des molécules peuvent être administrées par voie orale et être acheminées jusqu'au greffon. A ce jour aucun modèle sous-cutané n'avait été validé de cette façon. De plus, dans la fenêtre de vascularisation, soit J7-J14, le CMVH est capable d'infecter les tissus humains avec une charge virale équivalente au modèle *ex vivo*. Il est donc désormais possible de disposer des trois modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* pour analyser de façon complète et reproductible l'efficacité et la toxicité des différentes molécules anti-cytomégalovirus.





## Partie II : Evaluation de nouvelles molécules anti-CMVH

---

### Introduction

Les antiviraux couramment utilisés dans le traitement de l'infection à CMVH, le ganciclovir et sa prodrogue le valganciclovir, le cidofovir et le foscarnet sont tous des inhibiteurs de l'activité de synthèse d'ADN par la polymérase virale pUL54. Cependant, à cause de leur toxicité (neutropénie, néphrotoxicité) ces molécules sont proscrites chez la femme enceinte. Le letermovir, récemment approuvé par la FDA cible le complexe d'encapsidation mais n'est utilisé qu'en prophylaxie chez les patients receveurs de CSH (Gerna et al., 2019a).

Des mutations de résistances sont référencées pour toutes ces molécules avec parfois la présence de résistances croisées entre antiviraux conduisant à un échec thérapeutique chez le patient transplanté. Chez la femme enceinte, seul le valaciclovir a été évalué et semble montrer une certaine efficacité mais à dose élevée (Leruez-Ville et al., 2016), et aucun vaccin n'est à ce jour disponible.

Face à cette lacune thérapeutique, il est nécessaire de développer de nouveaux antiviraux. C'est pourquoi, dans cette seconde partie, nous nous sommes intéressés à trois molécules ayant des mécanismes d'actions différents.

Dans un 1<sup>er</sup> temps et dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Pr. Manfred Marschall (Institute for Clinical and Molecular Virology, University of Erlangen-Nürnberg, Allemagne), nous avons évalué le potentiel d'un dérivé trimérique de l'artésunate, la molécule TF27, dans nos modèles *in vitro* et *ex vivo*. Les résultats ont fait l'objet d'une publication dans *Antiviral Research*.

Dans un 2<sup>ème</sup> temps, nous avons évalué l'activité de LAVR-289, molécule développée par l'unité CNRS ICOA UMR7311, et qui fait l'objet d'un dépôt de brevet. L'équipe ICOA, s'est basée sur le mode d'action du cidofovir pour développer cette molécule. Le but étant d'obtenir un dérivé offrant une meilleure biodisponibilité ainsi qu'une plus faible toxicité.

En parallèle, nous avons testé dans nos modèles la capacité inhibitrice d'une HIG, le Cytotect® CP (Biotest, France et Allemagne). Le but étant de mieux comprendre le mode d'action de cette

préparation d'immunoglobulines ainsi que son potentiel dans le traitement ou la prévention de l'infection congénitale à CMV.



## I. Evaluation de TF27

### I.1. Introduction à l'article

L'artésunate est un dérivé semi-synthétique de l'artémisine, recommandé par voie intraveineuse en cas de paludisme grave, chez l'adulte, chez l'enfant sans limite inférieure d'âge, et peut également être administré chez la femme enceinte pendant les deux derniers trimestres de grossesse. Durant le premier trimestre, la toxicité de cette molécule limite son utilisation aux cas les plus graves, après avis médical (HCSP, 2018; National Center for Biotechnology and Usa, 2015).

L'artesunate est aussi connu pour son activité anti-CMVH et a montré une efficacité en traitement de sauvetage pour des patients transplantés résistants aux anti-polymérase (Germi et al., 2014). Cependant, la courte demi-vie de ce composé ainsi que les variations d'efficacité entre individus sont un problème majeur de cette molécule. En regard de l'activité anti-CMVH de l'artésunate, TF27, un dérivé trimérique de l'artésunate, a été développé et est capable d'inhiber la réplication des souches de CMVH (Hahn et al., 2018; Hutterer et al., 2015; Shapira et al., 2008; Sonntag et al., 2019).

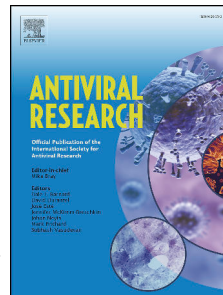
TF27 interfère avec la voie NF-KB, nécessaire à l'activation du promoteur du CMVH, MIEP, (DeMeritt et al., 2004; Hutterer et al., 2015). Dans l'article ci-après, nous avons évalué le potentiel anti-CMVH de TF27 dans plusieurs types cellulaires *in vitro* et dans notre modèle de culture de villosités placentaires.



# Journal Pre-proof

A highly potent trimeric derivative of artesunate shows promising treatment profiles in experimental models for congenital HCMV infection *in vitro* and *ex vivo*

Chloé Jacquet, Manfred Marschall, Déborah Andouard, Charhazed El Hamel, Thierry Chianeana, Svetlana B. Tsogoeva, Sébastien Hantz, Sophie Alain



PII: S0166-3542(19)30534-0

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104700>

Reference: AVR 104700

To appear in: *Antiviral Research*

Received Date: 24 September 2019

Revised Date: 9 December 2019

Accepted Date: 17 December 2019

Please cite this article as: Jacquet, Chloé., Marschall, M., Andouard, Dé., El Hamel, C., Chianeana, T., Tsogoeva, S.B., Hantz, Sé., Alain, S., A highly potent trimeric derivative of artesunate shows promising treatment profiles in experimental models for congenital HCMV infection *in vitro* and *ex vivo*, *Antiviral Research* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104700>.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2019 Published by Elsevier B.V.

**A highly potent trimeric derivative of artesunate shows promising treatment profiles in experimental models for congenital HCMV infection *in vitro* and *ex vivo***

Chloé Jacquet <sup>a-b</sup>, Manfred Marschall <sup>c</sup>, Déborah Andouard <sup>a-b-d</sup>, Charhazed El Hamel <sup>e</sup>,  
Thierry Chianea <sup>f</sup>, Svetlana B. Tsogoeva <sup>g</sup>, Sébastien Hantz <sup>a-b-d</sup>, Sophie Alain <sup>a-b-d</sup>

<sup>a</sup> Université Limoges, UMR1092, 2 rue du Pr Descottes, 87000 Limoges, France

<sup>b</sup> INSERM, UMR 1092, 2 rue du Pr Descottes, 87000 Limoges, France

<sup>c</sup> Institute for Clinical and Molecular Virology, Friedrich-Alexander University of Erlangen-Nürnberg, Schlossgarten 4, 91054 Erlangen, Germany

<sup>d</sup> National Reference center for Herpesviruses, Virology department, CHU Limoges, 2 rue Martin Luther King, 87000 Limoges, France

<sup>e</sup> Mother and child biobank (CB-HME), Pediatric department, Hôpital de la mère et de l'enfant, CHU Limoges, Limoges, France

<sup>f</sup> Department of Biochemistry and molecular genetics, CHU Limoges, France

<sup>g</sup> Organic Chemistry Chair I and Interdisciplinary Center for Molecular Materials (ICMM), Friedrich-Alexander University of Erlangen-Nürnberg, Nikolaus-Fiebiger-Straße 10, 91058 Erlangen, Germany

Corresponding author:

Pr Sophie Alain, INSERM, UMR 1092, 2 rue du Pr Descottes, 87000 Limoges, France

[sophie.alain@unilim.fr](mailto:sophie.alain@unilim.fr)

## 1. Introduction

Human cytomegalovirus (HCMV), a *beta-herpesvirus*, has a worldwide prevalence of 45% to more than 95%, depending on income level. Even though infection remains asymptomatic in most cases, HCMV can cause severe complications in immunocompromised hosts and during pregnancy [1,2]. More so, HCMV infection is the most common viral congenital infection with a prevalence of 0.7% [3]. 12% of infected newborns are symptomatic at birth [4] and , 40% to 58% among them develop permanent sequelae such as sensorineural hearing loss, mental disabilities or microcephaly [4–6]. Currently used antiviral treatments, ganciclovir (GCV) and its prodrug valganciclovir (VGCV), foscarnet (FOS) and cidofovir (CDV), are inhibitors of HCMV DNA synthesis by targeting viral polymerase pUL54 [7]. But, due to their toxicity (e.g. neutropenia, nephrotoxicity), their use is proscribed during pregnancy [8–10]. Letermovir (LMV, Prevydis®), an inhibitor of late stage viral replication, has been recently approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency, so far exclusively for prophylaxis of allogeneic hematopoietic stem cell HCMV-seropositive recipients [11]. However, resistant mutations have been described for all these drugs both *in vitro* and *in vivo* [12,13]. New molecules combining high efficacy and low cytotoxicity remain an important unmet need in congenital and post-transplant HCMV infection.

Even though the mechanism of HCMV infection *in utero* is not entirely understood, some placental tissues such as amniotic membrane, decidua and villi, are known to support viral replication [14,15]. Floating villi and anchoring villi seem to be a source of HCMV transmission to the fetus. Moreover, floating villi are immersed in maternal blood, making it a possible entry site towards the fetus [16,17]. For *in utero* placenta infection, viral particles have been detected in epithelia of decidua endothelial glands but also in floating villi. This

type of infection in placenta-specific tissues can cause lesions during pregnancy through virus-induced apoptosis or edema [18,19].

Since 2010, the World Health Organization (WHO) recommends the use of either artesunate (ART) or quinine to treat severe malaria in pregnancy from the first trimester [20–22]. ART, a semisynthetic derivative of artemisinin, additionally exerts a strong anti-herpesviral activity, particularly against various strains of HCMV [23,24]. In this context, we previously demonstrated the capacity of artesunate (ART) to inhibit HCMV infection in a placental villi explant model [25]. Moreover, ART proved partial efficacy in some clinical cases of rescue therapy against multidrug resistant HCMV infections in transplant recipients [26–28]. However, the drug's short half-life and high intra-individual variation of drug pharmacokinetics is a major drawback.

Due to the promising antiviral activity of ART against HCMV, monomeric, dimeric and trimeric derivatives of ART have been synthesized recently by our and other groups to optimize anti-HCMV activity and drug stability [26,29–33]. Among them, the trimeric ART-derived compound TF27 (Fig.1) showed high *in vitro* efficacy against HCMV strain AD169 and *in vivo* against MCMV Smith strain [29–31].

The nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) is known to be implicated in HCMV replication by transactivation of the major immediate early promoter-enhancer (MIEP) and further viral control elements [34,35]. Although the validation of the antiviral mechanism and target proteins requires further characterization, the current knowledge about identified proteins targeted by TF27 [36] strongly suggests that ART or functional analogs like TF27 do not directly target HCMV proteins, but interfere with the cellular pathways of NF- $\kappa$ B and additional signaling modules [30].

In this study, we first evaluated TF27' cytotoxicity in various cell types, including a placenta cellular model considering that to date, TF27 has been mostly analyzed in primary



human foreskin fibroblasts (HFFs). We thereby tested its antiviral efficacy against HCMV in an *in vitro* and an *ex vivo* placental model. Placental *ex vivo* HCMV infection model was analyzed with cultures of 1<sup>st</sup> trimester and 3<sup>rd</sup> trimester floating villi explants, aiming to demonstrate the antiviral activity of TF27 specifically under these clinically relevant conditions.

## 2. Material & methods

### 2.1 Cells and viruses

**Cells:** Human embryonic lung fibroblasts (HEF) (MRC-5 cells, BioMérieux) cells and epithelial cells (ARPE-19, ATCC® CRL-2302) were cultured in minimum essential medium (MEM, Eurobio) and minimal essential medium (DMEM F12, Fisher Scientific,) respectively, both supplemented with 10% of fetal bovine serum (Gibco, Life Technology), 50µg/mL penicillin and 10µg/mL gentamycin. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC, Lonza) were cultured in Endothelial Basal Medium (EBM-2, Lonza) supplemented with Single Quote Bullet Kit (EGM-2 Single Quote kit and Growth Factor, Lonza) according to manufacturer's instructions.

**Viruses:** HCMV laboratory strain AD169 was purchased from ATCC (VR-538) and endotheliotropic strains TB40/E and VHL/E were kindly provided by Stephane Chavanas (UMR 1043, CPTP, Toulouse, France). HCMV clinical isolate S\* was obtained from the urine of a congenitally infected neonate. For *in vitro* assays, viral HCMV strains were cultured in cell-associated virus in 25cm<sup>2</sup> culture flasks. For placenta model, cell-free virus stocks of AD169, TB40/E, VHL/E strains were obtained after passages on confluent monolayer of ARPE-19 in 25cm<sup>2</sup>, then twice on 75cm<sup>2</sup> and 175cm<sup>2</sup> culture flasks up to 90 - 100 % cytopathic effect. Supernatant was collected and frozen at -80°C overnight before

clarification by 10min centrifugation at 3500rpm, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The infectious viral titer was determined on MRC-5 or ARPE-19 cells by foci forming units per mL (pfu/mL).

## 2.2 Antiviral compounds

ART was purchased from CliniScience (France). TF27 was designed and synthesized in the laboratory of S.B.T [37]. ART was aliquoted in 50% DMSO in sterile water at 20mM and TF27 was reconstituted in DMSO at 1mM, both stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For antiviral efficacy and cytotoxicity assays, drugs were diluted in cell medium to obtain a final concentration of  $40\mu\text{M}$  for ART before making half dilutions to  $0.625\mu\text{M}$ . For TF27, we first diluted the drug in cell medium at  $0.320\mu\text{M}$  and then, making one-half dilutions to  $0.005\mu\text{M}$ . Considering ART's short half-life, it was renewed in the medium every second day, which was not required for TF27

## 2.3 Antiviral assays

Confluent HEFs cultivated in 48-well plates were infected with strain AD169, TB40/E, VHL/E or S\* in cell-associated virus at three infected cells per 1000 cells to get 20 to 50 foci per well. After 45min centrifugation, 3500rpm at  $37^{\circ}\text{C}$ , culture medium was removed from the 48-well plates, and cells were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in the presence of various drugs concentrations. ART was evaluated in a concentration range of  $0.625\mu\text{M}$  to  $20\mu\text{M}$  and TF27 ranging from 5nM to 160nM. After 5 days, foci of cytopathic effects (one infected cell surrounded by at least two infected cells) were counted using inverted microscopy and the 50% effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) and 90% effective concentration ( $\text{EC}_{90}$ ) were determined from the dose-response analysis using *GraphPad Prism* software (GraphPad Software, CA).

## 2.4 Antiviral-associated cytotoxicity in vitro

Antiviral-associated cytotoxicity was evaluated using *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit* (Promega, France) by measuring of LDH release according to manufacturer's instructions. Cytotoxicity was tested on growing cells and confluent cells in

96-well plates in a range from 0.625 $\mu$ M to 40 $\mu$ M for ART and 0.005 $\mu$ M to 0.320 $\mu$ M for TF27. Antiviral-associated cytotoxicity was calculated by subtracting spontaneous cell death for each condition tested and results were expressed as the proportion to 100% cell death. Concentrations with 50% and 90% of cell death due to antiviral-associated cytotoxicity, were the 50% (CC<sub>50</sub>) and 90% (CC<sub>90</sub>) cytotoxic concentrations respectively.

### 2.5 Placenta

Placentae were collected from 1st trimester voluntary termination of pregnancy (8-14 weeks of gestation) or after 3rd trimester caesarean delivery without pregnancy complications, with the women's consent, in collaboration with the *biological resources center* of the Mother and Child Hospital of Limoges, France (Collection Biologique HME). Floating villi (5mm<sup>3</sup>) were washed with 0.9% saline solution and cultured in HEF cells' medium. The explants from HCMV seropositive women were destined for cytotoxicity assays and explants from HCMV seronegative women for efficacy assays and viral kinetic determination. HCMV IgG status was determined by chemiluminescent enzymatic assay on analyzer Liaison® XL (Diasorin).

### 2.6 Ex vivo model

The *ex vivo* model was adapted from Morère et al., 2015 [25]. Briefly, HEF cells were infected with cell-free virus stock of AD169, TB40/E or VHL/E strains with a multiplicity of infection (MOI) of 1 in HEF culture medium. Plates were centrifuged for 45min, 3500 rpm, at 37°C and then medium was changed. After seven days of incubation at 37°C (5% CO<sub>2</sub>), a sponge (Spongostan dental™, NewPharma, Belgium) with a placental villi explant was added in each well and incubated at 37°C (5% CO<sub>2</sub>). After seven additional days, sponges and explants were transferred on new plates without cell monolayers for antiviral assay. Fresh medium containing the different drugs concentrations was added to each test condition respectively. Fresh medium without antiviral was set as control.

For determining viral replication kinetics, samples from each *ex vivo* condition were collected and measured at different times post-infection (day 4, 10 and 13), explants were removed and stored at -80°C. Supernatant was aliquoted and stored at -80°C for  $\beta$ -hCG concentration measurement. Assays were performed in triplicate on each of the three placentae used per experiment.

### 2.7 Viral load in explants

**Total DNA extraction from villi explants:** Explants were lysed in proteinase K (Qiagen, Germany) solution with 200nM Tris and 10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) at 56°C until total degradation. Then, DNA extraction was performed using NucliSENS® technology on EasyMag instrument (BioMérieux, France) following the protocol “*specific B*”.

**A duplex quantitative PCR** for HCMV *UL83* and for *albumin* genes was optimized from two previously published TaqMan assays [38,39]. Finally, 5 $\mu$ l of each total DNA extract were mixed with 1X of Perfecta Multiplex qPCR toughmix (Quanta Biosciences, USA), 250nM of each primer and 200nM of each probe and DNA/RNA free water to a final volume of 25 $\mu$ L. qPCR cycling protocol was: 30s at 95°C, then 45 cycles of 45s at 60°C on the CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad laboratories). HCMV and albumin copies were quantified using a range of plasmid with *UL83* or albumin gene using CFX Manager Software (Bio-Rad laboratories). Primers sequences were: *UL83* (5'-GTCAGCGTTCGTGTTTCCCA-3'; 5'-GGGACACAACACCGTAAAGC-3') and albumin (5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3'; 5-AAACTCATGGGAGCTGCTGGT T-3'). Probes were: HCMV [Cyanine5]- CCCGCAACCCGCAACCCTTGATG-[BHQ3] 3' and albumin [6FAM]- CCTGTCATGCCCACACAAATCTCTCC-[TAMRA] (Sigma-Aldrich).

### 2.8 $\beta$ -hCG dosage for cytotoxicity in villi explants

$\beta$ -hCG concentration released by villi explant in the supernatant was measured by electroluminescent “sandwich” ELISA on magnetic microparticles (Cobas, Roche, France). Results were expressed in mUI per  $10^6$  cells (using albumin coding sequence quantification as reference). The concentration of antiviral was considered toxic when  $\beta$ -hCG was significantly higher from the control placenta without antiviral.

### 2.9 Statistical analysis

Statistical analysis was performed in *GraphPad Prism* software (GraphPad Software, CA). Comparison analysis were performed using *two-way ANOVA* test. Differences between 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimester were analyzed at different time of incubation with or without antiviral drugs. Statistically significant differences were defined by a p value lower than 0.05.

## 3. Results

### 3.1 TF27 has a higher *in vitro* efficacy against HCMV replication compared to ART.

Antiviral assays were performed with TF27 and ART against AD169 strain, endotheliotropic strains VHL/E and TB40/E, and clinical strain S\*. Results are summarized in Table 1. TF27 showed a potent efficacy against all tested viral strains with  $EC_{50}$  and  $EC_{90}$  at nanomolar range, while the efficacy of ART was in micromolar range with  $EC_{50}$  100-fold to 200-fold higher than TF27 (Table 1). ART didn't reach the  $EC_{90}$ , even with at the highest concentration tested (e.g. 20 $\mu$ M) (S.1). TF27's *in vitro*  $EC_{50}$  and  $EC_{90}$  did not vary among strains or isolate with an  $EC_{50}$  close to 0.010 $\mu$ M, except for VHL/E ( $EC_{50}$  = 0.019 $\mu$ M). There were no significant variations on  $EC_{50}$  and  $EC_{90}$  results regarding cell type when comparing HEF cells and epithelial cells (ARPE-19) (Table 1).

### 3.2 Evaluation of TF27 cytotoxicity in various cell types.

The antiviral-associated cytotoxicity at EC<sub>50</sub> and EC<sub>90</sub> was determined in HEF cells, in ARPE-19 (epithelial cells) and HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), on growing and on confluent cells, supposed to have a less proliferative capacity. Results are summarized in Table 2. TF27 tended to be more toxic in confluent cells but with a cytotoxicity always lower than 11.84 ±11.90% (Table 2). CC<sub>50</sub> and CC<sub>90</sub> for both tested drugs were not reached, even for the highest concentrations tested (40µM for ART; 0.320µM for TF27). Accordingly, minimal therapeutics index calculated (TI, [CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>]) are 28 for TF27 on AD169, TB40/E and S\* strains (TI, [0.320µM/0.011µM]) and concerning VHL/E, 17 (TI, [0.320µM/0.019µM]). For ART, minimal TI was 13 ([40µM/3.12µM]) (Table 3).

### 3.3 Kinetics of HCMV AD169 and the two endotheliotropic strains TB40/E and VHL/E.

We first evaluated the kinetics of AD169, TB40/E and VHL/E replication in 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimester placental villi by measuring the HCMV viral load in order to determine the best condition for antiviral assay in placenta explant. HCMV strains AD169, TB40/E and VHL/E were able to infect floating villi explants (Fig.2). In the 1<sup>st</sup> trimester villi, AD169 strain reached a peak at 2.6x10<sup>6</sup> viral copies per million cells after 10 days of incubation and was stable at day 13 (Fig.2.A). Infectivity of AD169 strain was 4-fold lower in the 3<sup>rd</sup> trimester placenta (Fig.2.A). Both TB40/E and VHL/E strains replicated at lower levels in 3<sup>rd</sup> trimester placenta. In 1<sup>st</sup> trimester, they both replicated with a significantly increased rate at day 13 compared to 3<sup>rd</sup> trimester (Fig.2.B and 2.C). In 3<sup>rd</sup> trimester explants, the median VHL/E viral load was almost two-fold lower than TB40/E with less variation between placentae (Fig. 2B and 2C). AD169 and VHL/E did not replicate efficiently in term villi explant in comparison with viral load curves obtained in 1<sup>st</sup> trimester placenta.

Infection of explants had no impact on  $\beta$ -hCG levels whatever the time of placenta collection (1<sup>st</sup> or 3<sup>rd</sup> trimester) (Fig.2D).  $\beta$ -hCG levels were lower in 3<sup>rd</sup> trimester explants than 1<sup>st</sup> trimester ones.

#### 3.4 TF27 is more efficient in 1st trimester placenta.

Efficacy of TF27 and ART was evaluated against AD169, VHL/E and TB40/E strains in 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimester placenta at the peak of replication showed at day 13. EC<sub>50</sub> and EC<sub>90</sub> for ART and TF27 were determined by the drug concentration leading to a 50% and 90% reduction of the HCMV copy number per million cells respectively, in comparison with the viral load without treatment. TF27 (Fig. 3B, 3D and 3F) and ART (Fig. 3A, 3C and 3E) were not effective against HCMV infection in term villi explants. By contrast, the viral load decreased significantly with both drugs in 1<sup>st</sup> trimester placenta explants. TF27 in 1<sup>st</sup> trimester placenta showed a potent efficacy with an EC<sub>50</sub> at least 200-fold lower than ART EC<sub>50</sub>. Both ART and TF27 reached the EC<sub>90</sub> *ex vivo* (Table 1). TF27 and ART had no significant impact on  $\beta$ -hCG release in supernatant in 1<sup>st</sup> or 3<sup>rd</sup> trimester placenta (Fig.4A and 4B).

TF27 exerts potent anti-HCMV activity with very low cytotoxicity in 1<sup>st</sup> trimester placenta floating villi with an EC<sub>50</sub> in a range from 0.020 $\mu$ M to 0.027 $\mu$ M and an EC<sub>90</sub> in a range from 0.080 $\mu$ M to 0.131 $\mu$ M (Table 1) and without impact on explant viability (Fig.4A).

## 4. Discussion

HCMV is a major public health issue. Severe sequelae may occur in newborns with congenital HCMV infection [3]. Unfortunately, due to their toxicity, therapeutics currently available in transplant recipients (such as GCV, FOS, and CDV) are not available during pregnancy. In this study, we evaluated *in vitro* and *ex vivo* efficacy of TF27, trimeric synthetic form of artemisinin in comparison with ART, already proven safe during pregnancy and given malaria treatment in pregnant women from the 1<sup>st</sup> trimester of gestation [22,30].

TF27 activity *in vitro* was previously described against GFP-AD169 laboratory strain in HFFs [30,40]. Here, we analyzed TF27 efficacy against other HCMV strains, AD169 without GFP reporter, two endotheliotropic strains VHL/E and TB40/E, and one clinical strain S\* to evaluate the efficacy of the drug against a wider variety of HCMV strains. Such experiments enriched the available data concerning potential efficacy in HCMV infection. TF27 EC<sub>50</sub> of was in nanomolar range (0.011 ±0.002μM for AD169) as previously described [30] with the strain A169-GFP (EC<sub>50</sub>: 0.04 ±0.01μM). The TF27 EC<sub>50</sub> against HCMV strains used in our study is 4-fold lower than TF27 EC<sub>50</sub> against AD169-GFP [30]. This difference of strains' sensitivity to the drug can be due to the method used to determine EC<sub>50</sub>. In this study, EC<sub>50</sub> was assessed by counting the numbers of foci formed by HCMV infection using inverted microscopy whereas Hutterer et al. [30] measured EC<sub>50</sub> by cell lysis and GFP quantification. Finally, TF27 showed a strong efficacy in nanomolar range against laboratory strains, such as AD169, TB40/E or VHL/E but also against urine newborn strain S\* at lower concentrations than the micromolar range of ART efficacy.

We evaluated TF27 cytotoxicity in HEF cells, endothelial cells (HUVEC) and epithelial cells (ARPE-19). TF27 showed minor impact on cellular death at EC<sub>50</sub> and EC<sub>90</sub> in all cell types tested, growing or confluent, with maximum cytotoxicity at 11.84 ±11.90% at TF27 EC<sub>90</sub> (Table 2). As demonstrated before [30], tested concentrations of TF27 up to 3.3μM showed no adverse side effects on cell proliferation, which we confirmed here for the first time in several other cell types. This new data allowed to calculate a minimal therapeutic index of TF27 (TI, [CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>]) over 297 for AD169 strain (TI, [3.3μM/0.011μM]).

Furthermore, we analyzed TF27 efficacy in a more complex model *ex vivo* model of floating villi explant cultures, adapted from Morère et al. [25]. We selected villi explants over decidua, considering their pathophysiological role in HCMV transmission at the materno-fetal interface. Concerning the behavior of our HCMV strains (AD169, TB40/E and VHL/E) we



observed a significantly higher viral load in 1<sup>st</sup> trimester villi than in 3<sup>rd</sup> trimester villi at day 13. This could be explained by the difference of villi cell structure between 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimester. During 1<sup>st</sup> trimester of pregnancy, trophoblasts from chorionic sac differentiate into cytotrophoblast cells (CTB) and syncytiotrophoblasts (ST). 1<sup>st</sup> trimester villi are composed by endothelial cells which delimit blood capillaries and CTB cells with a proliferative activity surrounded by ST cells. At 3<sup>rd</sup> trimester of pregnancy, the villi loses the CTB layer and are just composed by ST cells and blood capillaries [41,42]. Moreover, ST cells seem to have a protective effect against microbial vertical transmission by multiple ways of defenses [42]. Thus, low level of AD169 or VHL/E replication in 3<sup>rd</sup> trimester explants was not due to a weakness of villi explants because there were no significant decreases of  $\beta$ -hCG levels between infected and non-infected villi. We observed a decrease of  $\beta$ -hCG level between 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimester placentae as previously described [43] with VHL/E strain in villi culture model. During pregnancy,  $\beta$ -hCG level is subjected to variations with a peak at around 9 weeks of gestation before a decrease during the rest of gestation [44].

Moreover, we observed a strong difference on drugs efficacies between 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> trimester floating villi. TF27 and ART had a dramatic impact on viral load decrease in villi from 1<sup>st</sup> trimester placentae. We showed that TF27 has a potent anti-HCMV activity without impact on explant viability with no decrease of  $\beta$ -hCG level (Fig 3). Additionally, TF27 showed an EC<sub>50</sub> at least 100-fold lower than ART (TF27 EC<sub>50</sub>=0.019 ±0.002 $\mu$ M [VHLE/E]; ART EC<sub>50</sub> =6.49 ±1.17  $\mu$ M), as we and others demonstrated *in vitro*. The efficacy of TF27 could not be tested against clinical strains due to their inability to produce enough cell-free viral particles to infect villi explants. Nevertheless, we proved the potent efficacy of TF27 to decrease viral load of three different HCMV strains in 1<sup>st</sup> trimester villi with different viral loads and with negligible effect on villi viability.

As ART is given from the 1<sup>st</sup> trimester of pregnancy and during all gestation, its derived, TF27, is also a promising way for drug development in congenital HCMV treatment. Another drug, VGCV, was delivered for *in utero* treatment of congenital infection in a phase II study [45] and proved some effect but for high doses (8g daily). GCV and VGCV were given for infant during 6 week to improve audiologic outcomes for symptomatic newborns [46,47]. But, resistance cases have already been described [48]. Moreover, TF27 showed to be effective at nanomolar ranges and presented a very good thermal stability [30], unlike ART which required to be renewed every two days with to compensate for the rapid degradation of the compound.

In this study we showed that 1<sup>st</sup> trimester villi are a good adapted model to evaluate efficacy of new anti HCMV drugs. Low levels of  $\beta$ -hCG and HCMV replication in 3<sup>rd</sup> trimester placenta demonstrated that term placenta is an organ less adapted to viral replication. Therefore, TF27 had a good efficacy in various cell lines and in 1<sup>st</sup> trimester villi explant model against several HCMV strains. TF27 can be a good candidate for further drug development against HCMV infection.

### **Acknowledgements**

We are thanking the members of the *Collection Biologique HME* and all the midwives who participated in this project. We thank Thierry Chianea and the technicians of the Biochemistry platform for the  $\beta$ -hCG measurement. We also want to thank the CNR herpesvirus for the kind sharing of the S\* strain and Stephane Chavanas (UMR 1043, CPTP, Toulouse, France) for giving both TB40/E and VHL/E strains. We also gratefully acknowledge the financial support from Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) by grants TS 87/16-3, MM 1289/7-1/7-3 and MM1289/11-1.

**Declarations of interest:** none

Journal Pre-proof

**Table 1. Antiviral activity of artesunate and TF27 *in vitro* and *ex vivo*.** Efficacy of compounds was analyzed by plaque reduction assay for *in vitro* evaluation on human embryonic fibroblast HEF and epithelial cells (ARPE-19) (n=3). The reference strains AD169 and two endotheliotropic strains TB40/E and VHL/E, plus our low range (<5) isolate S\* from urine of an infected newborn, were tested. EC<sub>50</sub> and EC<sub>90</sub> were also determined 13 days post-infection in 1<sup>st</sup> trimester floating villi (n=3 placentae). EC<sub>50</sub> and EC<sub>90</sub> were calculated using GraphPad Prism software.

HEF cells				
Strains	TF27		ART	
	EC <sub>50</sub> μM	EC <sub>90</sub> μM	EC <sub>50</sub> μM	EC <sub>90</sub> μM
AD169	0.011 ±0.002	0.032 ±0.003	1.96 ±1.32	Nr
TB40/E	0.010 ±0.002	0.039 ±0.0042	2.18 ±1.2	Nr
VHL/E	0.019 ±0.002	0.044 ±0.003	3.12 ±1.1	Nr
S*	0.011 ±0.001	0.020 ±0.006	1.3 ±0.7	Nr
ARPE-19 cells				
Strains	EC <sub>50</sub> μM	EC <sub>90</sub> μM	EC <sub>50</sub> μM	EC <sub>90</sub> μM
AD169	Nt	Nt	Nt	Nt
TB40/E	0.013 ±0.003	0.039 ±0.002	1.81 ±1.3	Nr
VHL/E	0.018 ±0.001	0.043 ± 0.002	3.5 ±0.9	Nr
S*	0.014 ± 0.007	0.023 ± 0.003	1.9 ±1.1	Nr
1st trimester placental villi				
Strains	EC <sub>50</sub> μM	EC <sub>90</sub> μM	EC <sub>50</sub> μM	EC <sub>90</sub> μM
AD169	0.024 ±0.003	0.082 ±0.003	11.51 ±1.49	35.12 ±3.01
TB40/E	0.028 ±0.004	0.132 ±0.002	4.33 ±1.14	32.41 ±2.25
VHL/E	0.020 ±0.002	0.082 ±0.002	6.49 ±1.17	22.53 ±2.02

Nr: Not reached; Nt: Not tested

**Table 2. *In vitro* cytotoxicity of antivirals in HFF, endothelial (HUVEC) and epithelial (ARPE) cells at EC<sub>50</sub> and EC<sub>90</sub>.** Percentage of cell death after subtracting spontaneous cell death for each condition tested was determined after 5 days of treatment by measurement of LDH release (n=3).

Cells	TF27 <i>in vitro</i> (EC <sub>50</sub> )		TF27 <i>in vitro</i> (EC <sub>90</sub> )		ART <i>in vitro</i> (EC <sub>50</sub> )	
	Toxicity Growing cells	Toxicity Confluent cells	Toxicity Growing cells	Toxicity Confluent cells	Toxicity Growing cells	Toxicity Confluent cells
HFF	0.24 ±0.024%	2.50 ±2.50%	0.03 ±0.05%	11.84 ±11.90%	1.20 ±0.94%	2.36 ±3.34%
HUVEC	0%	0%	1.41 ±1.41%	9.82 ±0.56%	0%	0%
ARPE	1.64 ±1.31%	5.25 ±3.31%	1.71 ±0.72%	0%	0%	0%

**Table 3. Minimal therapeutic index of TF27 and ART.** Minimal therapeutic indexes were calculated with the highest concentration tested, as CC<sub>50</sub> value was not reached, under *in vitro* IC<sub>50</sub> value for each virus (for TF27: 0.320μM/IC<sub>50</sub>; for ART: 40μM/IC<sub>50</sub>)

Virus	Minimal TI on HFF		Minimal TI on ARPE		N t: Not tested
	TF27	ART	TF27	ART	
AD169	29	20	Nt	Nt	
TB40E	32	18	25	22	
VHL/E	17	13	18	11	
S*	29	31	23	21	

- [1] Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 2013;96:333–60. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31829df29d>.
- [2] Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The “silent” global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:86–102. <https://doi.org/10.1128/CMR.00062-12>.
- [3] Leruez-Ville M, Ville Y. Fetal cytomegalovirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2017;38:97–107. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.10.005>.
- [4] Soper DE. Congenital cytomegalovirus infection: an obstetrician’s point of view. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2013;57 Suppl 4:S171-173. <https://doi.org/10.1093/cid/cit611>.
- [5] Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol* 2007;17:355–63. <https://doi.org/10.1002/rmv.544>.
- [6] Boppana SB, Ross SA, Fowler KB. Congenital Cytomegalovirus Infection: Clinical Outcome. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2013;57:S178–81. <https://doi.org/10.1093/cid/cit629>.
- [7] Lurain NS, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:689–712. <https://doi.org/10.1128/CMR.00009-10>.
- [8] Lischka P, Zimmermann H. Antiviral strategies to combat cytomegalovirus infections in transplant recipients. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8:541–8. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.07.002>.
- [9] Matsumoto K, Shigemi A, Ikawa K, Kanazawa N, Fujisaki Y, Morikawa N, et al. Risk factors for ganciclovir-induced thrombocytopenia and leukopenia. *Biol Pharm Bull* 2015;38:235–8. <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00588>.
- [10] James SH, Kimberlin DW. Advances in the Prevention and Treatment of Congenital Cytomegalovirus Infection. *Curr Opin Pediatr* 2016;28:81–5. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000305>.
- [11] Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, Maertens J, Dadwal SS, Duarte RF, et al. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 2017;377:2433–44. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706640>.
- [12] Chou S. Rapid In Vitro Evolution of Human Cytomegalovirus UL56 Mutations That Confer Letermovir Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:6588–93. <https://doi.org/10.1128/AAC.01623-15>.
- [13] Frietsch JJ, Michel D, Stamminger T, Hunstig F, Birndt S, Schnetzke U, et al. In Vivo Emergence of UL56 C325Y Cytomegalovirus Resistance to Letermovir in a Patient with Acute Myeloid Leukemia after Hematopoietic Cell Transplantation. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2019;11:e2019001. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2019.001>.
- [14] Kumazaki K, Ozono K, Yahara T, Wada Y, Suehara N, Takeuchi M, et al. Detection of cytomegalovirus DNA in human placenta. *J Med Virol* 2002;68:363–9. <https://doi.org/10.1002/jmv.10212>.
- [15] Tabata T, Pettitt M, Fang-Hoover J, Zydek M, Pereira L. Persistent Cytomegalovirus Infection in Amniotic Membranes of the Human Placenta. *Am J Pathol* 2016;186:2970–86. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.07.016>.
- [16] Fisher S, Genbacev O, Maidji E, Pereira L. Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis. *J Virol* 2000;74:6808–20. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.15.6808-6820.2000>.

- [17] Maidji E, Percivalle E, Gerna G, Fisher S, Pereira L. Transmission of human cytomegalovirus from infected uterine microvascular endothelial cells to differentiating/invasive placental cytotrophoblasts. *Virology* 2002;304:53–69.
- [18] Pereira L, Maidji E, McDonagh S, Tabata T. Insights into viral transmission at the uterine-placental interface. *Trends Microbiol* 2005;13:164–74. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.02.009>.
- [19] Weisblum Y, Panet A, Zakay-Rones Z, Haimov-Kochman R, Goldman-Wohl D, Ariel I, et al. Modeling of human cytomegalovirus maternal-fetal transmission in a novel decidual organ culture. *J Virol* 2011;85:13204–13. <https://doi.org/10.1128/JVI.05749-11>.
- [20] National Center for Biotechnology NC for B, MD B, Usa 20894. TREATMENT OF UNCOMPLICATED P. FALCIPARUM MALARIA IN SPECIAL RISK GROUPS. World Health Organization; 2015.
- [21] McGready R, Lee SJ, Wiladphaingern J, Ashley EA, Rijken MJ, Boel M, et al. Adverse effects of falciparum and vivax malaria and the safety of antimalarial treatment in early pregnancy: a population-based study. *Lancet Infect Dis* 2012;12:388–96. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70339-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70339-5).
- [22] Roussel C, Caumes E, Thellier M, Ndour PA, Buffet PA, Jauréguiberry S. Artesunate to treat severe malaria in travellers: review of efficacy and safety and practical implications. *J Travel Med* 2017;24. <https://doi.org/10.1093/jtm/taw093>.
- [23] Kaptein SJF, Efferth T, Leis M, Rechter S, Auerchs S, Kalmer M, et al. The anti-malaria drug artesunate inhibits replication of cytomegalovirus in vitro and in vivo. *Antiviral Res* 2006;69:60–9. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.10.003>.
- [24] Efferth T, Romero MR, Wolf DG, Stamminger T, Marin JJG, Marschall M. The antiviral activities of artemisinin and artesunate. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2008;47:804–11. <https://doi.org/10.1086/591195>.
- [25] Morère L, Andouard D, Labrousse F, Saade F, Calliste C-A, Cotin S, et al. Ex vivo model of congenital cytomegalovirus infection and new combination therapies. *Placenta* 2015;36:41–7. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.11.003>.
- [26] Shapira MY, Resnick IB, Chou S, Neumann AU, Lurain NS, Stamminger T, et al. Artesunate as a potent antiviral agent in a patient with late drug-resistant cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2008;46:1455–7. <https://doi.org/10.1086/587106>.
- [27] Wolf DG, Shimoni A, Resnick IB, Stamminger T, Neumann AU, Chou S, et al. Human cytomegalovirus kinetics following institution of artesunate after hematopoietic stem cell transplantation. *Antiviral Res* 2011;90:183–6. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.03.184>.
- [28] Germe R, Mariette C, Alain S, Lupo J, Thiebaut A, Brion JP, et al. Success and failure of artesunate treatment in five transplant recipients with disease caused by drug-resistant cytomegalovirus. *Antiviral Res* 2014;101:57–61. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.10.014>.
- [29] Hahn F, Fröhlich T, Frank T, Bertzbach LD, Kohrt S, Kaufer BB, et al. Artesunate-derived monomeric, dimeric and trimeric experimental drugs - Their unique mechanistic basis and pronounced antiherpesviral activity. *Antiviral Res* 2018;152:104–10. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.02.013>.
- [30] Hutterer C, Niemann I, Milbradt J, Fröhlich T, Reiter C, Kadioglu O, et al. The broad-spectrum anti-infective drug artesunate interferes with the canonical nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) pathway by targeting RelA/p65. *Antiviral Res* 2015;124:101–9. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.10.003>.

- [31] Sonntag E, Hahn F, Bertzbach LD, Seyler L, Wangen C, Müller R, et al. In vivo proof-of-concept for two experimental antiviral drugs, both directed to cellular targets, using a murine cytomegalovirus model. *Antiviral Res* 2019;161:63–9. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.11.008>.
- [32] Arav-Boger R, He R, Chiou C-J, Liu J, Woodard L, Rosenthal A, et al. Artemisinin-derived dimers have greatly improved anti-cytomegalovirus activity compared to artemisinin monomers. *PLoS One* 2010;5:e10370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010370>.
- [33] Mott BT, He R, Chen X, Fox JM, Civin CI, Arav-Boger R, et al. Artemisinin-derived dimer phosphate esters as potent anti-cytomegalovirus (anti-CMV) and anti-cancer agents: a structure-activity study. *Bioorg Med Chem* 2013;21:3702–7. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.04.027>.
- [34] DeMeritt IB, Milford LE, Yurochko AD. Activation of the NF-kappaB pathway in human cytomegalovirus-infected cells is necessary for efficient transactivation of the major immediate-early promoter. *J Virol* 2004;78:4498–507. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.9.4498-4507.2004>.
- [35] DeMeritt IB, Podduturi JP, Tilley AM, Nogalski MT, Yurochko AD. Prolonged activation of NF-kappaB by human cytomegalovirus promotes efficient viral replication and late gene expression. *Virology* 2006;346:15–31. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.065>.
- [36] Fröhlich T, Hahn F, Belmudes L, Leidenberger M, Friedrich O, Kappes B, et al. Synthesis of Artemisinin-Derived Dimers, Trimers and Dendrimers: Investigation of Their Antimalarial and Antiviral Activities Including Putative Mechanisms of Action. *Chem Weinh Bergstr Ger* 2018;24:8103–13. <https://doi.org/10.1002/chem.201800729>.
- [37] Reiter C, Fröhlich T, Zeino M, Marschall M, Bahsi H, Leidenberger M, et al. New efficient artemisinin derived agents against human leukemia cells, human cytomegalovirus and Plasmodium falciparum: 2nd generation 1,2,4-trioxane-ferrocene hybrids. *Eur J Med Chem* 2015;97:164–72. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.053>.
- [38] Mengelle C, Pasquier C, Rostaing L, Sandres-Sauné K, Puel J, Berges L, et al. Quantitation of human cytomegalovirus in recipients of solid organ transplants by real-time quantitative PCR and pp65 antigenemia. *J Med Virol* 2003;69:225–31. <https://doi.org/10.1002/jmv.10277>.
- [39] Mazet-Wagner AA, et. Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus total DNA and covalently closed circular DNA in peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B... - PubMed - NCBI n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/?term=Real-time+PCR+quantitation+of+hepatitis+B+virus+total+DNA+and+covalently+closed+circular+DNA+in+peripheral+blood+mononuclear+cells+from+hepatitis+B+virus-infected+patients> (accessed September 5, 2019).
- [40] Marschall M, Freitag M, Weiler S, Sorg G, Stamminger T. Recombinant Green Fluorescent Protein-Expressing Human Cytomegalovirus as a Tool for Screening Antiviral Agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1588–97.
- [41] Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* 2004;114:397–407. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.06.038>.
- [42] Arora N, Sadovsky Y, Dermody TS, Coyne CB. Microbial Vertical Transmission during Human Pregnancy. *Cell Host Microbe* 2017;21:561–7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.007>.



- [43] Lopez H, Benard M, Saint-Aubert E, Baron M, Martin H, Al Saati T, et al. Novel model of placental tissue explants infected by cytomegalovirus reveals different permissiveness in early and term placentae and inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity. *Placenta* 2011;32:522–30. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.04.016>.
- [44] Korevaar TIM, Steegers EAP, de Rijke YB, Schalekamp-Timmermans S, Visser WE, Hofman A, et al. Reference ranges and determinants of total hCG levels during pregnancy: the Generation R Study. *Eur J Epidemiol* 2015;30:1057–66. <https://doi.org/10.1007/s10654-015-0039-0>.
- [45] Leruez-Ville M, Ghout I, Bussi eres L, Stirnemann J, Magny J-F, Couderc S, et al. In utero treatment of congenital cytomegalovirus infection with valgancyclovir in a multicenter, open-label, phase II study. *Am J Obstet Gynecol* 2016;215:462.e1-462.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.04.003>.
- [46] Kimberlin DW, Lin C-Y, S anchez PJ, Demmler GJ, Dankner W, Shelton M, et al. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J Pediatr* 2003;143:16–25. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(03\)00192-6](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(03)00192-6).
- [47] Kimberlin DW, Jester PM, S anchez PJ, Ahmed A, Arav-Boger R, Michaels MG, et al. Valganciclovir for symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *N Engl J Med* 2015;372:933–43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1404599>.
- [48] Morillo-Gutierrez B, Waugh S, Pickering A, Flood T, Emonts M. Emerging (val)ganciclovir resistance during treatment of congenital CMV infection: a case report and review of the literature. *BMC Pediatr* 2017;17:181. <https://doi.org/10.1186/s12887-017-0933-6>.

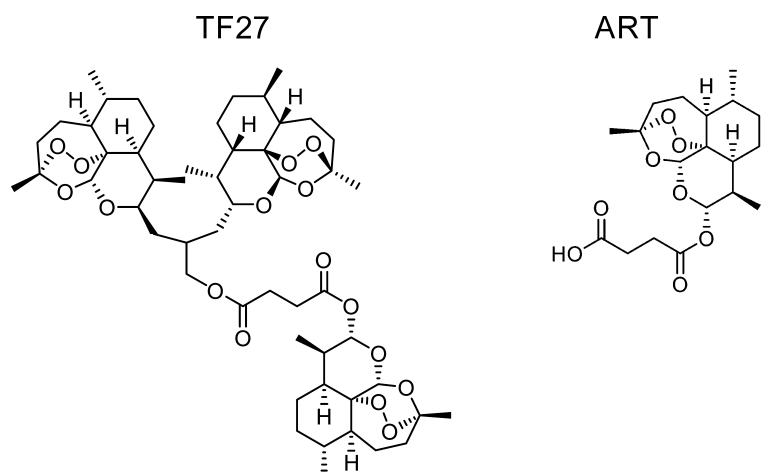
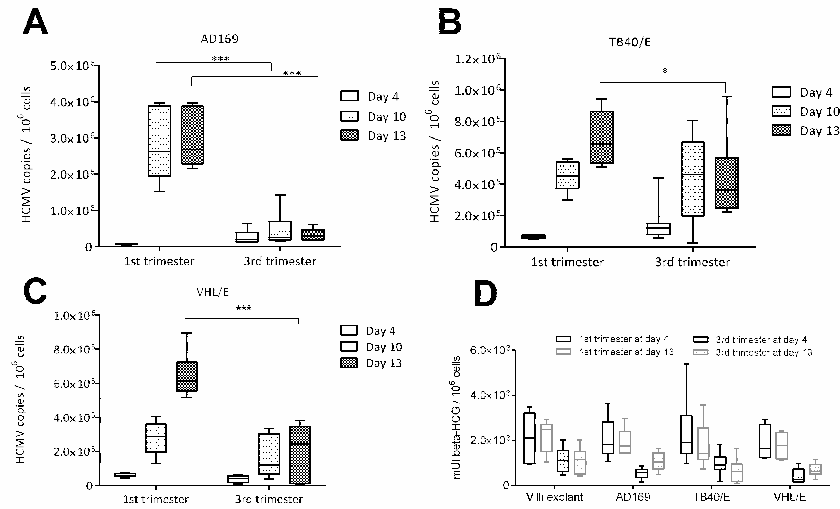
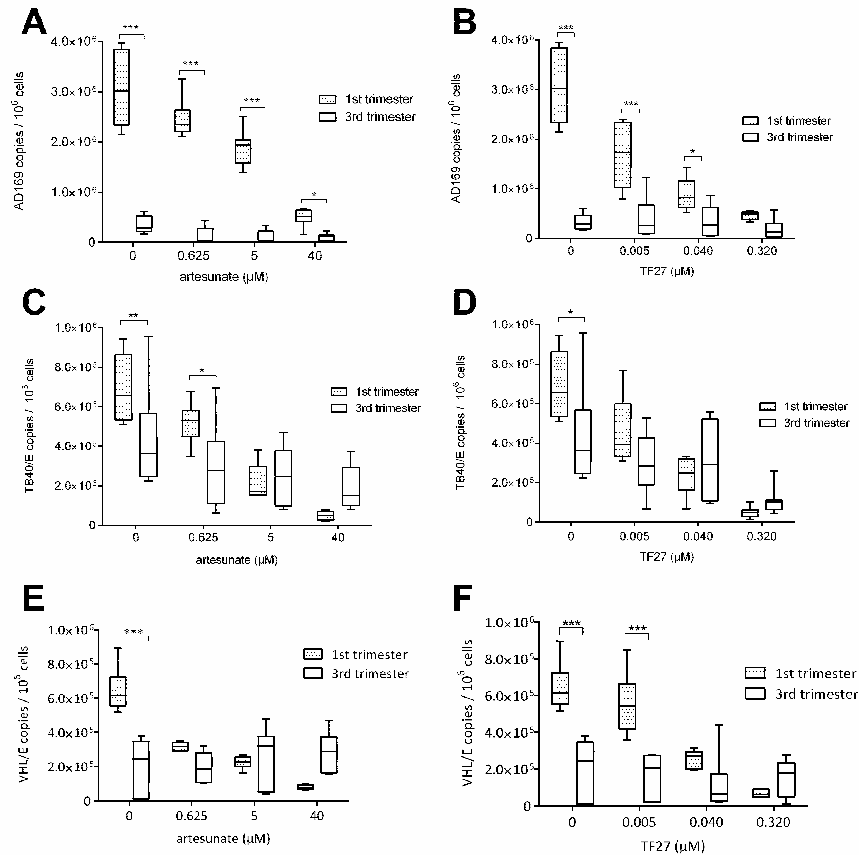


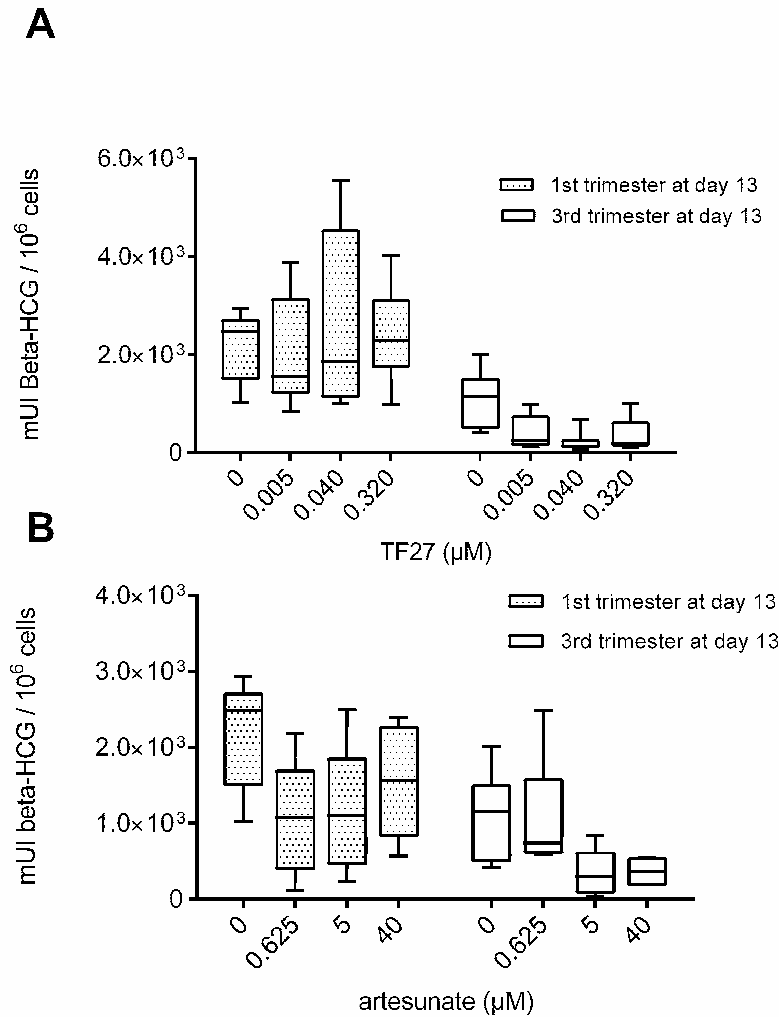
Figure1. Structures of artesunate (ART) and TF27, a trimeric derivative of ART



**Figure 2. Kinetic of HCMV replication in 1st and 3rd trimester villi explant.** HCMV copies per  $10^6$  cells were measured by qPCR multiplex HCMV/albumin at day 4, 10 and 13 after villi infection for (A) AD169 strain, (B) TB40/E strain and (C) VHL/E strain, in three different placentae with three replicates per placenta. (D) Release of beta-hCG in villi supernatant infected or not by HCMV strains. Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). \*:  $p < 0.05$  and \*\*\*:  $p < 0.001$ . Boxplots are designed as median (Q2), the lower quartile (Q1) and the upper quartile (Q3). Whiskers are extended to the extreme data points.



**Figure 3. Antiviral efficacy of TF27 and artesunate in early and term placental explants.** Viral load of AD169 was measured with (A) artesunate or (B) TF27 treatment. Efficacy of artesunate was tested against (C) TB40/E and (E) VHL/E strains. Efficacy of TF27 was tested against (D) TB40/E and (F) VHL/E strains. Viral loads were measured by qPCR after 13 days of treatment. Statistical analyses were carried out using GraphPad Prism with 2way ANOVA test (GraphPad Software, San Diego, CA). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  and \*\*\*:  $p < 0.001$ . Boxplots are designed as median (Q2), the lower quartile (Q1) and the upper quartile (Q3). Whiskers are extended to the extreme data points.



**Figure 4. Impact of TF27 and artesunate on beta-hCG release by villi explants.** Level of beta-hCG release in supernatant of floating villi after 13 days of treatment with (A) TF27 and (B) artesunate. Results were expressed in mUI of beta-HCG per million cells and assays were performed on 3 different placentae. Boxplots are designed as median (Q2), the lower quartile (Q1) and the upper quartile (Q3). Whiskers are extended to the extreme data points.

**Highlight :**

TF27, a derivate of artesunate, was evaluated *in vitro* and in an *ex vivo* model of placental against cytomegalovirus strains.

TF27 showed efficacy against various HCMV strains in different cell types.

TF27 decreased HCMV load in 1<sup>st</sup> trimester floating villi explant culture without significant impact on villi viability.

Experimental drug TF27, showed promising effects for further antiviral drug development.

## I.2. Conclusions sur TF27

A travers cet article, nous avons donc mis en évidence l'intérêt de TF27 dans le développement de nouveaux composés anti-CMVH.

Dans un premier temps, nous avons démontré que ce dérivé de l'artésunate était capable d'inhiber l'infection à CMVH dans divers types cellulaires, contre des souches de laboratoires et un isolat clinique. Cette activité *in vitro* est effective à des concentrations efficaces non cytotoxiques.

Cette évaluation nous a aussi permis de confirmer que notre modèle d'infection de villosités de 3<sup>ème</sup> trimestre n'est pas pertinent pour l'évaluation de composés à visée anti-CMVH. Toutefois, les essais en 1<sup>er</sup> trimestre sont concluants et encourageants pour le développement de molécules sur le modèle de TF27. En effet, TF27 est efficace à des concentrations presque 100 fois inférieures à l'artésunate sans cytotoxicité sur les placentas.







## II. Evaluation de LAVR-289

Le cidofovir a prouvé son efficacité dans le traitement de l'infection à CMVH mais est néphrotoxique. Sa prodrogue, le brincidofovir, est tout aussi efficace mais possède une meilleure biodisponibilité et une moindre toxicité en s'affranchissant du transport transmembranaire via les transporteurs d'anion organique OAT1 (Tippin et al., 2016). Cependant, face à l'apparition de mutations de résistances, un consensus international met en évidence la nécessité de développer de nouveaux antiviraux pour répondre aux besoins de traitement des patients transplantés (Kotton et al., 2018).

LAVR-289 est un acyclonucléoside phosphonate sous sa forme prodrogue dont le développement est basé sur la structure du cidofovir. Les groupements biolabiles de cette prodrogue sont clivés par des voies enzymatiques cellulaires rendant ainsi la molécule active. Cette molécule a été synthétisée par l'unité CNRS ICOA UMR7311 d'Orléans. Dans le cadre d'une collaboration avec cette unité, nous avons donc testé le potentiel anti-CMVH de cette molécule, en comparaison avec le cidofovir, contre plusieurs souches de CMVH *in vitro* et *ex vivo*.



## **II.1. Matériel et méthodes**

### **II.1.1. Cultures cellulaires et virales**

Deux types cellulaires ont été employés pour l'évaluation des différentes molécules antivirales : des fibroblastes (FEH), et des cellules épithéliales (ARPE-19) d'épithélium rétinien. Les milieux de cultures ainsi que l'entretien des cellules sont décrits dans le paragraphe 2.1 de l'article ainsi que dans le paragraphe II.1 de la Partie I (page 145).

La souche virale AD169 portant le gène de la *green fluorescent protein* ou AD169-GFP est un don du Pr. Martin MESSERLE (Hannover Medical school, Allemagne). Les souches à tropisme endothélial et épithélial, VHL/E et TB40/E sont décrites dans le paragraphe 2.1 de l'article ainsi que dans le paragraphe II.2 de la Partie I (page 94). La production de virions extracellulaires est décrite dans le paragraphe II.3 de la Partie I (page 94).

### **II.1.2. Molécules antivirales**

Le cidofovir (CDV) (Heritage Pharmaceuticals Inc., USA) est remis en suspension à 100 mM dans de l'eau ppi et conservé à -80°C. LAVR-289 est synthétisé dans le laboratoire du Dr Vincent ROY (Institut de Chimie Organique et Analytique - ICOA UMR7311, Orléans) et remis en suspension à 10mM dans du DMSO. Après remise en suspension, les molécules sont conservées à -80°C durant 1 mois.

### **II.1.3. Essais d'efficacité de molécules *in vitro*.**

Les essais sont réalisés sur les cellules FEH cultivées en plaques 48 puits. La souche AD169-GFP est cultivée sur flasques de 25 cm<sup>2</sup> jusqu'à atteindre au moins 90% d'ECP sur cellules FEH. La nappe cellulaire est alors rincée au versène-EDTA (Versène-EDTA 1/5000, Eurobio, France) avant ajout de trypsine-EDTA (0,05% trypsine et 0,53 mM EDTA, Eurobio, France). Les cellules exprimant la GFP sont diluées à 500 cellules/mL de façon à infecter les cellules à une MOI de 0,003. La MOI est calculée pour compter entre 25 et 50 foyers d'infection par puits après 5 jours d'incubation pour les conditions sans antiviraux. Pour les souches produisant dans le surnageant, la dilution à

la MOI de 0,003 se fait à partir des aliquotes titrés de chaque souche virale (cf. paragraphe II.3 de la Partie I, page 94).

500µL de suspension cellulaire sont distribués par puits. La plaque est centrifugée 45 min à 3500 rpm avant de renouveler le milieu de culture par les dilutions d'antiviraux à tester. Après 5 jours d'incubation à l'étuve à 37°C, (5% de CO<sub>2</sub> et atmosphère humide) le nombre de foyers d'infection est compté par puits pour déterminer les EC<sub>50</sub> et EC<sub>90</sub> des antiviraux testés. Chaque condition est testée en triplicat et sur trois essais indépendants.

Les concentrations inhibitrices 50% et 90% (EC<sub>50</sub> et EC<sub>90</sub>) sont déterminées par la concentration de molécule nécessaire pour réduire de respectivement de 50% et 90% le nombre de foyers d'infection. Ceci est déterminé à l'aide du logiciel *GraphPad Prism* (GraphPad Software, San Diego, USA) par une analyse de type dose-réponse.

#### **II.1.4. Essais de cytotoxicité**

La cytotoxicité des composés est évaluée en plaque 96 puits sur cellules FEH, ou ARPE-19 par mesure du relargage de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le surnageant de culture cellulaire. Les antiviraux sont dilués dans le milieu correspondant aux cellules utilisées (cf. II.1 de la partie I, page 93). Si le DMSO sert de solvant pour la molécule (cas pour LAVR-289), un contrôle avec une dilution de DMSO est aussi effectué. La dilution de DMSO est basée sur la plus haute concentration de la molécule testée. Un témoin de mort cellulaire naturelle est aussi réalisé. 250 µL de chaque dilution et des témoins sont distribués sur une plaque avec cellules et sur une plaque sans cellules. Après 5 jours d'incubation dans une étuve à 37°C, la toxicité des composés est évaluée à l'aide du kit *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit* (Promega, France) en suivant les recommandations du fournisseur.

Les concentrations cytotoxiques de 50% et 90% (CC50 et CC90), indiquant 50% ou 90% de mort cellulaire, sont déterminées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism* (GraphPad Software, San Diego, CA) par une analyse type dose-réponse.

### **II.1.5. Collection Biologique de placentas**

La collection biologique de placentas est décrite dans le paragraphe II.4 de la Partie I (page 96). Seules les villosités issues de placentas de 1<sup>er</sup> trimestre ont été utilisées dans cette évaluation.

### **II.1.6. Modèle d'infection des villosités**

Les villosités de 1<sup>er</sup> trimestre ont été infectées par les souches virales VHLE/E et TB40/E selon la méthode décrite dans le paragraphe II.5 de la partie I (page 97). Le traitement est effectué à partir du jour 0 et les explants sont collectés au jour 13 post-traitement et conservés à -80°C. La charge virale dans les explants est telle que décrite dans le paragraphe II.6 de la Partie I (page 97). Les surnageants sont aliquotés et conservés à -80°C avant dosage des  $\beta$ -hCG (cf. II.7 de la Partie I, page 98). Les essais sont effectués en triplicatas sur 3 placentas différents par type d'expérience.

### **II.1.7. Analyses statistiques**

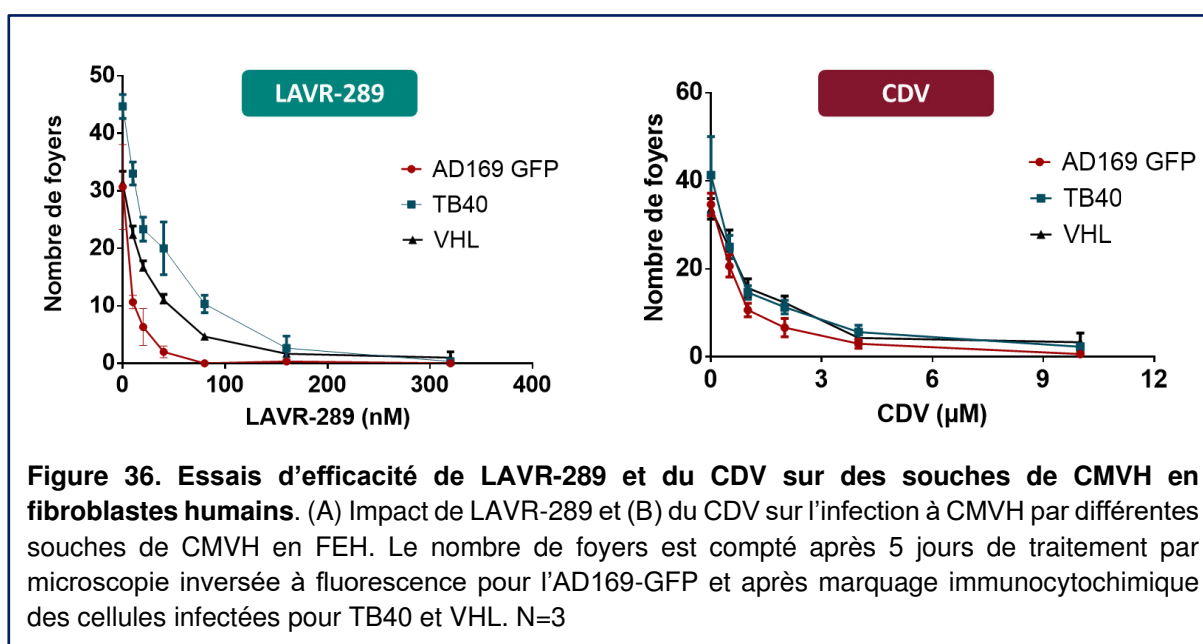
Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism* (GraphPad Software, USA) en utilisant le test « *two-way ANOVA* ».



## II.2. Résultats sur l'évaluation de LAVR-289

### II.2.1. Efficacité *in vitro* de LAVR-289

Nous avons évalué l'efficacité *in vitro* de LAVR-289, en comparaison de celle connue du CDV, contre trois souches de laboratoire : l'AD169-GFP, TB40 et VHL. LAVR-289, comme le CDV inhibe la réplication des 3 souches virales avec des profils de décroissance virale similaires (**Figure 36**).



L'AD169-GFP semble plus sensible à LAVR-289 que TB40 avec une valeur d' $EC_{50}$  de  $21,40 \pm 3,36$  nM et une  $EC_{90}$  de  $48 \pm 2,6$  nM pour l'AD169-GFP et des valeurs d' $EC_{50}$  et d' $EC_{90}$  de  $35,35 \pm 0,2$  nM et  $131,2 \pm 3,5$  nM respectivement, pour TB40 (**Tableau 8**). Les  $EC_{50}$  du CDV sont 30 fois plus élevées que celles de LAVR-289 avec des valeurs entre  $0,73 \pm 0,24$  μM et  $1,3 \pm 0,2$  μM pour l'AD169-GFP et TB40 respectivement (**Tableau 8**).

**Tableau 8. Concentrations efficaces 50% et 90% de LAVR-289 et du CDV en FEH.** Les  $EC_{50}$  et  $EC_{90}$  sont déterminées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism* d'après les valeurs présentées en **Figure 36**. (N=3)

Souches virales	LAVR-289		CDV	
	$EC_{50}$ nM	$EC_{90}$ nM	$EC_{50}$ μM	$EC_{90}$ μM
AD169-GFP	$21,40 \pm 3,6$	$48 \pm 2,6$	$0,73 \pm 0,24$	$3,5 \pm 1,1$
TB40	$35,35 \pm 0,2$	$131,2 \pm 3,5$	$1,3 \pm 0,2$	$4,8 \pm 1,4$
VHL	$30,04 \pm 1,6$	$124,1 \pm 7,6$	$0,86 \pm 0,1$	$4,2 \pm 1,2$

A la différence du CDV qui, aux plus fortes concentration testées (10  $\mu\text{M}$ ), n'inhibe pas complètement l'apparition de foyers (entre 3 à 4 foyers par puits restants), les plus hautes concentrations de LAVR-289 montrent une plus grande inhibition du nombre de foyers (entre 0 et 1). Les essais en fibroblastes montrent que LAVR-289 est capable d'inhiber la réplication du CMVH dans une gamme de concentrations de l'ordre du nanomolaire (**Figure 36**). Le CDV est aussi efficace contre ces trois souches virales mais à des concentrations de l'ordre du micromolaire.

## II.2.2. Cytotoxicité *in vitro* de LAVR-289

La cytotoxicité de LAV-289 a été évaluée *in vitro* sur les cellules FEH et ARPE-19 à confluence ou en croissance (subconfluentes). La  $\text{CC}_{50}$  est atteinte pour LAVR-289 dans les deux types cellulaires à une concentration de  $17,14 \pm 6,5 \mu\text{M}$  en FEH en croissance et de  $12,98 \pm 5,3 \mu\text{M}$  en ARPE-19 en croissance (**Tableau 9**). La différence entre les valeurs de  $\text{CC}_{50}$  sur cellules à confluence et en croissance n'est pas significative ( $p > 0,1$ ).

Les valeurs de  $\text{CC}_{50}$  n'ont pas été atteintes pour le CDV, mêmes aux plus fortes concentrations testées (20  $\mu\text{M}$ ) (**Tableau 9**).

**Tableau 9. Cytotoxicité de LAVR-289 et du CDV *in vitro*.** Le pourcentage de cytotoxicité due au composé est déterminé par mesure de la lactate déshydrogénase libérée dans le milieu de culture après 5 jours d'incubation. (N = 3)

Cellules	LAVR-289		CDV	
	$\text{CC}_{50} \mu\text{M}$	$\text{CC}_{90} \mu\text{M}$	$\text{CC}_{50} \mu\text{M}$	$\text{CC}_{90} \mu\text{M}$
FEH croissance	$17,14 \pm 6,5$	$34,6 \pm 6,5$	Na	Na
FEH confluence	$28,04 \pm 6,3$	$87,52 \pm 6,3$	Na	Na
ARPE-19 croissance	$12,98 \pm 5,3$	Na	Na	Na
ARPE-19 confluence	$26,71 \pm 2,1$	Na	Na	Na

Na : non atteinte





L'index thérapeutique [IT :  $CC_{50}/EC_{50}$ ] de LAVR-289 est entre 485 et 1310 suivant les souches virales utilisées et le type de cellules utilisé (**Tableau 10**). La  $CC_{50}$  du CDV n'ayant pas été atteinte, non n'avons pas calculé d'IT pour cette molécule.

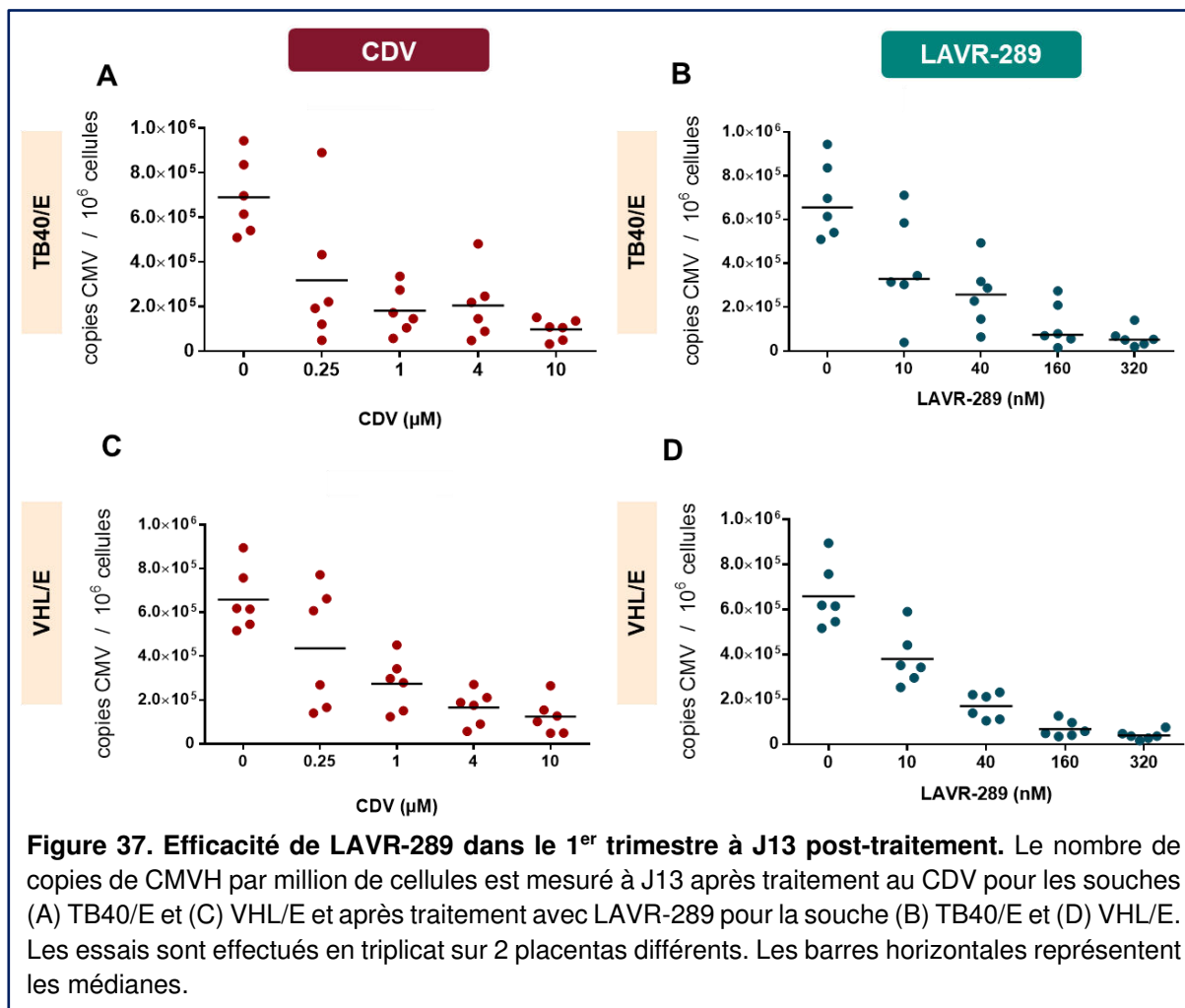
LAVR-289 présente donc un index thérapeutique intéressant avec des valeurs de  $CC_{50}$  et  $CC_{90}$  (**Tableau 10**) supérieures aux valeurs d' $EC_{50}$  et d' $EC_{90}$  (**Tableau 8**).

**Tableau 10. Index thérapeutique de LAV-289.** L'index thérapeutique [IT :  $CC_{50}/EC_{50}$ ] est calculé à partir des valeurs obtenues *in vitro*.

Souches virales	LAVR-289	
	Croissance	Confluentes
AD169-GFP	800	1310
TB40	485	793
VHL	570	933

### II.2.3. Efficacité de LAVR-289 dans le modèle *ex vivo* de villosité de 1<sup>er</sup> trimestre

Après avoir prouvé son efficacité *in vitro*, LAVR-289 a été mis en contact avec des villosités de 1<sup>er</sup> trimestre infectées par les souches TB40/E ou VHL/E. Les charges virales de TB40/E et VHL/E décroissent avec l'augmentation de concentration de LAVR-289 ou du CDV (**Figure 37**).



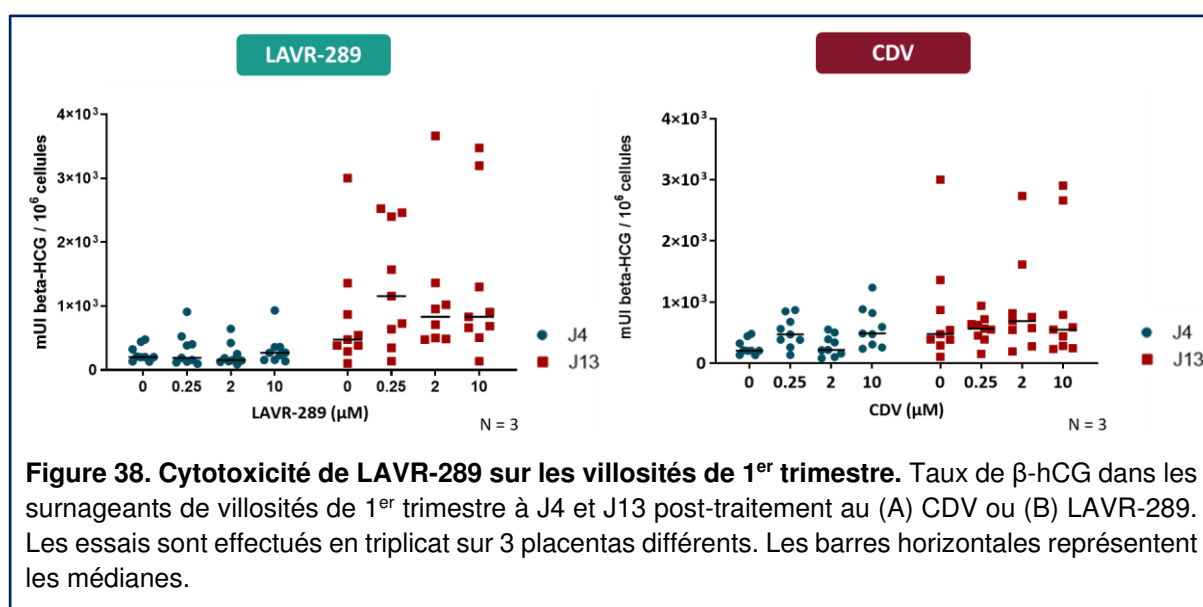
Les profils de décroissance de la charge virale sont similaires entre les souches de CMVH avec LAVR-289 (**Figure 37.B et D**). Le CDV impacte aussi les deux souches virales de la même façon (**Figure 37.A et C**). Ces deux molécules sont donc capables de diminuer l'infection virale après 13 jours de traitement dans les villosités de 1<sup>er</sup> trimestre. Les valeurs d' $EC_{50}$  de LAVR-289 et du CDV sont cependant très différentes (**Tableau 11**). L' $EC_{50}$  de LAVR-289 est de  $53,14 \pm 3,2$  nM et l' $EC_{90}$  de  $120,5 \pm 3,8$  nM pour TB40/E. Les doses efficaces du CDV sont quant à elles nettement supérieures avec une  $EC_{50} = 1,44 \pm 0,2$   $\mu$ M et une  $EC_{90} = 5,9 \pm 1,5$   $\mu$ M pour la souche TB40/E (**Tableau 11**).

**Tableau 11. Activité antivirale de LA-VR-289 et du CDV *ex vivo*.** Les valeurs d'EC50 et d'EC90 sont déterminées à J13 post-traitement à l'aide du logiciel *GraphPad Prism* (GraphPad Software, USA). Les essais sont effectués en triplicat sur 2 placentas différents.

Souches virales	LAVR-289		CDV	
	EC <sub>50</sub> nM	EC <sub>90</sub> nM	EC <sub>50</sub> μM	EC <sub>90</sub> μM
TB40/E	53,14 ±3,2	120,5 ±3,8	1,44 ±0,2	5,9 ±1,5
VHL/E	34,65 ±2,34	136,92 ±3,9	0,56 ±0,2	4,2 ±1,2

#### II.2.4. Cytotoxicité de LAVR-289 dans les villosités de 1<sup>er</sup> trimestre

La concentration cytotoxique 50% *in vitro* étant de l'ordre du micromolaire, nous avons choisi d'étudier l'impact de LAVR-289 dans la même gamme de concentration que celle du CDV.



La cytotoxicité de la molécule ayant été évaluée au bout de quelques jours *in vitro*, nous avons mesuré le taux de β-hCG dans les surnageants de villosités à J4 post-traitement et à la fin du traitement soit à J13. Les deux composés n'impactent pas significativement le taux de β-hCG dans les surnageants à J4 ou à J13. Pour LAVR-289, le taux de β-hCG tend à augmenter à J13 à la différence des villosités traitées avec du CDV.

Les concentrations cytotoxiques 50% et 90% ne sont atteintes pour aucun des deux composés.



### II.3. Conclusion sur LAVR-289

L'analogue du cidofovir, LAVR-289, possède donc une forte activité anti-CMVH *in vitro* et *ex vivo*. Que ce soit contre la souche de référence AD169-GFP ou contre les souches à tropisme épithélial VHL et TB40, LAVR-289 est capable d'inhiber l'infection à CMVH dans les fibroblastes avec des valeurs d'EC<sub>50</sub> de l'ordre du nanomolaire soit presque 40 fois moins que le cidofovir.

De plus, LAVR-289 présente un profil intéressant avec des indexes thérapeutiques élevés pouvant atteindre 1310. Ce profil est aussi observé dans le modèle d'infection de villosité de 1<sup>er</sup> trimestre avec une forte efficacité antivirale ainsi qu'un faible impact sur la cytotoxicité dans les villosités.

Ces résultats préliminaires dans l'évaluation de LAVR-289 sont donc encourageants pour un développement plus poussé de cette molécule.





### III. Evaluation du Cytotect® CP

Les immunoglobulines hyperimmunes (HIG) sont aussi utilisées dans la prise en charge de l'infection à CMVH et ont prouvé leur efficacité chez les patients receveurs de CSH (Alsuliman et al., 2018). Elles sont plus concentrées en IgG que les immunoglobulines standard données par voie intraveineuse (Germer et al., 2016). Même si dans un premier temps, leur utilisation dans un contexte d'infection congénitale n'a montré ses preuves (Revello et al., 2014), d'autres études démontrent que leur utilisation n'impacte pas sur le poids de naissance des nouveau-nés (Chiaie et al., 2018).

Dans une collaboration avec Biotest AG (France), nous avons repris l'évaluation du Cytotect® CP en commençant par les études *in vitro* puis *ex vivo* de cette HIG. Nous avons ainsi évalué cette molécule dans deux types cellulaires, les FEH et les ARPE-19, et commencé son étude *ex vivo*.







### III.1. Matériels et méthodes

#### III.1.1. Cultures cellulaires et virales

Deux types cellulaires ont été employés pour l'évaluation des différentes molécules antivirales : des fibroblastes (FEH), et des cellules épithéliales (lignée ARPE-19) d'épithélium rétinien. Les milieux de cultures ainsi que l'entretien des cellules sont décrits dans le paragraphe 2.1 de l'article ainsi que dans le paragraphe II.1 de la Partie I (page 93).

Les souches à tropisme endothélial et épithélial, VHL/E et TB40/E sont décrites dans le paragraphe 2.1 de l'article ainsi que dans le paragraphe II.2 de la Partie I (page 94). La production de virions extracellulaires est décrite dans le paragraphe II.3 de la Partie I (page 94).

#### III.1.2. Molécules antivirales

Le Cytotect® CP à 100 unités/mL provient de Biotest AG (Allemagne) et est conservé à +4°C. Le Cytotect® CP est utilisé dans le mois suivant l'ouverture pour éviter les variations de concentration en HIG anti-CMVH.

#### III.1.3. Essais de neutralisation

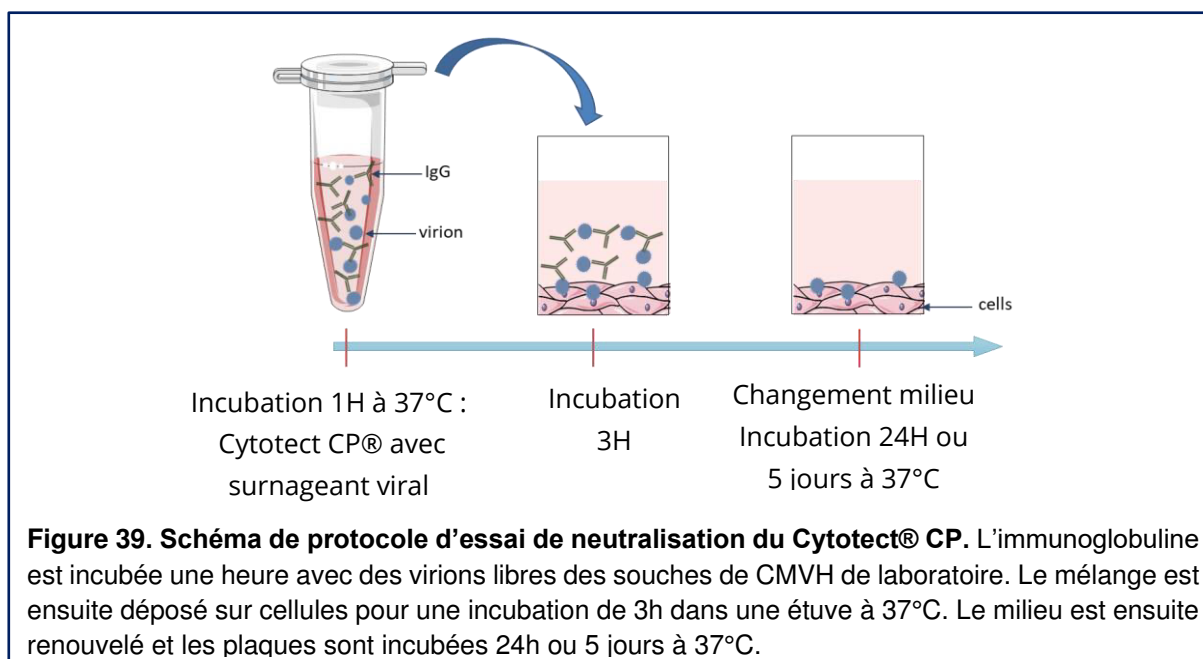
Les essais de neutralisation sont utilisés pour l'évaluation du Cytotect CP® contre des virions extracellulaires et nécessitent une incubation préalable du Cytotect CP® avec les virions.

- **Préparation du mélange virions - Cytotect CP® :**

Les surnageants viraux (titrés dans le paragraphe II.3.2 de la partie I, page 95) sont dilués dans le milieu correspondant aux FEH ou ARPE-19 mais sans sérum de veau fœtal. 225 µL de surnageant viral sont ajoutés à 225 µL de Cytotect CP® et incubés pendant une heure dans une étuve à 37°C (**Figure 39**). Les virions libres ainsi que le Cytotect CP® sont dilués à deux fois la concentration finale souhaitée de façon à obtenir une MOI de 0,1 pour les virions et les concentrations de 0,005 U/mL, 0,015 U/mL, 0,05 U/mL, 0,15 U/mL, 1,5 U/mL.

- **Infection des cellules et comptage des foyers d'infections :**

Le mélange est ensuite déposé sur cellules FEH ou ARPE-19 (**Figure 39**). Le milieu est alors supplémenté par 50  $\mu$ L de sérum de veau fœtal puis incubé 3h sur cellules dans une étuve à 37°C. Le milieu est renouvelé par du milieu sans virions ni Cytotect CP®. Après 5 jours d'incubation à 37°C, les cellules sont fixées et colorés par immunocytochimie (cf. paragraphe II.3.1 de la Partie I, page 94). Le nombre de foyers d'infection est compté pour chaque puits de façon à déterminer les doses neutralisantes 50% et 90% (DN<sub>50</sub> et DN<sub>90</sub>) de la molécule.



### III.1.4. Essais de cytotoxicité

La cytotoxicité des composés est évaluée en plaque 96 puits sur cellules FEH, ou ARPE-19 par mesure du relargage de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le surnageant de culture cellulaire (cf. II.1.4 de la Partie II, page146). Le Cytotect CP® est dilué dans le milieu correspondant aux cellules utilisées (cf. II.1 de la Partie I, page 93).

### III.1.5. Collection Biologique de placentas

La collection biologique de placentas est décrite dans le paragraphe II.4 de la Partie I (page 96). Seules les villosités issues de placentas de 1<sup>er</sup> trimestre ont été utilisées dans cette évaluation.

### III.1.6. Cytotoxicité du Cytotect CP® *ex vivo*

Les villosités de 1<sup>er</sup> trimestre sont cultivées selon la méthode décrite dans le paragraphe II.5 de la partie I (page 97). Le traitement est effectué à partir du jour 0 et les explants sont collectés au jour 13 post-traitement et conservés à -80°C. La charge virale dans les explants est telle que décrite dans le paragraphe II.6 de la Partie I (page 97). Les surnageants sont aliquotés et conservés à -80°C avant dosage des  $\beta$ -hCG (cf. II.7 de la Partie I, page 98). Les essais sont effectués en triplicatas sur 3 placentas différents par type d'expérience.

### III.1.7. Analyses statistiques

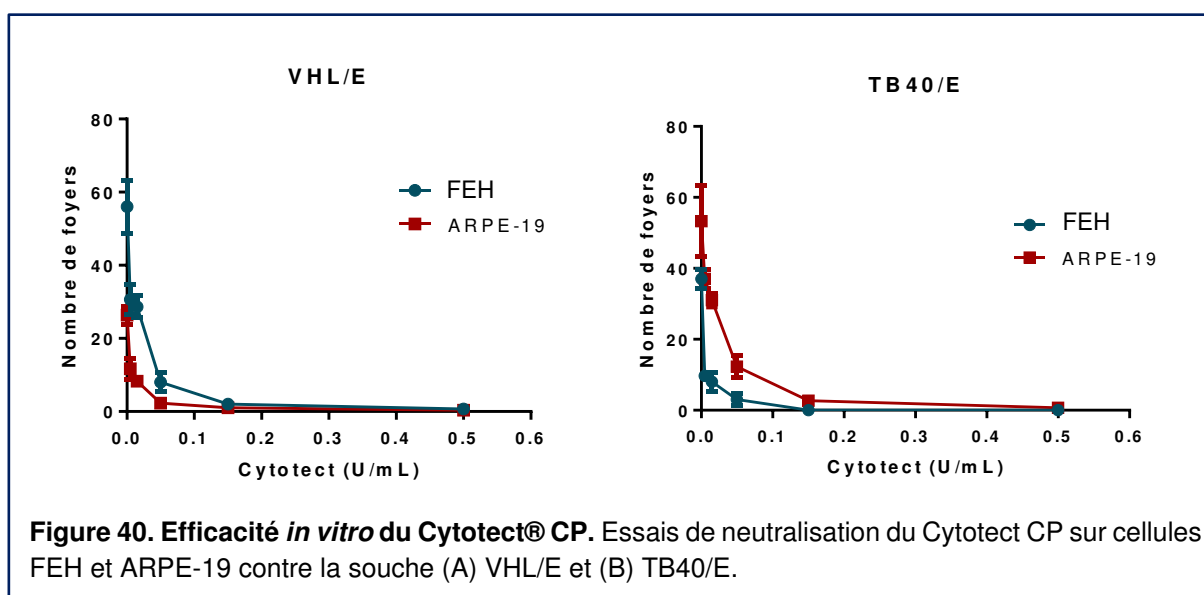
Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism* (GraphPad Software, USA) en utilisant le test « *two-way ANOVA* ».





## III.2. Résultats de l'évaluation du Cytotect® CP.

### III.2.1. Efficacité *in vitro* Cytotect CP



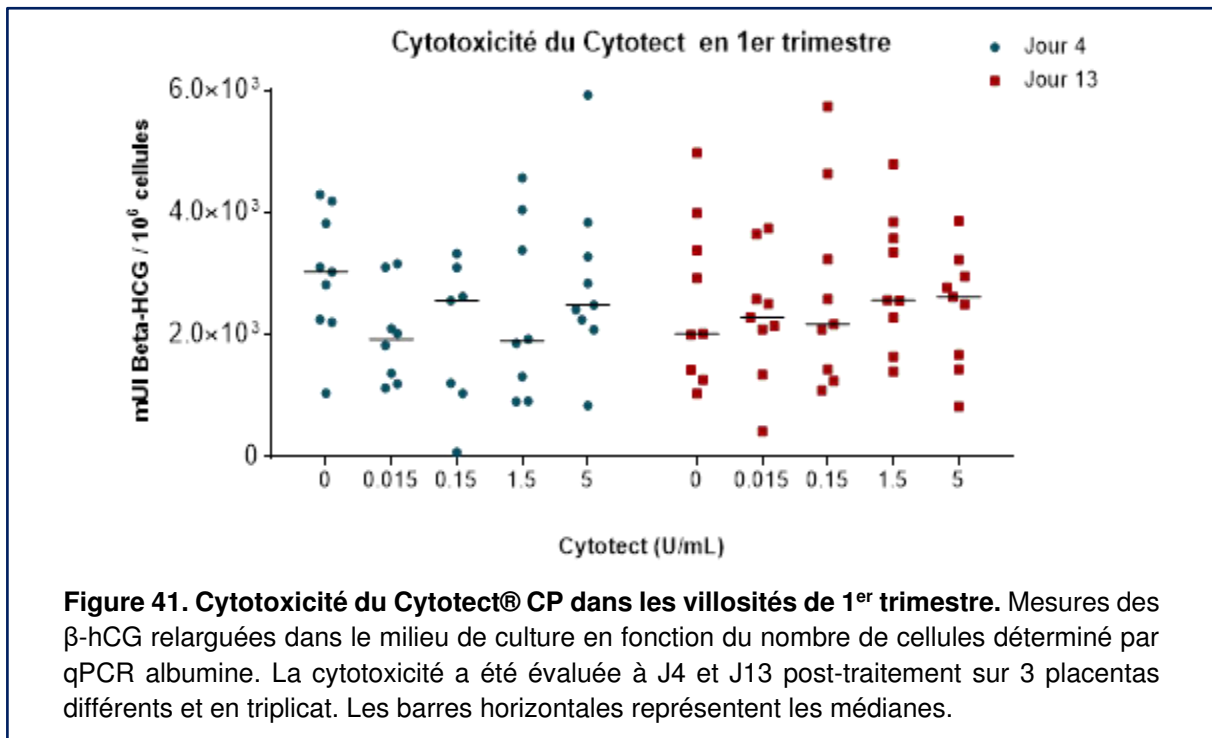
Les essais de neutralisations *in vitro* sur cellules FEH et ARPE-19, montrent la capacité du Cytotect® CP à inhiber l'apparition de foyers d'infection des souches VHL/E et TB40/E (**Figure 40**). L'efficacité du Cytotect® CP est équivalente contre les deux souches de CMVH utilisées et sur les deux types cellulaires employés pour ces essais (**Tableau 12**). Les différences de valeurs d'efficacité entre les souches d CMVH ne sont pas significatives ( $p > 0,9$ ).

**Tableau 12. DN<sub>50</sub> et DN<sub>90</sub> du Cytotect® CP *in vitro*.** Les valeurs de DN<sub>50</sub> et DN<sub>90</sub> sont déterminées à partir des graphes présentés en Figure 40.

Souches virales	FEH		ARPE-19	
	DN <sub>50</sub> unités/mL	DN <sub>90</sub> unités/mL	DN <sub>50</sub> unités/mL	DN <sub>90</sub> unités/mL
VHL/E	0,014 ±0,01	0,069 ±0,02	0,011±0,01	0,067 ±0,02
TB40/E	0,033 ±0,01	0,10 ±0,01	0,032 ±0,01	0,11 ±0,02

La cytotoxicité du Cytotect CP a été évaluée *in vitro*. Sur les cellules FEH ou ARPE-19, les pourcentages de mort cellulaire dus à la molécule (après soustraction de la mort cellulaire naturelle) sont nuls même pour la plus haute concentration testée (20 unités/mL). La CC<sub>50</sub> et la CC<sub>90</sub> n'ont donc pas été atteintes.

### III.2.2. Evaluation *ex vivo* du Cytotect CP



La production de  $\beta$ -hCG par les villosités flottantes de 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse n'est pas impactée par la présence du Cytotect® CP. Aucune décroissance significative du taux de  $\beta$ -hCG n'est observable à J4 ou à J13 post-traitement aux concentrations évaluées (**Figure 41**).

### III.3. Conclusion sur le Cytotect® CP

Le Cytotect® CP a donc montré son efficacité *in vitro* pour neutraliser l'infection par des souches de laboratoire de CMVH. Ces essais démontrent une bonne reproductibilité des résultats sachant que deux lots différents de Cytotect® CP ont été utilisés pour les essais *in vitro*.

Concernant les essais *ex vivo*, seul l'impact sur la viabilité des explants a pu être effectuée par manque de placentas issus de femmes séronégatives vis-à-vis du CMVH. Toutefois, cette HIG ne semble pas toxique pour les villosités de 1<sup>er</sup> trimestre. Les essais d'efficacité sont prévus et en cours de réalisation.







## Discussion et perspectives

---

L'infection à CMVH peut être à l'origine de complications sévères pour les patients immunodéprimés et peut aussi entraîner des séquelles plus ou moins sévères pour le fœtus lorsqu'elle survient chez la femme enceinte (Leruez-Ville and Ville, 2017). Le développement de traitements puissants et moins toxiques que les anti-polymérase, utilisables chez le nouveau-né ou le fœtus nécessite des modèles adaptés. Si le CMV murin permet d'étudier la physiopathologie et la réponse immune au cours des infections à CMV, la spécificité d'espèce des cibles antivirales limite le développement de modèles permettant d'évaluer l'efficacité de nouvelles thérapeutiques anti-CMVH. Les conséquences de l'infection et la sensibilité aux antiviraux peuvent également varier selon les types cellulaires et d'un type cellulaire à l'autre au sein d'un tissu. La disponibilité au laboratoire de nombreux types cellulaires et l'optimisation d'un modèle d'histoculture placentaire (Andouard, 2015; Morère et al., 2015) ainsi que son transfert *in vivo* sur souris humanisées (Morère, 2016) nous a permis de développer un protocole complet d'évaluation de nouvelles molécules.

### I. Optimisation de modèles d'infection pour le traitement de l'infection à CMVH

Le CMVH est capable d'infecter de multiples types cellulaires au sein des tissus, avec des conséquences variables sur les cellules et leur microenvironnement. Le tropisme des souches définit les cellules cibles au sein d'un tissu. Ce tropisme est défini par la présence de deux complexes à sa surface que sont le complexe trimérique, composé des protéines gH/gL/gO, et le complexe pentamérique, composé des protéines gH/gL/UL128-131. Le complexe trimérique permet l'entrée du virus dans les fibroblastes alors que le complexe pentamérique permet en plus l'entrée du virus dans les cellules épithéliales et endothéliales (Gerna et al., 2019b). Nous avons donc choisi de travailler avec deux types cellulaires : des fibroblastes embryonnaires humains (FEH) et une lignée de cellules épithéliales de la rétine (ARPE-19). Ces cellules ont été infectées avec un panel de souches virales à tropisme soit fibroblastique soit endothélial/épithélial.

En premier lieu, nous avons constitué une collection d'isolats cliniques de CMVH issus de patients transplantés ou d'infection congénitale à CMVH. Ces souches étant tout d'abord mises en culture sur FEH par le CNR Herpesvirus lors de leur isolement en culture, nous avons évalué leur tropisme en vérifiant leur capacité à infecter les cellules épithéliales. Parmi les 10 souches virales isolées des urines de nouveau-nés atteints d'infection congénitale à CMVH, 3 souches n'étaient pas capables d'infecter les cellules épithéliales (**Tableau 7** : C4, C5, et C6, page 103). Les deux souches isolées de patients transplantés (**Tableau 7** : T1 et T2, page 103) n'ont également pas pu infecter les cellules épithéliales. Cette incapacité à infecter les ARPE-19 peut s'expliquer par le nombre de passages effectués en FEH (3 pour les deux souches) avant la mise en culture sur cellules épithéliales. Les passages successifs de souches de CMVH, sauvages ou de laboratoire, sur fibroblastes font perdre le tropisme épithélial de ces souches par induction de mutation dans les gènes codant le complexe pentamérique, rendant ce dernier non fonctionnel (Dargan et al., 2010). Même si cela n'a pas été démontré pour les souches de CMVH sauvages, il a été démontré que l'expression des glycocomplexes, définissant le tropisme d'une souche, varie entre les souches de laboratoire, comme cela été mis en évidence pour l'AD169, TB40 et TR et PH (Zhou et al., 2013). De plus, l'expression majoritaire du complexe pentamérique ou trimérique peut varier au sein d'une même souche (Li and Kamil, 2016).

Les essais antiviraux pouvant être effectués avec des inoculum constitués de cellules infectées, la préparation de stock de virions extracellulaires n'est pas une nécessité pour le modèle *in vitro* et seul le tropisme des souches pour les cellules étudiées intervient. Cependant, les virions extracellulaires sont indispensables pour infecter le modèle de culture *ex vivo* (Morère et al., 2015). Nous avons donc cherché à produire des stocks de virions extracellulaires à partir des souches de CMVH endothéliales, fibroblastiques ou des isolats cliniques. Ceci dans un but de pouvoir infecter les villosités placentaires par des souches à tropisme différent et avec une multiplicité d'infection reproductible. Malheureusement, après plusieurs passages en culture cellulaire (10 à 11 passages) sur FEH ou sur ARPE-19, aucun des isolats cliniques n'a produit de virions extracellulaires en

quantité suffisante. Les souches cliniques sont en effet le plus souvent associées aux cellules et produisent peu de virions extracellulaires en culture, à moins d'effectuer des passages extensifs en fibroblastes (Yamane et al., 1983). Pour ces raisons, nous avons utilisé pour les essais en placenta les souches virales TB40/E et VHL/E qui sont cultivées sur cellules épithéliales ou endothéliales afin de conserver leur tropisme pour ces types cellulaires, ainsi que la souche de laboratoire AD169.

Dans un second temps, nous avons optimisé le modèle *ex vivo* de culture et d'infection de villosités placentaires déjà existant au laboratoire (Andouard, 2015; Morère et al., 2015). Ce modèle repose sur la capacité de production de virions extracellulaires par les souches de CMVH, afin d'infecter les villosités flottantes situées sur une éponge (Figure 31, page 97). Nous avons choisi de travailler sur les villosités pour plusieurs raisons. D'une part à cause de sa structure, il s'agit d'un tissu facilement isolable et qui possède un maintien suffisant pour une histoculture, en témoignent les modèles *ex vivo* déjà existants (Amirhessami-Aghili et al., 1987; Gabrielli et al., 2001; Lopez et al., 2011). D'autre part, les trophoblastes, et donc les villosités, baignent dans le sang maternel et forment une barrière vis-à-vis de l'infection par des pathogènes (Coyne and Lazear, 2016; Knöfler et al., 2019). Lors de l'infection à CMVH, le virus doit passer cette barrière pour infecter le fœtus. L'inhibition de la réplication virale ou de l'infection par le CMVH dans ces tissus pourraient permettre de protéger le fœtus de séquelles liées au CMVH. De plus, l'infection seule du placenta par le CMVH est aussi à risque pour le fœtus, avec une possibilité de défaut de croissance (Pereira, 2018). La transmission du virus pouvant avoir lieu tout au long de la grossesse, nous avons évalué la capacité d'infection de nos souches dans des villosités flottantes de 1<sup>er</sup> et de 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse.

Les évolutions effectuées à partir du modèle de (Morère et al., 2015) avaient deux objectifs : 1) augmenter l'exposition des villosités à l'infection virale, et 2) éliminer le risque de réinfection à partir de la nappe cellulaire produisant les virions, afin que la charge virale mesurée soit celle du virus infectant le placenta. Enfin, ces modifications permettent aussi de limiter l'impact de la

mortalité des fibroblastes de la nappe cellulaire sur les résultats de cytotoxicité. Lors de l'infection des cellules et des villosités, les incubations sont donc de 7 jours et non de 5 jours. De plus, une fois les villosités infectées, ces dernières sont transférées dans une nouvelle plaque de culture sans fibroblastes. Par ailleurs, nous avons choisi de n'utiliser que des placentas de femme séronégative vis-à-vis du CMVH pour les essais d'efficacité des antiviraux afin de limiter les biais liés à un virus endogène. Les placentas issus de femmes séropositives ont été utilisés pour les essais de cytotoxicité comprenant un contrôle placenta sans antiviral afin de ne rapporter que les effets liés à la molécule étudiée.

L'infection pouvant survenir tout au long de la grossesse, nous avons comparé l'infection de villosités de 1<sup>er</sup> et de 3<sup>ème</sup> trimestre avec les souches de référence AD169, TB40/E, VHL/E. A partir de l'étude des cinétiques d'infection virale nous avons déterminé que J13 était la date d'infection maximale. En comparant les charges virales des souches à J13, la permissivité des villosités de 1<sup>er</sup> trimestre est supérieure à celle des villosités de 3<sup>ème</sup> trimestre ( $p < 0,05$  et  $p < 0,001$ ) (Figure 33, page 105). Toutefois, la structure des villosités évolue au cours de la grossesse. Pendant le 1<sup>er</sup> trimestre, les villosités se forment à partir du trophoctoderme et se différencient en cytotrophoblastes entourés par une couche de syncytiotrophoblastes. Au cœur des villosités se trouvent des fibroblastes ainsi que les cellules endothéliales formant les capillaires sanguins. En fin de grossesse les capillaires sanguins sont en contact étroit avec les syncytiotrophoblastes suite à l'amenuisement de la couche de cytotrophoblastes (Gude et al., 2004; Knöfler et al., 2019). Les syncytiotrophoblastes sont peu permissifs au CMVH et ont un rôle protecteur vis-à-vis des pathogènes (Arora et al., 2017). Le plus faible taux d'infection mise en évidence dans les villosités de 3<sup>ème</sup> trimestre peut donc être dû à la moins bonne permissivité des cellules composant les villosités de 3<sup>ème</sup> trimestre ainsi qu'à la perte de certaines cellules permissives au CMVH. Cette variation de charge virale a aussi été observée par H. Lopez (Lopez et al., 2011) avec l'utilisation de la souche VHL/E dans un modèle d'infection similaire. De plus, le dosage des  $\beta$ -hCG présentes dans le surnageant des villosités infectées ne révèle pas de différence de taux de  $\beta$ -hCG par

comparaison avec les villosités non infectées (Figure 33.D, page 105). La faible charge virale dans les villosités de 3<sup>ème</sup> trimestre n'est donc pas le résultat d'une cytotoxicité présente dans ces villosités. Cependant, une différence dans les taux de  $\beta$ -hCG sécrétés entre le 1<sup>er</sup> et le 3<sup>ème</sup> trimestre est visible. Cette différence de concentration, observée aussi dans l'étude de H. Lopez (Lopez et al., 2011) est physiologique, le taux de  $\beta$ -hCG augmentant pendant la grossesse pour atteindre un pic à environ 9 semaines de grossesse puis diminuant durant le reste de la grossesse (Korevaar et al., 2015).

La permissivité des placentas peut aussi varier d'une femme à l'autre mais aussi en fonction du terme de la grossesse, raison pour laquelle tous les essais ont été réalisés en triplicats. L'importance de ces variations a été démontrée par l'étude de Gisela Enders (Enders et al., 2011) qui a montré des variations de charge virale en fonction du terme en semaine d'aménorrhée avec les placentas de 1<sup>er</sup> trimestre. Dans l'objectif d'optimiser le modèle *ex vivo* pour l'évaluation de nouvelles molécules, il est préférable d'avoir un taux d'infection peu variable, pour éviter les biais de mesure de l'efficacité de la molécule, même si cette absence de variabilité n'est pas le reflet d'une infection *in vivo*. L'infection à CMVH en début de grossesse ayant des conséquences plus graves qu'au terme de la grossesse, il est aussi plus pertinent d'évaluer le potentiel de composés à ce moment de la grossesse. C'est pourquoi nous avons choisi de ne conserver que le modèle d'infection des villosités de 1<sup>er</sup> trimestre pour notre modèle *ex vivo*.

Cependant, ce modèle a encore besoin d'optimisation pour pouvoir infecter les villosités avec des souches sauvages de CMVH. L'incapacité de ces souches à produire des virions extracellulaires pourrait être compensée par une mise en contact direct des villosités avec la couche de fibroblastes infectés. Ces essais ont été effectués au sein du laboratoire et montrent une plus faible viabilité des villosités sans l'éponge comme soutien (Morère, 2016). Même si l'utilisation de souches de laboratoires pour l'étude de l'efficacité de nouveaux composés est classique, il faudrait étudier leur impact sur des isolats, qui pourraient d'avantage refléter le comportement des souches en clinique. L'intérêt de notre modèle est également de mimer la transmission du virus *in utero* car

les villosités flottantes baignent dans le sang maternel et ne sont pas en contact direct avec les tissus maternels infectés. Notre modèle possède aussi des lacunes. En effet, nous nous sommes restreints à une infection des villosités par des virions extracellulaires. Ce modèle n'inclut pas les autres acteurs qui jouent un rôle dans la transmission du virus de la mère au fœtus, telles que les IgG maternelles qui pourraient permettre le transport des particules virales au travers de la couche de syncytiotrophoblastes (Maidji et al., 2006). Ce modèle est aussi complémentaire des modèles de culture de décidue. En effet, dans chacun des deux cas, nous n'étudions qu'une partie du placenta qui est composé de cellules aux propriétés différentes (Itell et al., 2017a; Knöfler et al., 2019; Manaster and Mandelboim, 2010). Toutefois, la culture de décidue développée par (Weisblum et al., 2011) ne se limite qu'à une faible épaisseur de tissus (250 µm) mais a pu démontrer l'efficacité de plusieurs antiviraux. De plus, pour les essais antiviraux, la molécule est directement mise en contact avec les villosités, ou la décidue, et ne transite pas au travers d'un organisme où sa biodisponibilité serait mise à l'épreuve.

Les études *in vitro* et *ex vivo* ne sont donc pas suffisantes pour évaluer le potentiel d'une nouvelle molécule. Les modèles *in vivo* sur l'animal sont nécessaires pour analyser l'efficacité et la biodisponibilité d'un antiviral. Dans le contexte de l'infection congénitale à CMV, le cobaye est un modèle animal de choix car le CMV du cobaye (GPCMV) est capable de traverser le placenta et ce dernier présente une structure similaire au placenta humain (Leiser and Kaufmann, 1994). De plus, les lésions retrouvées chez les cobayes nouveau-nés atteints d'infection congénitale sont similaires à celles retrouvées chez l'homme (Schleiss and McVoy, 2010). Cependant, le GPCMV n'est pas sensible à tous les anti-CMV ce qui limite l'intérêt du modèle. C'est pourquoi nous avons poursuivi l'optimisation du modèle *in vivo* de souris humanisée développé au sein de l'unité UMR 1092.

Les premiers modèles ont été développés par l'équipe de Kern (Kern et al., 2001), en utilisant une greffe microchirurgicale sous la capsule du rein. Au sein de l'équipe, il avait été testé un modèle de greffe sous les muscles dorsaux, mais nécessitant plusieurs étapes chirurgicales, qui sont donc plus à risque d'engendrer des douleurs chez la souris, et rendant la récupération de l'implant plus

complexe (Morère, 2016). Le modèle de greffe sous-cutanée n'était pas encore validé. Nous avons donc souhaité revenir sur ce modèle de greffe sous-cutanée permettant une accessibilité des implants. En effet, les gestes chirurgicaux sont plus faciles et plus rapides à réaliser puisqu'il ne s'agit que d'une simple incision cutanée. La greffe sous cutanée de kératinocytes infectés, en gel mousse (gelfoam) avait été développée pour l'étude du cidofovir (Bravo et al., 2007) mais aucun implant tissulaire n'avait été greffé dans cette localisation. Par la suite, des fibroblastes infectés par le CMVH ont été greffés en sous-cutané (Lischka et al., 2010) mais aucun implant placentaire.

La validation indirecte de la vascularisation de l'implant a été effectuée par administration *per os* de L-norleucine. Cette méthode permet de valider l'accessibilité des tissus greffés par les molécules injectées. Notre modèle valide donc la biodisponibilité des molécules dans l'implant avec une détection de l'acide aminé de synthèse dans l'implant entre J7 et J14 post greffe. La chute du taux de L-norleucine à J21 post-greffe suggère une dégradation des villosités. Ceci a été confirmé macroscopiquement lors de la récupération de l'implant. La villosité présente un aspect diffus et plus petite qu'au moment de la greffe. La viabilité des implants n'a pas pu être évaluée ici. Cependant, les essais *ex vivo* démontrent une viabilité des villosités flottantes pendant au moins 20 jours (7 jours d'infection plus 13 jours de traitement (Figure 31, page 97)). La viabilité des implants sous-cutanés avait été évaluée précédemment par mise en évidence de la prolifération cellulaire après marquage de la protéine Ki67 exprimée lors des phases de prolifération du cycle cellulaire (Morère, 2016). Un contrôle direct de la mise en place de la vascularisation de l'implant par cette méthode permettrait de valider complètement le modèle. Il serait d'ailleurs pertinent d'évaluer la viabilité des implants pour chaque expérimentation. Des essais préalables d'imagerie par échographie ont été tentés mais sans succès car les vaisseaux sont trop petits pour être visibles. Depuis le début de la mise en place de ce modèle murin, de nouvelles techniques d'imagerie ont été développées, et permettraient de visualiser la mise en place de la vascularisation grâce à un appareil d'imagerie intra-vitale par bioluminescence à l'aide d'un

marqueur luciférase par exemple. Cependant cet appareil est situé en animalerie dite conventionnelle et non en animalerie EOPS.

Nous avons évalué à *minima* la cinétique d'infection de la souche TB40/E dans les implants et observé une charge virale similaire aux essais *ex vivo*. Le taux d'infection a été mesuré à J7 et J14, jours où la vascularisation est effective. L'objectif de ce modèle étant l'évaluation de nouveaux antiviraux, ces essais nous ont permis de définir une fenêtre de traitement et d'analyse de l'efficacité de nouvelles molécules. En effet, il est inutile de commencer à traiter si la molécule ne peut arriver au greffon. L'administration d'antiviraux en vue de traiter l'infection à CMVH du greffon pourrait donc débuter à J4. En effet, même si le taux de norleucine détectée dans le greffon n'atteint un pic qu'à J14 post-greffe, un début de vascularisation commence à se mettre en place entre J4 et J7. Il est donc préférable de commencer l'administration des molécules antivirales dès J4, sans indications plus précises du début de mise en place de la vascularisation. De plus, les cinétiques virales *ex vivo* montrent que la charge virale augmente après J4 post-infection (Figure 33, page 105).

Si l'on se reporte à la cinétique virale du CMVH en clinique, la durée moyenne de la virémie est autour de 23 jours lors d'une infection primaire, pour les patient transplantés d'organes solides et sous traitement préemptif (Martín-Gandul et al., 2014). Cependant, la charge virale du CMVH doit diminuer dans les 15 jours suivant l'initiation du traitement avant que l'infection à CMVH ne soit considérée comme réfractaire ou résistante (Chemaly et al., 2019). Notre fenêtre de traitement entre J4 et J14 post-infection est donc incluse dans ces délais.

Ce modèle a déjà été éprouvé pour évaluer l'activité antivirale du cidofovir. Avec une posologie de 25 mg/kg en IP tous les deux jours, le cidofovir est capable de réduire de 120 fois la charge virale de l'AD169 dans l'implant (Morère, 2016). Afin de valider complètement le modèle, il serait nécessaire de renouveler les expériences de cinétiques virales et d'efficacité car ces essais n'ont pu être effectués qu'une seule fois et sur un seul placenta. Les prochaines étapes sont donc des essais antiviraux avec le cidofovir mais sur la souche TB40/E. La perspective de ce modèle étant



l'évaluation de nouveaux composés tels que ceux évalués dans ce travail. Des essais avec le ganciclovir sont aussi envisageables aux posologies utilisées chez l'homme soit 5 mg/kg toutes les 12 heures (Kotton et al., 2018) ou encore avec le letermovir, nouvel anti-CMVH dont la faible toxicité laisse envisager l'usage chez la femme enceinte. De plus, ce modèle pourrait s'étendre à d'autres virus ayant une étroite spécificité d'hôte tel que le VZV par exemple.

## **II. Analyse du potentiel de nouveaux traitements antiviraux**

Les traitements conventionnels de l'infection à CMVH ont tous la même cible thérapeutique, la polymérase virale pUL54. Ces antiviraux, inhibent la synthèse d'ADN viral soit par compétition avec les nucléosides cellulaires comme le ganciclovir et le cidofovir, soit en se fixant sur le site de clivage du pyrophosphate comme le foscarnet (Gerna et al., 2019a). Les résistances peuvent donc être croisées entre plusieurs de ces molécules (Chou et al., 2016; Lurain and Chou, 2010). De plus, ces molécules à spectre large peuvent avoir des effets toxiques hématologiques ou rénaux à plus ou moins long terme et sont proscrits chez la femme enceinte.

L'artésunate, molécule à activité anti-palustre possédant une activité anti-CMVH et une faible toxicité, est administré à la femme enceinte à partir de la fin du premier trimestre de grossesse pour traiter les accès palustres graves avec une toxicité maximale entre 3 et 9 semaines de grossesse (HCSP, 2013; National Center for Biotechnology and Usa, 2015; Raffetin et al., 2018). La demi-vie courte de l'artésunate (entre 0,5 heure et 1,5 heures) est un handicap pour son utilisation anti-CMVH, malgré quelques succès en transplantation (Germi et al., 2014; Morris et al., 2011). A ce jour, aucune résistance virologique n'a été décrite pour l'artésunate cependant des résistances cliniques sont décrites, dont l'origine n'est pas élucidée.

Nous nous sommes donc intéressés au TF27, un dérivé trimérique synthétique de l'artésunate. Cette molécule a été synthétisée dans le but de servir de modèle à de futurs développement de thérapeutiques anti-CMVH moins toxiques et plus stables. L'efficacité de TF27 a été démontrée initialement contre la souche AD169-GFP en fibroblastes (Hutterer et al., 2015).

Nous avons complété ces données en étudiant l'efficacité de TF27 sur quatre souches virales, la souche AD169 en référence, les deux souches à tropisme endothélial VHL/E et TB40/E ainsi qu'un isolat clinique S\* issu d'urine de nouveau-né. Ces essais ont été effectués dans divers types cellulaires en plus de l'évaluation de la cytotoxicité de TF27 et en comparaison avec l'artésunate. Tel que décrit précédemment, TF27 possède une EC<sub>50</sub> de l'ordre du nanomolaire (0,011 ±0,002 μM pour la souche AD169 et 0,04 ±0.01 μM pour l'AD169-GFP) (Hutterer et al., 2015). La différence observée entre les deux valeurs d'EC<sub>50</sub> pourrait être expliquée par la méthode de quantification de l'infection. En effet, nous comptons le nombre de foyers infectés par puits, alors que dans les premiers essais sur TF27, la mesure du taux d'infection se fait par quantification de la GFP totale après lyse cellulaire. Toutefois, nous confirmons la forte efficacité *in vitro* du trimère contre les souches à tropisme fibroblastique ou épithélial, dans les cellules épithéliales et dans les fibroblastes, et à des concentrations efficaces 100 fois inférieures à celles de l'artésunate (**Table 1** de l'article).

La cytotoxicité de TF27, et de l'artésunate, a été évaluée dans plusieurs types cellulaires, en fibroblastes FEH, en cellules épithéliales ARPE-19 et en cellules endothéliales HUVEC, sur cellules en croissance ou confluentes. Les CC<sub>50</sub> et CC<sub>90</sub> n'ont pu être atteintes. Cependant, TF27 n'a qu'un faible impact sur la viabilité cellulaire aux concentrations testées, avec un pourcentage maximal de mort cellulaire de 11,84 ±11,90% (**Table 2** de l'article). Ceci confirme, dans différents types cellulaires, les données montrant l'absence d'impact de TF27 sur la mort cellulaire, testé jusqu'à une concentration de 3,3 μM (Hutterer et al., 2015). Ces observations nous permettent de calculer un index thérapeutique minimal (IT) ([CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>]) qui est au moins de 297 pour l'AD169 (IT, [3.3μM/0.011μM]). TF27 cible la voie NF-κB en inhibant RelA/p60 (Hutterer et al., 2015). Lors de la mise en évidence du rôle du facteur NF-κB dans l'activation du promoteur MIEP du CMVH, il a été démontré que l'inhibition de cette voie n'influe pas sur la viabilité cellulaire (DeMeritt et al., 2004, 2006). L'absence d'impact sur les cellules en croissance est également un atout important pour le développement de traitement envisagé chez la femme enceinte.

TF27 étant efficace et peu toxique *in vitro*, nous avons souhaité évaluer son potentiel dans notre modèle *ex vivo* de villosités flottantes. TF27 et l'artésunate sont capables de diminuer fortement la charge virale dans les villosités de 1<sup>er</sup> trimestre infectées par l'AD169, VHL/E ou TB40/E. TF27 est donc efficace dans ce modèle d'infection et n'impacte pas la viabilité des explants (**Figures 3 et 4** de l'article). De plus, l' $EC_{50}$  de TF27 est au moins 100 fois inférieure à celle de l'artésunate (TF27 :  $EC_{50} = 0,019 \pm 0,002 \mu M$  ; ART :  $EC_{50} = 6,49 \pm 1,17 \mu M$  pour VHL/E) tel que démontré *in vitro*. Nous n'avons pu estimer l'efficacité de TF27 *ex vivo* contre la souche S\* du fait de son incapacité à produire des virions extracellulaires. Les essais avec TF27 et l'artésunate nous ont aussi permis de confirmer que les villosités de 3<sup>ème</sup> trimestre ne sont pas un modèle d'étude satisfaisant pour l'évaluation de molécules antivirales. En effet, la charge virale dans les villosités de 3<sup>ème</sup> trimestre ne décroît pas avec l'artésunate ou TF27 (**Figure 3** de l'article).

Ces essais ont permis de constater qu'une molécule peut être efficace contre le CMVH de façon indirecte. En effet, TF27, comme l'artésunate ne cible pas directement le CMVH mais la voie NF- $\kappa$ B (Hutterer et al., 2015). TF27 présente des avantages à savoir une efficacité à plus faible dose que l'artésunate, une meilleure stabilité (il n'est pas nécessaire de renouveler la molécule tous les deux jours dans le milieu de culture) et peu d'effet cytotoxique. TF27 est aussi efficace contre le MCMV *in vivo* (Sonntag et al., 2019), et les essais chez la souris ont permis d'éclairer la pharmacocinétique du produit. Bien qu'active, TF27 n'a pu être détectée sous sa forme native dans le plasma des souris traitées, ce qui suggère une modification de la molécule *in vivo* lors de son transit jusqu'au site d'action (Sonntag et al., 2019). Il est donc nécessaire de définir la biodisponibilité de la molécule ainsi que sa pharmacocinétique. Déterminer les différents métabolites produits d'après la forme native de TF27 permettrait de doser ces molécules dans les différents compartiments (sang, urine) afin d'en déterminer la pharmacocinétique. Ces paramètres seraient utiles lors de l'évaluation *in vivo* sur le CMVH, dans notre modèle de souris humanisées. Du fait de sa cible cellulaire, TF27 pourrait avoir un effet synergique ou additif avec les antiviraux directs. Le valaciclovir proposé comme traitement de l'infection materno-fœtale a permis de



diminuer significativement le nombre d'enfants avec des manifestations cliniques par rapport aux séries historiques (Leruez-Ville et al., 2016). L'aciclovir est cependant 40 fois moins efficace sur le CMVH *in vitro* comparé au GCV (Tyms et al., 1981). La place de dérivés de l'artesunate en traitement associés à cette molécule pourrait être envisagée.

Nous avons poursuivi l'évaluation de nouveaux composés anti-CMVH en examinant l'efficacité d'un analogue du cidofovir : le composé LAVR-289. Cette molécule est également active sur l'herpès simplex, le VZV et l'adénovirus (données préliminaires non publiées). LAVR-289 est conçu pour obtenir une meilleure biodisponibilité et une moindre toxicité que le cidofovir ou même que le brincidofovir en augmentant son transfert transmembranaire. Certains analogues de base monophosphate (tenofovir) sont largement utilisés pour le traitement de l'infection à VIH et de l'hépatite B chez la femme enceinte et sans dommage pour le fœtus. Cependant, la cytotoxicité rénale du cidofovir, éliminé sous forme active par le rein, contre indique son usage pendant la grossesse.

Notre première évaluation montre que les  $EC_{50}$  de LAVR-289 sont au moins 30 fois inférieures à celles du cidofovir (LAVR-289 :  $EC_{50} = 35,35 \pm 0,2$  nM ; CDV :  $EC_{50} = 1,3 \pm 0,2$   $\mu$ M pour TB40) et ceci dans les différents types cellulaires. Les essais de cytotoxicité montrent également une très faible toxicité, avec un index thérapeutique défini sur la base des données *in vitro* variant entre 485 et 1310 suivant la souche virale et l'état des cellules (**Tableau 10**, page 151) et sont donc également très favorables y compris sur les cellules en croissance. Toutefois, aucune cytotoxicité *in vitro* n'a été relevée avec le cidofovir dont la toxicité *in vivo* est pourtant connue. Le cidofovir est toxique au niveau rénal et son transport dans la cellule, ou hors de la cellule, est médié par la présence de transporteurs d'anions (OAT). La présence ou non de ces récepteurs peut modifier le taux de cytotoxicité du cidofovir (Zhang et al., 2015). Le faible pourcentage de mort cellulaire induite par le cidofovir pourrait donc s'expliquer par l'absence de ses transporteurs sur les ARPE-19 et les cellules FEH. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en immunohistochimie et de tester les deux composés sur des lignées de cellules d'origine rénale.

L'évaluation *ex vivo* sur villosités de 1<sup>er</sup> trimestre infectées soit par la souche VHL/E soit par la souche TB40/E montre des valeurs d'EC<sub>50</sub> et d'EC<sub>90</sub> similaires à celles retrouvées *in vitro* en fibroblastes. La viabilité des villosités en début ou en fin d'expérimentation, n'est impactée ni par LAVR-289 ni par le cidofovir même aux plus fortes concentrations testées (10 µM) (**Figure 38**, page 153). Une concentration plus élevée de β-hCG est retrouvée à J13. La durée de demi-vie des β-hCG n'est pas suffisante pour expliquer cette tendance, cela pourrait être dû à l'augmentation de β-hCG physiologique jusqu'à 9 semaine de grossesse. Nous n'avons pas accès aux données concernant le terme lors de l'interruption de grossesse pour ce type de prélèvement afin de vérifier cette hypothèse.

De plus, LAVR-289 pourrait être testé en combinaison avec d'autres molécules de mécanisme d'action différent comme le letermovir qui cible une étape plus tardive dans le cycle de réplication du CMVH, ou le TF27. Il serait également intéressant de définir si LAVR-289 peut induire des résistances croisées avec les autres inhibiteurs de polymérase ou s'il est capable d'inhiber la réplication de souches résistantes aux molécules couramment utilisées en clinique.

Dans les perspectives d'études de LAVR-289, il est aussi prévu de tester cette molécule dans notre modèle *in vivo* murin pour mettre en évidence d'éventuels effets secondaires chez la souris. Si LAVR-289 répond à tous les critères de tolérance, son positionnement final serait le traitement potentiel de l'infection à CMVH chez la femme enceinte ou le traitement de deuxième intention lors d'échec thérapeutique pour les patients transplantés.

En parallèle des essais sur une molécule modèle à cible cellulaire et un nouvel inhibiteur direct en cours de développement, nous avons évalué l'efficacité du Cytotect® CP. Cette HIG à forte capacité neutralisante vis-à-vis du CMVH est étudiée dans une perspective de traitement ou de prévention de l'infection congénitale à CMVH. L'utilisation des HIG dans le traitement de l'infection congénitale à CMVH ayant été sujet à controverse (Chiaie et al., 2018; Revello et al., 2014), nous avons ici repris l'étude du Cytotect® CP dans nos modèles d'infection à CMVH. Les essais de neutralisation ont démontré la capacité de cette HIG à inhiber l'infection à CMVH en FEH et en

ARPE-19. Les valeurs de DN<sub>50</sub> retrouvées *in vitro*, sont en dessous des concentrations plasmatiques de 0,15 UI/mL attendues chez le patient. La cytotoxicité du Cytotect® CP a été évaluée *in vitro* et ne met en évidence aucune influence sur la mort cellulaire même pour la plus forte concentration de 20 UI/mL. Cette absence de cytotoxicité est aussi retrouvée *ex vivo* dans les villosités de 1<sup>er</sup> trimestre.

Le Cytotect® CP démontre donc une capacité neutralisante forte vis-vis de l'infection à CMVH *in vitro*. La suite de ce travail est de mieux comprendre le mécanisme d'action dans le modèle *ex vivo*. En effet le mécanisme par lequel les immunoglobulines naturelles agissent au niveau du placenta n'est pas encore élucidé. Les anticorps anti-CMVH pourraient favoriser l'activité des cellules NK lors d'une infection virale (Costa-Garcia et al., 2015). De plus, les IgG ont un rôle protecteur vis-à-vis de l'infection à CMVH au niveau de l'interface materno-fœtale (Itell et al., 2017a). Ces IgG sont capables de lier aux récepteurs FcRn exprimés à la surface des syncytiotrophoblastes. Toutefois, leur rôle est aussi à double tranchant. En effet, les particules virales liées à ces IgG pourraient utiliser la capacité des IgG à traverser les syncytiotrophoblastes pour infecter le fœtus (Maidji et al., 2006). Le Cytotect® CP est un traitement en recherche de positionnement vis-à-vis de l'infection congénitale. Il pourrait être utilisé soit en prévention de l'infection du fœtus lors de l'infection de la mère soit en traitement si l'infection fœtale a déjà eu lieu. Pour aider à répondre à cette problématique, nous souhaitons utiliser deux protocoles de traitement dans notre modèle *ex vivo*. En effet, comme les syncytiotrophoblastes permettent le transport des IgG vers le fœtus, le modèle d'infection des villosités est un modèle pertinent pour cette problématique. Le premier protocole envisagé reprendrait donc le protocole déjà mis en place pour les autres molécules avec un traitement après l'infection des villosités (**Figure 31**, page 97) et qui permettrait, sur coupes histologiques de documenter le mécanisme d'action intra-tissulaire du Cytotect® CP. Le second protocole serait un traitement par le Cytotect® CP au moment de l'infection des villosités pour essayer de prévenir l'infection de ces dernières. La

comparaison de ces deux méthodes pourrait permettre de mieux préciser comment peut se positionner le Cytotect® CP dans la prise en charge de l'infection congénitale à CMVH.

Le Cytotect® CP a déjà été évalué chez la femme enceinte en prophylaxie ou en traitement de l'infection à CMVH. En prophylaxie, il a démontré son utilité avec parfois l'apparition d'effets secondaires en comparaison avec le placebo (Revello et al., 2014). Cependant ces effets secondaires ne sont pas toujours retrouvés dans les autres études (Buxmann et al., 2012; Nigro et al., 2015). En traitement, le Cytotect® CP a aussi montré des résultats encourageants pour la poursuite de son utilisation (Visentin et al., 2012). Il pourrait de plus, se positionner en complément ou en attente de l'utilisation de vaccins efficaces qui ne sont pas à ce jour présents sur le marché.







## Conclusions

---

Pour conclure sur la première partie ce travail de thèse, même si nos modèles d'infection à CMVH ont été optimisés, d'autres améliorations sont encore nécessaires. La problématique de la culture d'isolats cliniques de CMVH n'est pas résolue et serait nécessaire pour la poursuite de l'évaluation de nouveaux antiviraux dans nos modèle *ex vivo* et *in vivo*.

Le modèle de culture *ex vivo* semble être optimisé pour répondre à la question posée. Ce modèle est loin de répondre à toutes les exigences pour l'évaluation de la survenue d'effets secondaires liés aux traitements mais permet une étude préclinique de la molécule avant les études *in vivo*. Ce modèle a donc aussi sa place dans la problématique actuelle de réduire l'expérimentation animale à son minimum nécessaire.

Les expérimentations *in vivo* demeurant malgré tout indispensables, nous avons amélioré et validé le modèle de greffe sous-cutanée chez la souris. Ces travaux de recherche ont donc conduit à la mise en place d'un modèle original d'implantation de tissus placentaires chez la souris SCID. Dans l'optique de la règle des 3R, nous avons ainsi restreint le modèle aux points pertinents à étudier à savoir J7 et J14 post-greffe. Pour les essais antiviraux, l'analyse des résultats pourrait sans doute être réalisée à une seule date post-greffe.

Les collaborations avec différentes équipes de recherche et un laboratoire pharmaceutique, nous ont permis de mettre en évidence la place que pourrait avoir de nouveaux antiviraux dans la prise en charge de l'infection à CMVH.

Le dérivé trimérique de l'artésunate, TF27, a montré des résultats prometteurs pour le développement de thérapies futures. En effet, tout en ne ciblant pas directement le CMVH, il s'avère être efficace et est bien toléré dans nos modèles *in vitro* et *ex vivo* d'infection à CMVH. Ces travaux, en collaboration avec l'équipe du Pr. Manfred Marschall, ont permis de valider nos modèles et ont fait l'objet d'une publication (Jacquet et al., 2019). TF27 possède l'avantage d'être plus stable que l'artésunate. De plus, cette molécule pourrait être utilisée en combinaison avec des

antiviraux ciblant directement le CMVH tels que le letermovir ou des inhibiteurs de l'activité de la polymérase pUL54.

La nécessité de développer de nouvelles thérapies anti-CMVH a conduit l'équipe CNRS ICOA UMR7311 d'Orléans, dirigée par le Pr. Luigi A. AGROFOGLIO, à synthétiser acyclonucléoside phosphonate dont l'activité anti-CMVH est basée sur celle du cidofovir. Les résultats préliminaires présentés dans ces travaux de thèse sont encourageants pour un développement plus poussé de LAVR-289 et devraient se poursuivre dans le cadre d'une demande d'ANR déposée en octobre 2019. En effet, cette molécule est efficace à des doses non toxiques contre plusieurs souches de CMVH et de façon reproductible. De plus, LAVR-289 est aussi efficace contre plusieurs virus dont le VZV et l'herpès simplex. Un antiviral à spectre large est un atout dans la prise en charge de l'infection chez le transplanté.

Enfin, le Cytotect® CP a aussi été évalué dans ce travail. Cette collaboration avec Biotest AG France, est dans un objectif de pouvoir définir le champs d'action de cette HIG. Face à l'indisponibilité de vaccins efficaces contre le CMVH, les HIG sont une option intéressante pour la prévention de l'infection à CMVH. Cependant, la poursuite de ces travaux est nécessaire pour déterminer comment le Cytotect® pourrait être utilisé au mieux.

Ces trois traitements potentiels s'inscrivent donc dans un objectif de traitement de l'infection congénitale à CMVH et pourraient être utilisés seuls, ou en combinaison avec des molécules ayant des cibles d'actions différentes afin de maximiser l'effet antiviral et de minimiser les risques d'apparition de mutations de résistance.

## **Conclusion générale**

Ces travaux de recherche ont aussi permis la mise en place de la plateforme **C-Lim** au sein de l'unité UMR 1092 qui vise à offrir un panel de modèles d'infection à CMVH pour l'évaluation de nouvelles thérapeutiques anti-CMVH.

Les collaborations mises en place durant ce travail ont permis de démontrer l'utilité de pouvoir évaluer de nouvelles thérapies antivirales sur différents modèles d'études. Ces études précliniques sont indispensables pour définir la place des nouveaux traitements dans la prise en charge de l'infection à CMVH. Au travers de *C-Lim*, nous pouvons donc déterminer l'efficacité ainsi que la toxicité de ces antiviraux dans des modèles *in vivo*, *ex vivo*, et *in vivo* d'infection à CMVH au sein d'une même structure. La perspective de cette plateforme est de pouvoir étendre ce savoir-faire à d'autres virus.





## Références bibliographiques

---

- Abel, K., Martinez, J., Yue, Y., Lacey, S.F., Wang, Z., Strelow, L., Dasgupta, A., Li, Z., Schmidt, K.A., Oxford, K.L., et al. (2011). Vaccine-induced control of viral shedding following rhesus cytomegalovirus challenge in rhesus macaques. *J. Virol.* *85*, 2878–2890.
- Adler, S.P., Lewis, N., Conlon, A., Christiansen, M.P., Al-Ibrahim, M., Rupp, R., Fu, T.-M., Bautista, O., Tang, H., Wang, D., et al. (2019). Phase 1 Clinical Trial of a Conditionally Replication-Defective Human Cytomegalovirus (CMV) Vaccine in CMV-Seronegative Subjects. *J. Infect. Dis.* *220*, 411–419.
- Alain, S., and Garrigue, I. (2019). Cytomégalovirus. In *Traité de Virologie Médicale*, (Paris: SFM), pp. 239–256.
- Alsuliman, T., Kitel, C., Dulery, R., Guillaume, T., Larosa, F., Cornillon, J., Labussière-Wallet, H., Médiavilla, C., Belaiche, S., Delage, J., et al. (2018). Cytotect®CP as salvage therapy in patients with CMV infection following allogeneic hematopoietic cell transplantation: a multicenter retrospective study. *Bone Marrow Transplant.* *53*, 1328–1335.
- Amirhessami-Aghili, N., Manalo, P., Hall, M.R., Tibbitts, F.D., Ort, C.A., and Afsari, A. (1987). Human cytomegalovirus infection of human placental explants in culture: Histologic and immunohistochemical studies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *156*, 1365–1374.
- Anders, D.G., Kerry, J.A., and Pari, G.S. (2007a). DNA synthesis and late viral gene expression. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), p.
- Anders, D.G., Kerry, J.A., and Pari, G.S. (2007b). DNA synthesis and late viral gene expression. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), p.
- Andouard, D. (2015). Impact de molécules antivirales contre l'infection à CytoMégaloVirus humain dans des modèles cellulaires et placentaires. Thèse de doctorat. Université de Limoges.
- Andrei, G., Topalis, D., De Schutter, T., and Snoeck, R. (2015). Insights into the mechanism of action of cidofovir and other acyclic nucleoside phosphonates against polyoma- and papillomaviruses and non-viral induced neoplasia. *Antiviral Res.* *114*, 21–46.
- Arora, N., Sadovsky, Y., Dermody, T.S., and Coyne, C.B. (2017). Microbial Vertical Transmission during Human Pregnancy. *Cell Host Microbe* *21*, 561–567.
- Azevedo, L.S., Pierrotti, L.C., Abdala, E., Costa, S.F., Strabelli, T.M.V., Campos, S.V., Ramos, J.F., Latif, A.Z.A., Litvinov, N., Maluf, N.Z., et al. (2015). Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Clin. Sao Paulo Braz.* *70*, 515–523.
- Baraniak, I., Kropff, B., McLean, G.R., Pichon, S., Piras-Douce, F., Milne, R.S.B., Smith, C., Mach, M., Griffiths, P.D., and Reeves, M.B. (2018). Epitope-Specific Humoral Responses to Human Cytomegalovirus Glycoprotein-B Vaccine With MF59: Anti-AD2 Levels Correlate With Protection From Viremia. *J. Infect. Dis.* *217*, 1907–1917.
- Bernstein, D.I., Munoz, F.M., Callahan, S.T., Rupp, R., Wootton, S.H., Edwards, K.M., Turley, C.B., Stanberry, L.R., Patel, S.M., Mcneal, M.M., et al. (2016). Safety and Efficacy of a

Cytomegalovirus Glycoprotein B (gB) Vaccine in Adolescent Girls: a Randomized Clinical Trial. *Vaccine* 34, 313–319.

Bonatti, H., Sifri, C.D., Larcher, C., Schneeberger, S., Kotton, C., and Geltner, C. (2017). Use of Cidofovir for Cytomegalovirus Disease Refractory to Ganciclovir in Solid Organ Recipients. *Surg. Infect.* 18, 128–136.

Boppana, S.B., Ross, S.A., Shimamura, M., Palmer, A.L., Ahmed, A., Michaels, M.G., Sánchez, P.J., Bernstein, D.I., Tolan, R.W., Novak, Z., et al. (2011). Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N. Engl. J. Med.* 364, 2111–2118.

Bravo, F.J., Cardin, R.D., and Bernstein, D.I. (2006). Effect of maternal treatment with cyclic HPMPG in the guinea pig model of congenital cytomegalovirus infection. *J. Infect. Dis.* 193, 591–597.

Bravo, F.J., Cardin, R.D., and Bernstein, D.I. (2007). A model of human cytomegalovirus infection in severe combined immunodeficient mice. *Antiviral Res.* 76, 104–110.

Britt, W.J. (2018). Maternal Immunity and the Natural History of Congenital Human Cytomegalovirus Infection. *Viruses* 10.

Britt, W.J., and Prichard, M.N. (2018). New therapies for human cytomegalovirus infections. *Antiviral Res.* 159, 153–174.

Brune, W., and Andoniou, C.E. (2017). Die Another Day: Inhibition of Cell Death Pathways by Cytomegalovirus. *Viruses* 9.

Burton, G.J., and Fowden, A.L. (2015). The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 370.

Buxmann, H., Stackelberg, O.M. v, Schlößer, R.L., Enders, G., Gonser, M., Meyer-Wittkopf, M., Hamprecht, K., and Enders, M. (2012). Use of cytomegalovirus hyperimmunoglobulin for prevention of congenital cytomegalovirus disease: a retrospective analysis. *J. Perinat. Med.* 40, 439–446.

Cannon, M.J., Schmid, D.S., and Hyde, T.B. (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev. Med. Virol.* 20, 202–213.

Cannon, M.J., Griffiths, P.D., Aston, V., and Rawlinson, W.D. (2014). Universal newborn screening for congenital CMV infection: what is the evidence of potential benefit? *Rev. Med. Virol.* 24, 291–307.

Cavicchioli, L., Zanetti, R., Ferrareso, S., Crossan, C., Barry, P.A., Boldrin, M., Vadori, M., Ferro, S., Calabrese, F., Scobie, L., et al. (2015). Expression of recipient cytomegalovirus in immunosuppressed and xenotransplanted *Macaca fascicularis* may be related to more severe gastrointestinal lesions. *Xenotransplantation* 22, 135–143.

Chang, W.L.W., Baumgarth, N., Yu, D., and Barry, P.A. (2004). Human cytomegalovirus-encoded interleukin-10 homolog inhibits maturation of dendritic cells and alters their functionality. *J. Virol.* 78, 8720–8731.

Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., Kouzarides, T., and Martignetti, J.A. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 154, 125–169.

Chemaly, R.F., Ullmann, A.J., Stoelben, S., Richard, M.P., Bornhäuser, M., Groth, C., Einsele, H., Silverman, M., Mullane, K.M., Brown, J., et al. (2014). Letermovir for cytomegalovirus prophylaxis in hematopoietic-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* *370*, 1781–1789.

Chemaly, R.F., Chou, S., Einsele, H., Griffiths, P., Avery, R., Razonable, R.R., Mullane, K.M., Kotton, C., Lundgren, J., Komatsu, T.E., et al. (2019). Definitions of Resistant and Refractory Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients for Use in Clinical Trials. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *68*, 1420–1426.

Cherrier, L., Nasar, A., Goodlet, K.J., Nailor, M.D., Tokman, S., and Chou, S. (2018). Emergence of letermovir resistance in a lung transplant recipient with ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *18*, 3060–3064.

Chiaie, L.D., Neuberger, P., Vochem, M., Lihs, A., Karck, U., and Enders, M. (2018). No evidence of obstetrical adverse events after hyperimmune globulin application for primary cytomegalovirus infection in pregnancy: experience from a single centre. *Arch. Gynecol. Obstet.*

Choi, K.Y., El-Hamdi, N.S., and McGregor, A. (2019). Inclusion of the Viral Pentamer Complex in a Vaccine Design Greatly Improves Protection against Congenital Cytomegalovirus in the Guinea Pig Model. *J. Virol.* *93*.

Chou, S. (2015a). Approach to Drug-Resistant Cytomegalovirus in Transplant Recipients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* *28*, 293–299.

Chou, S. (2015b). Rapid In Vitro Evolution of Human Cytomegalovirus UL56 Mutations That Confer Letermovir Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* *59*, 6588–6593.

Chou, S. (2017a). Comparison of Cytomegalovirus Terminase Gene Mutations Selected after Exposure to Three Distinct Inhibitor Compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* *61*.

Chou, S. (2017b). A third component of the human cytomegalovirus terminase complex is involved in letermovir resistance. *Antiviral Res.* *148*, 1–4.

Chou, S., Marousek, G., and Bowlin, T.L. (2012). Cyclopropavir Susceptibility of Cytomegalovirus DNA Polymerase Mutants Selected after Antiviral Drug Exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 197–201.

Chou, S., Ercolani, R.J., and Lanier, E.R. (2016). Novel Cytomegalovirus UL54 DNA Polymerase Gene Mutations Selected In Vitro That Confer Brincidofovir Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* *60*, 3845–3848.

Chou, S., Ercolani, R.J., and Vanarsdall, A.L. (2017). Differentiated Levels of Ganciclovir Resistance Conferred by Mutations at Codons 591 to 603 of the Cytomegalovirus UL97 Kinase Gene. *J. Clin. Microbiol.* *55*, 2098–2104.

Chou, S., Wu, J., Song, K., and Bo, T. (2019). Novel UL97 drug resistance mutations identified at baseline in a clinical trial of maribavir for resistant or refractory cytomegalovirus infection. *Antiviral Res.* *172*, 104616.

Cloarec, R., Bauer, S., Luche, H., Buhler, E., Pallesi-Pocachard, E., Salmi, M., Courtens, S., Massacrier, A., Grenot, P., Teissier, N., et al. (2016). Cytomegalovirus Infection of the Rat Developing Brain In Utero Prominently Targets Immune Cells and Promotes Early Microglial Activation. *PLoS One* *11*, e0160176.

Cloarec, R., Bauer, S., Teissier, N., Schaller, F., Luche, H., Courtens, S., Salmi, M., Pauly, V., Bois, E., Pallesi-Pocachard, E., et al. (2018). In Utero Administration of Drugs Targeting Microglia Improves the Neurodevelopmental Outcome Following Cytomegalovirus Infection of the Rat Fetal Brain. *Front. Cell. Neurosci.* *12*.

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

Compton, T., and Feire, A. (2007). Early events in human cytomegalovirus infection. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), p.

Coppock, G.M., and Blumberg, E. (2019). New treatments for cytomegalovirus in transplant patients. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* *28*, 587–592.

Costa-Garcia, M., Vera, A., Moraru, M., Vilches, C., López-Botet, M., and Muntasell, A. (2015). Antibody-mediated response of NKG2Cbright NK cells against human cytomegalovirus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *194*, 2715–2724.

Coyne, C.B., and Lazear, H.M. (2016). Zika virus - reigniting the TORCH. *Nat. Rev. Microbiol.* *14*, 707–715.

Crawford, L.B., Streblow, D.A., Hakki, M., Nelson, J.A., and Caposio, P. (2015). Humanized Mouse Models of Human Cytomegalovirus Infection. *Curr. Opin. Virol.* *13*, 86–92.

Crumpler, M.M., Choi, K.Y., McVoy, M.A., and Schleiss, M.R. (2009). A live guinea pig cytomegalovirus vaccine deleted of three putative immune evasion genes is highly attenuated but remains immunogenic in a vaccine/challenge model of congenital cytomegalovirus infection. *Vaccine* *27*, 4209–4218.

Dargan, D.J., Douglas, E., Cunningham, C., Jamieson, F., Stanton, R.J., Baluchova, K., McSharry, B.P., Tomasec, P., Emery, V.C., Percivalle, E., et al. (2010). Sequential mutations associated with adaptation of human cytomegalovirus to growth in cell culture. *J. Gen. Virol.* *91*, 1535–1546.

Davison, A.J. (2007). Overview of classification. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), p.

DeMeritt, I.B., Milford, L.E., and Yurochko, A.D. (2004). Activation of the NF-kappaB pathway in human cytomegalovirus-infected cells is necessary for efficient transactivation of the major immediate-early promoter. *J. Virol.* *78*, 4498–4507.

DeMeritt, I.B., Podduturi, J.P., Tilley, A.M., Nogalski, M.T., and Yurochko, A.D. (2006). Prolonged activation of NF-kappaB by human cytomegalovirus promotes efficient viral replication and late gene expression. *Virology* *346*, 15–31.

Dhillon, B. (1994). The management of cytomegalovirus retinitis in AIDS. *Br. J. Ophthalmol.* *78*, 66–69.

Dietrich, M.L., and Schieffelin, J.S. (2019). Congenital Cytomegalovirus Infection. *Ochsner J.* *19*, 123–130.



Dolan, A., Cunningham, C., Hector, R.D., Hassan-Walker, A.F., Lee, L., Addison, C., Dargan, D.J., McGeoch, D.J., Gatherer, D., Emery, V.C., et al. (2004). Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* *85*, 1301–1312.

Dollard, S.C., Grosse, S.D., and Ross, D.S. (2007). New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev. Med. Virol.* *17*, 355–363.

Dupont, L., and Reeves, M.B. (2016). Cytomegalovirus latency and reactivation: recent insights into an age old problem. *Rev. Med. Virol.* *26*, 75–89.

Efferth, T., Marschall, M., Wang, X., Huong, S.-M., Hauber, I., Olbrich, A., Kronschnabl, M., Stamminger, T., and Huang, E.-S. (2002). Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *80*, 233–242.

Efferth, T., Romero, M.R., Wolf, D.G., Stamminger, T., Marin, J.J.G., and Marschall, M. (2008). The antiviral activities of artemisinin and artesunate. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *47*, 804–811.

Eldar-Yedidia, Y., Hillel, M., Cohen, A., Bar-Meir, M., Freier-Dror, Y., and Schlesinger, Y. (2017). Association of toll-like receptors polymorphism and intrauterine transmission of cytomegalovirus. *PloS One* *12*, e0189921.

El-Haddad, D., El Chaer, F., Vanichanan, J., Shah, D.P., Ariza-Heredia, E.J., Mulanovich, V.E., Gulbis, A.M., Shpall, E.J., and Chemaly, R.F. (2016). Brincidofovir (CMX-001) for refractory and resistant CMV and HSV infections in immunocompromised cancer patients: A single-center experience. *Antiviral Res.* *134*, 58–62.

Enders, G., Daiminger, A., Bäder, U., Exler, S., and Enders, M. (2011). Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *52*, 244–246.

Fan, Q., Nelson, C.S., Bialas, K.M., Chiuppesi, F., Amos, J., Gurley, T.C., Marshall, D.J., Eudailey, J., Heimsath, H., Himes, J., et al. (2017). Plasmablast Response to Primary Rhesus Cytomegalovirus (CMV) Infection in a Monkey Model of Congenital CMV Transmission. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* *24*.

Fernández-Ruiz, M., Corrales, I., Arias, M., Campistol, J.M., Giménez, E., Crespo, J., López-Oliva, M.O., Beneyto, I., Martín-Moreno, P.L., Llamas-Fuente, F., et al. (2015). Association between individual and combined SNPs in genes related to innate immunity and incidence of CMV infection in seropositive kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *15*, 1323–1335.

Fernández-Ruiz, M., Silva, J.T., López-Medrano, F., Allende, L.M., San Juan, R., Cambra, F., Justo, I., Paz-Artal, E., Jiménez, C., and Aguado, J.M. (2016). Post-transplant monitoring of NK cell counts as a simple approach to predict the occurrence of opportunistic infection in liver transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* *18*, 552–565.

Fischer, L., Imrich, E., Sampaio, K.L., Hofmann, J., Jahn, G., Hamprecht, K., and Göhring, K. (2016). Identification of resistance-associated HCMV UL97- and UL54-mutations and a UL97-polymorphism with impact on phenotypic drug-resistance. *Antiviral Res.* *131*, 1–8.

Fisher, S., Genbacev, O., Maidji, E., and Pereira, L. (2000). Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis. *J. Virol.* *74*, 6808–6820.

Frietsch, J.J., Michel, D., Stamminger, T., Hunstig, F., Birndt, S., Schnetzke, U., Scholl, S., Hochhaus, A., and Hilgendorf, I. (2019). In Vivo Emergence of UL56 C325Y Cytomegalovirus Resistance to Letermovir in a Patient with Acute Myeloid Leukemia after Hematopoietic Cell Transplantation. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* *11*, e2019001.

Gabrielli, L., Losi, L., Varani, S., Lazzarotto, T., Eusebi, V., and Landini, M.P. (2001). Complete replication of human cytomegalovirus in explants of first trimester human placenta. *J. Med. Virol.* *64*, 499–504.

Gentry, B.G., Kamil, J.P., Coen, D.M., Zemlicka, J., and Drach, J.C. (2010). Stereoselective phosphorylation of cyclopropavir by pUL97 and competitive inhibition by maribavir. *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 3093–3098.

Georgiades, P., Ferguson-Smith, A.C., and Burton, G.J. (2002). Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* *23*, 3–19.

Germer, M., Herbener, P., and Schüttrumpf, J. (2016). Functional Properties of Human Cytomegalovirus Hyperimmunoglobulin and Standard Immunoglobulin Preparations. *Ann. Transplant.* *21*, 558–564.

Germi, R., Mariette, C., Alain, S., Lupo, J., Thiebaut, A., Brion, J.P., Epaulard, O., Saint Raymond, C., Malvezzi, P., and Morand, P. (2014). Success and failure of artesunate treatment in five transplant recipients with disease caused by drug-resistant cytomegalovirus. *Antiviral Res.* *101*, 57–61.

Gerna, G., Lilleri, D., and Baldanti, F. (2019a). An overview of letermovir: a cytomegalovirus prophylactic option. *Expert Opin. Pharmacother.* *20*, 1429–1438.

Gerna, G., Kabanova, A., and Lilleri, D. (2019b). Human Cytomegalovirus Cell Tropism and Host Cell Receptors. *Vaccines* *7*.

Gibson, W., Clopper, K.S., Britt, W.J., and Baxter, M.K. (1996). Human cytomegalovirus (HCMV) smallest capsid protein identified as product of short open reading frame located between HCMV UL48 and UL49. *J. Virol.* *70*, 5680–5683.

Gnann Jr., J.W. (2007). Antiviral therapy of varicella-zoster virus infections. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), p.

Goldner, T., Hewlett, G., Ettischer, N., Ruebsamen-Schaeff, H., Zimmermann, H., and Lischka, P. (2011). The novel anticytomegalovirus compound AIC246 (Letermovir) inhibits human cytomegalovirus replication through a specific antiviral mechanism that involves the viral terminase. *J. Virol.* *85*, 10884–10893.

Goodrum, F. (2016). Human Cytomegalovirus Latency: Approaching the Gordian Knot. *Annu. Rev. Virol.* *3*, 333–357.

Gosert, R., Rinaldo, C.H., Wernli, M., Major, E.O., and Hirsch, H.H. (2011). CMX001 (1-O-hexadecyloxypropyl-cidofovir) inhibits polyomavirus JC replication in human brain progenitor-derived astrocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 2129–2136.

Gretch, D.R., Kari, B., Rasmussen, L., Gehrz, R.C., and Stinski, M.F. (1988). Identification and characterization of three distinct families of glycoprotein complexes in the envelopes of human cytomegalovirus. *J. Virol.* *62*, 875–881.

Griffiths, P.D., Stanton, A., McCarrell, E., Smith, C., Osman, M., Harber, M., Davenport, A., Jones, G., Wheeler, D.C., O'Beirne, J., et al. (2011). Cytomegalovirus glycoprotein-B vaccine with MF59 adjuvant in transplant recipients: a phase 2 randomised placebo-controlled trial. *Lancet* *377*, 1256–1263.

Gude, N.M., Roberts, C.T., Kalionis, B., and King, R.G. (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thromb. Res.* *114*, 397–407.

Hahn, F., Fröhlich, T., Frank, T., Bertzbach, L.D., Kohrt, S., Kaufer, B.B., Stamminger, T., Tsogoeva, S.B., and Marschall, M. (2018). Artesunate-derived monomeric, dimeric and trimeric experimental drugs - Their unique mechanistic basis and pronounced antiherpesviral activity. *Antiviral Res.* *152*, 104–110.

Haller, T.J., Price, M.S., Lindsay, S.R., Hillas, E., Seipp, M., Firpo, M.A., and Park, A.H. (2019). Effects of ganciclovir treatment in a murine model of cytomegalovirus-induced hearing loss. *The Laryngoscope*.

Hantz, S., Garnier-Geoffroy, F., Mazon, M.-C., Garrigue, I., Merville, P., Mengelle, C., Rostaing, L., Saint Marcoux, F., Essig, M., Rerolle, J.-P., et al. (2010). Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J. Antimicrob. Chemother.* *65*, 2628–2640.

HCSP (2013). Paludisme grave chez l'adulte et chez l'enfant. Place de l'artésunate injectable (Paris: Haut Conseil de la Santé Publique).

HCSP (2018). La prévention de l'infection à cytomegalovirus chez la femme enceinte et chez le nouveau-né (Paris: Haut Conseil de la Santé Publique).

Ho, M. (2007). The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* *197*, 65–73.

Humar, A., Snyderman, D., and AST Infectious Diseases Community of Practice (2009). Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *9 Suppl 4*, S78-86.

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

Itell, H.L., Nelson, C.S., Martinez, D.R., and Permar, S.R. (2017a). Maternal immune correlates of protection against placental transmission of cytomegalovirus. *Placenta* *60*, S73–S79.

Itell, H.L., Kaur, A., Deere, J.D., Barry, P.A., and Permar, S.R. (2017b). Rhesus monkeys for a nonhuman primate model of cytomegalovirus infections. *Curr. Opin. Virol.* *25*, 126–133.

Jackson, S.E., Mason, G.M., and Wills, M.R. (2011). Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus Res.* *157*, 151–160.

Jacquemard, F., Yamamoto, M., Costa, J.-M., Romand, S., Jaqz-Aigrain, E., Dejean, A., Daffos, F., and Ville, Y. (2007). Maternal administration of valaciclovir in symptomatic intrauterine cytomegalovirus infection. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* *114*, 1113–1121.

Jacquet, C., Marschall, M., Andouard, D., El Hamel, C., Chianea, T., Tsogoeva, S.B., Hantz, S., and Alain, S. (2019). A highly potent trimeric derivative of artesunate shows promising treatment profiles in experimental models for congenital HCMV infection in vitro and ex vivo. *Antiviral Res.* 104700.

Jung, D., and Dorr, A. (1999). Single-dose pharmacokinetics of valganciclovir in HIV- and CMV-seropositive subjects. *J. Clin. Pharmacol.* 39, 800–804.

Kabanova, A., Marcandalli, J., Zhou, T., Bianchi, S., Baxa, U., Tsybovsky, Y., Lilleri, D., Silacci-Fregni, C., Foglierini, M., Fernandez-Rodriguez, B.M., et al. (2016). Platelet-derived growth factor- $\alpha$  receptor is the cellular receptor for human cytomegalovirus gHgLgO trimer. *Nat. Microbiol.* 1, 16082.

Kanai, K., Yamada, S., Yamamoto, Y., Fukui, Y., Kurane, I., and Inoue, N. (2011). Re-evaluation of the genome sequence of guinea pig cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 92, 1005–1020.

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

Kaur, A., Itell, H.L., Ehlinger, E.P., Varner, V., Gantt, S., and Permar, S.R. (2018). Natural history of postnatal rhesus cytomegalovirus shedding by dams and acquisition by infant rhesus monkeys. *PLoS One* 13, e0206330.

Kern, E.R., Rybak, R.J., Hartline, C.B., and Bidanset, D.J. (2001). Predictive efficacy of SCID-hu mouse models for treatment of human cytomegalovirus infections. *Antivir. Chem. Chemother.* 12 Suppl 1, 149–156.

Kervan, U., Kucuker, S.A., Kocabeyoglu, S.S., Unal, E.U., Ozatik, M.A., Sert, D.E., Kavasoglu, K., Tezer, A.Y., and Pac, M. (2016). Low-Dose Valacyclovir for Cytomegalovirus Infection Prophylaxis After a Heart Transplant. *Exp. Clin. Transplant. Off. J. Middle East Soc. Organ Transplant.* 14, 551–554.

Kharfan-Dabaja, M.A., Boeckh, M., Wilck, M.B., Langston, A.A., Chu, A.H., Wloch, M.K., Guterwill, D.F., Smith, L.R., Rolland, A.P., and Kenney, R.T. (2012). A novel therapeutic cytomegalovirus DNA vaccine in allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect. Dis.* 12, 290–299.

Kimberlin, D.W., Lin, C.-Y., Sánchez, P.J., Demmler, G.J., Dankner, W., Shelton, M., Jacobs, R.F., Vaudry, W., Pass, R.F., Kiell, J.M., et al. (2003). Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J. Pediatr.* 143, 16–25.

Kimberlin, D.W., Jester, P.M., Sánchez, P.J., Ahmed, A., Arav-Boger, R., Michaels, M.G., Ashouri, N., Englund, J.A., Estrada, B., Jacobs, R.F., et al. (2015). Valganciclovir for symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *N. Engl. J. Med.* 372, 933–943.

Knöfler, M., Haider, S., Saleh, L., Pollheimer, J., Gamage, T.K.J.B., and James, J. (2019). Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 76, 3479–3496.

Korevaar, T.I.M., Steegers, E.A.P., de Rijke, Y.B., Schalekamp-Timmermans, S., Visser, W.E., Hofman, A., Jaddoe, V.W.V., Tiemeier, H., Visser, T.J., Medici, M., et al. (2015). Reference

ranges and determinants of total hCG levels during pregnancy: the Generation R Study. *Eur. J. Epidemiol.* *30*, 1057–1066.

Kotton, C.N., Kumar, D., Caliendo, A.M., Asberg, A., Chou, S., Danziger-Isakov, L., Humar, A., and Transplantation Society International CMV Consensus Group (2013). Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* *96*, 333–360.

Kotton, C.N., Kumar, D., Caliendo, A.M., Huprikar, S., Chou, S., Danziger-Isakov, L., Humar, A., and The Transplantation Society International CMV Consensus Group (2018). The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation* *102*, 900–931.

Krishna, B.A., Wills, M.R., and Sinclair, J.H. Advances in the treatment of cytomegalovirus. *Br. Med. Bull.*

Kropff, B., and Mach, M. (1997). Identification of the gene coding for rhesus cytomegalovirus glycoprotein B and immunological analysis of the protein. *J. Gen. Virol.* *78* ( Pt 8), 1999–2007.

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

Krosky, P.M., Borysko, K.Z., Nassiri, M.R., Devivar, R.V., Ptak, R.G., Davis, M.G., Biron, K.K., Townsend, L.B., and Drach, J.C. (2002). Phosphorylation of beta-D-ribosylbenzimidazoles is not required for activity against human cytomegalovirus. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 478–486.

Lanier, R., Trost, L., Tippin, T., Lampert, B., Robertson, A., Foster, S., Rose, M., Painter, W., O'Mahony, R., Almond, M., et al. (2010). Development of CMX001 for the Treatment of Poxvirus Infections. *Viruses* *2*, 2740–2762.

Leiser, R., and Kaufmann, P. (1994). Placental structure: in a comparative aspect. *Exp. Clin. Endocrinol.* *102*, 122–134.

Leruez-Ville, M., and Ville, Y. (2017). Fetal cytomegalovirus infection. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* *38*, 97–107.

Leruez-Ville, M., Ghout, I., Bussi eres, L., Stirnemann, J., Magny, J.-F., Couderc, S., Salomon, L.J., Guilleminot, T., Aegerter, P., Benoist, G., et al. (2016). In utero treatment of congenital cytomegalovirus infection with valacyclovir in a multicenter, open-label, phase II study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *215*, 462.e1-462.e10.

Li, G., and Kamil, J.P. (2016). Viral Regulation of Cell Tropism in Human Cytomegalovirus. *J. Virol.* *90*, 626–629.

Ligat, G., Casal, R., Hantz, S., and Alain, S. (2018). The human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target: a close-up view. *FEMS Microbiol. Rev.* *42*, 137–145.

Limaye, A.P., Kirby, K.A., Rubenfeld, G.D., Leisenring, W.M., Bulger, E.M., Neff, M.J., Gibran, N.S., Huang, M.-L., Santo Hayes, T.K., Corey, L., et al. (2008). Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA* *300*, 413–422.

Lin, A., Maloy, M., Su, Y., Bhatt, V., DeRespiris, L., Griffin, M., Lau, C., Proli, A., Barker, J., Shaffer, B., et al. (2019). Letermovir for primary and secondary cytomegalovirus prevention in

allogeneic hematopoietic cell transplant recipients: real world experience. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* e13187.

Lischka, P., Hewlett, G., Wunberg, T., Baumeister, J., Paulsen, D., Goldner, T., Ruebsamen-Schaeff, H., and Zimmermann, H. (2010). In Vitro and In Vivo Activities of the Novel Anticytomegalovirus Compound AIC246. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 1290–1297.

Liu, F., and Zhou, Z.H. (2007). Comparative virion structures of human herpesviruses. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), p.

Ljungman, P., Boeckh, M., Hirsch, H.H., Josephson, F., Lundgren, J., Nichols, G., Piskis, A., Razonable, R.R., Miller, V., Griffiths, P.D., et al. (2017). Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Patients for Use in Clinical Trials. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 64, 87–91.

Loh, H.-S., Mohd-Lila, M.-A., Abdul-Rahman, S.-O., and Kiew, L.-J. (2006). Pathogenesis and vertical transmission of a transplacental rat cytomegalovirus. *Viol. J.* 3, 42.

Lopez, H., Benard, M., Saint-Aubert, E., Baron, M., Martin, H., Al Saati, T., Plantavid, M., Duga-Neulat, I., Berrebi, A., Cristini, C., et al. (2011). Novel model of placental tissue explants infected by cytomegalovirus reveals different permissiveness in early and term placentae and inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity. *Placenta* 32, 522–530.

Lowance, D., Neumayer, H.H., Legendre, C.M., Squifflet, J.P., Kovarik, J., Brennan, P.J., Norman, D., Mendez, R., Keating, M.R., Coggon, G.L., et al. (1999). Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. International Valacyclovir Cytomegalovirus Prophylaxis Transplantation Study Group. *N. Engl. J. Med.* 340, 1462–1470.

Lucia, H.L., Griffith, B.P., and Hsiung, G.D. (1984). Effect of acyclovir and phosphonoformate on cytomegalovirus infection in guinea pigs. *Intervirology* 21, 141–149.

Luisi, K., Sharma, M., and Yu, D. (2017). Development of a vaccine against cytomegalovirus infection and disease. *Curr. Opin. Virol.* 23, 23–29.

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

Maertens, J., Cordonnier, C., Jaksch, P., Poiré, X., Uknis, M., Wu, J., Wijatyk, A., Saliba, F., Witzke, O., and Villano, S. (2019). Maribavir for Preemptive Treatment of Cytomegalovirus Reactivation. *N. Engl. J. Med.* 381, 1136–1147.

Maidji, E., McDonagh, S., Genbacev, O., Tabata, T., and Pereira, L. (2006). Maternal antibodies enhance or prevent cytomegalovirus infection in the placenta by neonatal Fc receptor-mediated transcytosis. *Am. J. Pathol.* 168, 1210–1226.

Maidji, E., Genbacev, O., Chang, H.-T., and Pereira, L. (2007). Developmental regulation of human cytomegalovirus receptors in cytotrophoblasts correlates with distinct replication sites in the placenta. *J. Virol.* 81, 4701–4712.

Malvezzi, P., Jouve, T., and Rostaing, L. (2016). Use of Everolimus-based Immunosuppression to Decrease Cytomegalovirus Infection After Kidney Transplant. *Exp. Clin. Transplant. Off. J. Middle East Soc. Organ Transplant.* 14, 361–366.

Manaster, I., and Mandelboim, O. (2010). REVIEW ARTICLE: The Unique Properties of Uterine NK Cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* *63*, 434–444.

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

Marschall, M., Muller, Y.A., Diewald, B., Sticht, H., and Milbradt, J. (2017). The human cytomegalovirus nuclear egress complex unites multiple functions: Recruitment of effectors, nuclear envelope rearrangement, and docking to nuclear capsids. *Rev. Med. Virol.* *27*.

Martinez-Martin, N., Marcandalli, J., Huang, C.S., Arthur, C.P., Perotti, M., Foglierini, M., Ho, H., Dosey, A.M., Shriver, S., Payandeh, J., et al. (2018). An Unbiased Screen for Human Cytomegalovirus Identifies Neuropilin-2 as a Central Viral Receptor. *Cell* *174*, 1158-1171.e19.

Martín-Gandul, C., Pérez-Romero, P., Blanco-Lobo, P., Benmarzouk-Hidalgo, O.J., Sánchez, M., Gentil, M.A., Bernal, C., Sobrino, J.M., Rodríguez-Hernández, M.J., Cordero, E., et al. (2014). Viral load, CMV-specific T-cell immune response and cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients at higher risk for cytomegalovirus infection during preemptive therapy. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* *27*, 1060–1068.

Marty, F.M., and Boeckh, M. (2011). Maribavir and human cytomegalovirus—what happened in the clinical trials and why might the drug have failed? *Curr. Opin. Virol.* *1*, 555–562.

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

Marty, F.M., Winston, D.J., Rowley, S.D., Vance, E., Papanicolaou, G.A., Mullane, K.M., Brundage, T.M., Robertson, A.T., Godkin, S., Momméja-Marin, H., et al. (2013). CMX001 to prevent cytomegalovirus disease in hematopoietic-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* *369*, 1227–1236.

Marty, F.M., Ljungman, P., Chemaly, R.F., Maertens, J., Dadwal, S.S., Duarte, R.F., Haider, S., Ullmann, A.J., Katayama, Y., Brown, J., et al. (2017). Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* *377*, 2433–2444.

Marty, F.M., Winston, D.J., Chemaly, R.F., Mullane, K.M., Shore, T.B., Papanicolaou, G.A., Chittick, G., Brundage, T.M., Wilson, C., Morrison, M.E., et al. (2019). A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 3 Trial of Oral Brincidofovir for Cytomegalovirus Prophylaxis in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *25*, 369–381.

Mathers, C., Schafer, X., Martínez-Sobrido, L., and Munger, J. (2014). The Human Cytomegalovirus UL26 Protein Antagonizes NF- $\kappa$ B Activation. *J. Virol.* *88*, 14289–14300.

Mazet-Wagner, A.A., Baclet, M.C., Loustaud-Ratti, V., Denis, F., and Alain, S. (2006). Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus total DNA and covalently closed circular DNA in peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B virus-infected patients. *J. Virol. Methods* *138*, 70–79.

McConkey, C.A., Delorme-Axford, E., Nickerson, C.A., Kim, K.S., Sadovsky, Y., Boyle, J.P., and Coyne, C.B. (2016). A three-dimensional culture system recapitulates placental syncytiotrophoblast development and microbial resistance. *Sci. Adv.* 2.

McCormick, A.L., and Mocarski Jr., E.S. (2007). Viral modulation of the host response to infection. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), p.

McGregor, A., and Choi, K.Y. (2011). Cytomegalovirus antivirals and development of improved animal models. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 7, 1245–1265.

McGregor, A., Choi, K.Y., Cui, X., McVoy, M.A., and Schleiss, M.R. (2008). Expression of the human cytomegalovirus UL97 gene in a chimeric guinea pig cytomegalovirus (GPCMV) results in viable virus with increased susceptibility to ganciclovir and maribavir. *Antiviral Res.* 78, 250–259.

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

Mengelle, C., Pasquier, C., Rostaing, L., Sandres-Sauné, K., Puel, J., Berges, L., Righi, L., Bouquies, C., and Izopet, J. (2003). Quantitation of human cytomegalovirus in recipients of solid organ transplants by real-time quantitative PCR and pp65 antigenemia. *J. Med. Virol.* 69, 225–231.

Messerle, M., Crnkovic, I., Hammerschmidt, W., Ziegler, H., and Koszinowski, U.H. (1997). Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 14759–14763.

Miescher, S.M., Huber, T.M., Kühne, M., Lieby, P., Snyderman, D.R., Vensak, J.L., and Berger, M. (2015). In vitro evaluation of cytomegalovirus-specific hyperimmune globulins vs. standard intravenous immunoglobulins. *Vox Sang.* 109, 71–78.

Mocarski, E.S., Bonyhadi, M., Salimi, S., McCune, J.M., and Kaneshima, H. (1993). Human cytomegalovirus in a SCID-hu mouse: thymic epithelial cells are prominent targets of viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 104–108.

Mocarski Jr., E.S. (2007a). Betaherpes viral genes and their functions. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), p.

Mocarski Jr., E.S. (2007b). Betaherpes viral genes and their functions. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), p.

Modlin, J.F., Arvin, A.M., Fast, P., Myers, M., Plotkin, S., and Rabinovich, R. (2004). Vaccine Development to Prevent Cytomegalovirus Disease: Report from the National Vaccine Advisory Committee. *Clin. Infect. Dis.* 39, 233–239.

Morère, L. (2016). Modèles d'étude de nouvelles molécules anti-CMV dans le placenta : thèse. Université de Limoges.



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

Morillo-Gutierrez, B., Waugh, S., Pickering, A., Flood, T., and Emonts, M. (2017). Emerging (val)ganciclovir resistance during treatment of congenital CMV infection: a case report and review of the literature. *BMC Pediatr.* 17, 181.

Morris, C.A., Duparc, S., Borghini-Fuhrer, I., Jung, D., Shin, C.-S., and Fleckenstein, L. (2011). Review of the clinical pharmacokinetics of artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin following intravenous, intramuscular, oral or rectal administration. *Malar. J.* 10, 263.

Nakamura, R., Rosa, C.L., Longmate, J., Drake, J., Slape, C., Zhou, Q., Lampa, M.G., O'Donnell, M., Cai, J.-L., Farol, L., et al. (2016). Viraemia, immunogenicity, and survival outcomes of cytomegalovirus chimeric epitope vaccine supplemented with PF03512676 (CMVPepVax) in allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: randomised phase 1b trial. *Lancet Haematol.* 3, e87–e98.

National Center for Biotechnology, ., and Usa, 20894 (2015). Treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. In *Guidelines for the Treatment of Malaria*. 3<sup>rd</sup> edition, (World Health Organization), p.

Nguyen, C.C., and Kamil, J.P. (2018). Pathogen at the Gates: Human Cytomegalovirus Entry and Cell Tropism. *Viruses* 10.

Nigro, G., Capretti, I., Manganello, A.-M., Best, A.M., and Adler, S.P. (2015). Primary maternal cytomegalovirus infections during pregnancy: association of CMV hyperimmune globulin with gestational age at birth and birth weight. *J. Matern.-Fetal Neonatal Med. Off. J. Eur. Assoc. Perinat. Med. Fed. Asia Ocean. Perinat. Soc. Int. Soc. Perinat. Obstet.* 28, 168–171.

Nixon, D.E., and McVoy, M.A. (2004). Dramatic effects of 2-bromo-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosyl benzimidazole riboside on the genome structure, packaging, and egress of guinea pig cytomegalovirus. *J. Virol.* 78, 1623–1635.

Ourahmane, A., Sauer, A., Nixon, D.E., Murphy, C., Mondello, M., Douglass Chiu, E., Siegmund, S., Wang, J.B., and McVoy, M.A. (2018). A Guinea pig cytomegalovirus resistant to the DNA maturation inhibitor BDCRB. *Antiviral Res.* 154, 44–50.

Painter, W., Robertson, A., Trost, L.C., Godkin, S., Lampert, B., and Painter, G. (2012). First pharmacokinetic and safety study in humans of the novel lipid antiviral conjugate CMX001, a broad-spectrum oral drug active against double-stranded DNA viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2726–2734.

Papanicolaou, G.A., Silveira, F.P., Langston, A.A., Pereira, M.R., Avery, R.K., Uknis, M., Wijatyk, A., Wu, J., Boeckh, M., Marty, F.M., et al. (2019). Maribavir for Refractory or Resistant Cytomegalovirus Infections in Hematopoietic-cell or Solid-organ Transplant Recipients: A Randomized, Dose-ranging, Double-blind, Phase 2 Study. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 68, 1255–1264.

Pass, R.F., Zhang, C., Evans, A., Simpson, T., Andrews, W., Huang, M.-L., Corey, L., Hill, J., Davis, E., Flanigan, C., et al. (2009). Vaccine Prevention of Maternal Cytomegalovirus Infection. *N. Engl. J. Med.* 360, 1191–1199.

Pasternak, B., and Hviid, A. (2010). Use of Acyclovir, Valacyclovir, and Famciclovir in the First Trimester of Pregnancy and the Risk of Birth Defects. *JAMA* 304, 859–866.

Pasternak, Y., Ziv, L., Attias, J., Amir, J., and Bilavsky, E. (2018). Valganciclovir Is Beneficial in Children with Congenital Cytomegalovirus and Isolated Hearing Loss. *J. Pediatr.* 199, 166–170.

Patel, M., Vlahava, V.-M., Forbes, S.K., Fielding, C.A., Stanton, R.J., and Wang, E.C.Y. (2018). HCMV-Encoded NK Modulators: Lessons From in vitro and in vivo Genetic Variation. *Front. Immunol.* 9, 2214.

Patro, A.R.K. (2019). Subversion of Immune Response by Human Cytomegalovirus. *Front. Immunol.* 10.

Pereira, L. (2018). Congenital Viral Infection: Traversing the Uterine-Placental Interface. *Annu. Rev. Virol.* 5, 273–299.

Pereira, L., Tabata, T., Petitt, M., and Fang-Hoover, J. (2017). Congenital cytomegalovirus infection undermines early development and functions of the human placenta. *Placenta* 59 *Suppl 1*, S8–S16.

Piñana, J.L., Perez-Pitarch, A., Guglieri-Lopez, B., Giménez, E., Hernandez-Boluda, J.C., Terol, M.J., Ferriols-Lisart, R., Solano, C., and Navarro, D. (2018). Sirolimus exposure and the occurrence of cytomegalovirus DNAemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 18, 2885–2894.

Plotkin, S.A., and Boppana, S.B. (2018). Vaccination against the human cytomegalovirus. *Vaccine*.

Plotkin, S.A., Furukawa, T., Zygraich, N., and Huygelen, C. (1975). Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination. *Infect. Immun.* 12, 521–527.

Prichard, M.N., Kern, E.R., Hartline, C.B., Lanier, E.R., and Quenelle, D.C. (2011). CMX001 potentiates the efficacy of acyclovir in herpes simplex virus infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4728–4734.

Raffetin, A., Bruneel, F., Roussel, C., Thellier, M., Buffet, P., Caumes, E., and Jauréguiberry, S. (2018). Use of artesunate in non-malarial indications. *Med. Mal. Infect.* 48, 238–249.

Rak, M.A., Buehler, J., Zeltzer, S., Reitsma, J., Molina, B., Terhune, S., and Goodrum, F. (2018). Human Cytomegalovirus UL135 Interacts with Host Adaptor Proteins To Regulate Epidermal Growth Factor Receptor and Reactivation from Latency. *J. Virol.* 92.

Ramanan, P., and Razonable, R.R. (2013). Cytomegalovirus Infections in Solid Organ Transplantation: A Review. *Infect. Chemother.* 45, 260–271.

Rawlinson, W.D., Farrell, H.E., and Barrell, B.G. (1996). Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 70, 8833–8849.

Rawlinson, W.D., Zeng, F., Farrell, H.E., Cunningham, A.L., Scalzo, A.A., Booth, T.W., and Scott, G.M. (1997). The murine cytomegalovirus (MCMV) homolog of the HCMV phosphotransferase (UL97(pk)) gene. *Virology* 233, 358–363.

Rawlinson, W.D., Boppana, S.B., Fowler, K.B., Kimberlin, D.W., Lazzarotto, T., Alain, S., Daly, K., Doutré, S., Gibson, L., Giles, M.L., et al. (2017). Congenital cytomegalovirus infection in

pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy. *Lancet Infect. Dis.* 17, e177–e188.

Razonable, R.R., and Humar, A. (2019). Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients-Guidelines of the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin. Transplant.* 33, e13512.

Reddehase, M.J., and Lemmermann, N.A.W. (2018). Mouse Model of Cytomegalovirus Disease and Immunotherapy in the Immunocompromised Host: Predictions for Medical Translation that Survived the “Test of Time.” *Viruses* 10.

Reefschlaeger, J., Bender, W., Hallenberger, S., Weber, O., Eckenberg, P., Goldmann, S., Haerter, M., Buerger, I., Trappe, J., Herrington, J.A., et al. (2001). Novel non-nucleoside inhibitors of cytomegaloviruses (BAY 38-4766): in vitro and in vivo antiviral activity and mechanism of action. *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 757–767.

Reischig, T., Kacer, M., Jindra, P., Hes, O., Lysak, D., and Bouda, M. (2015). Randomized Trial of Valganciclovir Versus Valacyclovir Prophylaxis for Prevention of Cytomegalovirus in Renal Transplantation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 10, 294–304.

Revello, M.G., Lazzarotto, T., Guerra, B., Spinillo, A., Ferrazzi, E., Kustermann, A., Guaschino, S., Vergani, P., Todros, T., Frusca, T., et al. (2014). A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus. *N. Engl. J. Med.* 370, 1316–1326.

Revello, M.G., Tibaldi, C., Masuelli, G., Frisina, V., Sacchi, A., Furione, M., Arossa, A., Spinillo, A., Klersy, C., Ceccarelli, M., et al. (2015). Prevention of Primary Cytomegalovirus Infection in Pregnancy. *EBioMedicine* 2, 1205–1210.

Rifkin, L.M., Minkus, C.L., Pursell, K., Jumroendararasame, C., and Goldstein, D.A. (2017). Utility of Leflunomide in the Treatment of Drug Resistant Cytomegalovirus Retinitis. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 25, 93–96.

Rossetto, C.C., Tarrant-Elorza, M., and Pari, G.S. (2013). Cis and Trans Acting Factors Involved in Human Cytomegalovirus Experimental and Natural Latent Infection of CD14 (+) Monocytes and CD34 (+) Cells. *PLoS Pathog.* 9.

Rouphael, N.G., Hurwitz, S.J., Hart, M., Beck, A., Anderson, E.J., Deye, G., Osborn, B., Cai, S.Y., Focht, C., Amegashie, C., et al. (2019). Phase Ib Trial To Evaluate the Safety and Pharmacokinetics of Multiple Ascending Doses of Filociclovir (MBX-400, Cyclopropavir) in Healthy Volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, e00717-19.

Ryckman, B.J., Jarvis, M.A., Drummond, D.D., Nelson, J.A., and Johnson, D.C. (2006). Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J. Virol.* 80, 710–722.

Saffert, R.T., and Kalejta, R.F. (2006). Inactivating a cellular intrinsic immune defense mediated by Daxx is the mechanism through which the human cytomegalovirus pp71 protein stimulates viral immediate-early gene expression. *J. Virol.* 80, 3863–3871.

Schachtele, S.J., Mutnal, M.B., Schleiss, M.R., and Lokensgard, J.R. (2011). Cytomegalovirus induced sensorineural hearing loss with persistent cochlear inflammation in neonatal mice. *J. Neurovirol.* 17, 201–211.

Schampera, M.S., Arellano-Galindo, J., Kagan, K.O., Adler, S.P., Jahn, G., and Hamprecht, K. (2019). Role of pentamer complex-specific and IgG subclass 3 antibodies in HCMV

hyperimmunoglobulin and standard intravenous IgG preparations. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 208, 69–80.

Schleiss, M.R., and McVoy, M.A. (2010). Guinea Pig Cytomegalovirus (GPCMV): A Model for the Study of the Prevention and Treatment of Maternal-Fetal Transmission. *Future Virol.* 5, 207–217.

Schleiss, M.R., Anderson, J.L., and McGregor, A. (2006). Cyclic cidofovir (cHPMPC) prevents congenital cytomegalovirus infection in a guinea pig model. *Virol. J.* 3, 9.

Schleiss, M.R., McGregor, A., Choi, K.Y., Date, S.V., Cui, X., and McVoy, M.A. (2008). Analysis of the nucleotide sequence of the guinea pig cytomegalovirus (GPCMV) genome. *Virol. J.* 5, 139.

Schlischewsky, E., Fuehner, T., Warnecke, G., Welte, T., Haverich, A., Ganzenmueller, T., Heim, A., and Gottlieb, J. (2013). Clinical significance of quantitative cytomegalovirus detection in bronchoalveolar lavage fluid in lung transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* 15, 60–69.

Scott, G.M., Chow, S.S.W., Craig, M.E., Pang, C.N.I., Hall, B., Wilkins, M.R., Jones, C.A., Lloyd, A.R., and Rawlinson, W.D. (2012). Cytomegalovirus infection during pregnancy with maternofetal transmission induces a proinflammatory cytokine bias in placenta and amniotic fluid. *J. Infect. Dis.* 205, 1305–1310.

Shapira, M.Y., Resnick, I.B., Chou, S., Neumann, A.U., Lurain, N.S., Stamminger, T., Caplan, O., Saleh, N., Efferth, T., Marschall, M., et al. (2008). Artesunate as a potent antiviral agent in a patient with late drug-resistant cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 46, 1455–1457.

Shendi, A.M., Hung, R.K.Y., Caplin, B., Griffiths, P., and Harber, M. (2019). The use of sirolimus in patients with recurrent cytomegalovirus infection after kidney transplantation: A retrospective case series analysis. *Saudi J. Kidney Dis. Transplant. Off. Publ. Saudi Cent. Organ Transplant. Saudi Arab.* 30, 606–614.

Silva, J.T., Pérez-González, V., Lopez-Medrano, F., Alonso-Moralejo, R., Fernández-Ruiz, M., San-Juan, R., Brañas, P., Folgueira, M.D., Aguado, J.M., and de Pablo-Gafas, A. (2018). Experience with leflunomide as treatment and as secondary prophylaxis for cytomegalovirus infection in lung transplant recipients: A case series and review of the literature. *Clin. Transplant.* 32.

Smith, P.D., Shimamura, M., Musgrove, L.C., Dennis, E.A., Bimczok, D., Novak, L., Ballestas, M., Fenton, A., Dandekar, S., Britt, W.J., et al. (2014). Cytomegalovirus enhances macrophage TLR expression and MyD88-mediated signal transduction to potentiate inducible inflammatory responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 5604–5612.

Sonntag, E., Hahn, F., Bertzbach, L.D., Seyler, L., Wangen, C., Müller, R., Tannig, P., Grau, B., Baumann, M., Zent, E., et al. (2019). In vivo proof-of-concept for two experimental antiviral drugs, both directed to cellular targets, using a murine cytomegalovirus model. *Antiviral Res.* 161, 63–69.

Sooranna, S.R., Oteng-Ntim, E., Meah, R., Ryder, T.A., and Bajoria, R. (1999). Characterization of human placental explants: morphological, biochemical and physiological studies using first and third trimester placenta. *Hum. Reprod.* 14, 536–541.

Soper, D.E. (2013). Congenital cytomegalovirus infection: an obstetrician's point of view. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *57 Suppl 4*, S171-173.

Stinski, M.F., and Meier, J.L. (2007a). Immediate–early viral gene regulation and function. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), p.

Stinski, M.F., and Meier, J.L. (2007b). Immediate–early viral gene regulation and function. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), p.

Streblow, D.N., Hwee, Y.K., Kreklywich, C.N., Andoh, T., Denton, M., Smith, P., Hart, E., Broekel, R., Pallett, C., Rogers, K., et al. (2015). Rat Cytomegalovirus Vaccine Prevents Accelerated Chronic Rejection in CMV-Naïve Recipients of Infected Donor Allograft Hearts. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *15*, 1805–1816.

Studzińska, M., Jabłońska, A., Wiśniewska-Ligier, M., Nowakowska, D., Gaj, Z., Leśnikowski, Z.J., Woźniakowska-Gęsicka, T., Wilczyński, J., and Paradowska, E. (2017). Association of TLR3 L412F Polymorphism with Cytomegalovirus Infection in Children. *PLoS One* *12*, e0169420.

Sung, C.Y.W., Seleme, M.C., Payne, S., Jonjic, S., Hirose, K., and Britt, W. (2019). Virus-induced cochlear inflammation in newborn mice alters auditory function. *JCI Insight* *4*.

Tabata, T., Pettitt, M., Fang-Hoover, J., Rivera, J., Nozawa, N., Shiboski, S., Inoue, N., and Pereira, L. (2012). Cytomegalovirus Impairs Cytotrophoblast-Induced Lymphangiogenesis and Vascular Remodeling in an in Vivo Human Placentation Model. *Am. J. Pathol.* *181*, 1540–1559.

Tabata, T., Pettitt, M., Puerta-Guardo, H., Michlmayr, D., Wang, C., Fang-Hoover, J., Harris, E., and Pereira, L. (2016). Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe* *20*, 155–166.

Takenaka, K., Nishida, T., Asano-Mori, Y., Oshima, K., Ohashi, K., Mori, T., Kanamori, H., Miyamura, K., Kato, C., Kobayashi, N., et al. (2015). Cytomegalovirus Reactivation after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation is Associated with a Reduced Risk of Relapse in Patients with Acute Myeloid Leukemia Who Survived to Day 100 after Transplantation: The Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation Transplantation-related Complication Working Group. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *21*, 2008–2016.

Thomasini, R.L., Pereira, D.S., Pereira, F.S.M., Mateo, E.C., Mota, T.N., Guimarães, G.G., Pereira, L.S.M., Lima, C.X., Teixeira, M.M., and Teixeira, A.L. (2017). Aged-associated cytomegalovirus and Epstein-Barr virus reactivation and cytomegalovirus relationship with the frailty syndrome in older women. *PLoS ONE* *12*.

Tippin, T.K., Morrison, M.E., Brundage, T.M., and Momméja-Marin, H. (2016). Brincidofovir Is Not a Substrate for the Human Organic Anion Transporter 1: A Mechanistic Explanation for the Lack of Nephrotoxicity Observed in Clinical Studies. *Ther. Drug Monit.* *38*, 777–786.

Tomtishen III, J.P. (2012). Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Viol. J.* *9*, 22.

Tyms, A.S., Scamans, E.M., and Naim, H.M. (1981). The in vitro activity of acyclovir and related compounds against cytomegalovirus infections. *J. Antimicrob. Chemother.* *8*, 65–72.

Uenaka, M., Morizane, M., Tanimura, K., Deguchi, M., Kanzawa, M., Itoh, T., and Yamada, H. (2019). Histopathological analysis of placentas with congenital cytomegalovirus infection. *Placenta* *75*, 62–67.

Underwood, M.R., Harvey, R.J., Stanat, S.C., Hemphill, M.L., Miller, T., Drach, J.C., Townsend, L.B., and Biron, K.K. (1998). Inhibition of human cytomegalovirus DNA maturation by a benzimidazole ribonucleoside is mediated through the UL89 gene product. *J. Virol.* *72*, 717–725.

Vanarsdall, A.L., and Johnson, D.C. (2012). Human cytomegalovirus entry into cells. *Curr. Opin. Virol.* *2*.

Vanarsdall, A.L., Ryckman, B.J., Chase, M.C., and Johnson, D.C. (2008). Human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH/gL mediate epithelial cell-cell fusion when expressed either in cis or in trans. *J. Virol.* *82*, 11837–11850.

Vauloup-Fellous, C., Picone, O., Cordier, A.-G., Parent-du-Châtelet, I., Senat, M.-V., Frydman, R., and Grangeot-Keros, L. (2009). Does hygiene counseling have an impact on the rate of CMV primary infection during pregnancy? Results of a 3-year prospective study in a French hospital. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *46 Suppl 4*, S49-53.

Vincenti, F., Budde, K., Merville, P., Shihab, F., Ram Peddi, V., Shah, M., Wyburn, K., Cassuto-Viguier, E., Weidemann, A., Lee, M., et al. (2018). A randomized, phase 2 study of ASP0113, a DNA-based vaccine, for the prevention of CMV in CMV-seronegative kidney transplant recipients receiving a kidney from a CMV-seropositive donor. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *18*, 2945–2954.

Visentin, S., Manara, R., Milanese, L., Da Roit, A., Forner, G., Salviato, E., Citton, V., Magno, F.M., Orzan, E., Morando, C., et al. (2012). Early Primary Cytomegalovirus Infection in Pregnancy: Maternal Hyperimmunoglobulin Therapy Improves Outcomes Among Infants at 1 Year of Age. *Clin. Infect. Dis.* *55*, 497–503.

Wagner, M., Michel, D., Schaarschmidt, P., Vaida, B., Jonjic, S., Messerle, M., Mertens, T., and Koszinowski, U. (2000). Comparison between human cytomegalovirus pUL97 and murine cytomegalovirus (MCMV) pM97 expressed by MCMV and vaccinia virus: pM97 does not confer ganciclovir sensitivity. *J. Virol.* *74*, 10729–10736.

Wagstaff, A.J., and Bryson, H.M. (1994). Foscarnet. *Drugs* *48*, 199–226.

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

Wang, D., and Shenk, T. (2005a). Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 18153–18158.

Wang, D., and Shenk, T. (2005b). Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. *J. Virol.* *79*, 10330–10338.

Wang, D., Yu, Q.-C., Schröer, J., Murphy, E., and Shenk, T. (2007). Human cytomegalovirus uses two distinct pathways to enter retinal pigmented epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 20037–20042.

- Webster, A.C., Lee, V.W.S., Chapman, J.R., and Craig, J.C. (2006). Target of rapamycin inhibitors (sirolimus and everolimus) for primary immunosuppression of kidney transplant recipients: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Transplantation* *81*, 1234–1248.
- Weisblum, Y., Panet, A., Zakay-Rones, Z., Haimov-Kochman, R., Goldman-Wohl, D., Ariel, I., Falk, H., Natanson-Yaron, S., Goldberg, M.D., Gilad, R., et al. (2011). Modeling of human cytomegalovirus maternal-fetal transmission in a novel decidual organ culture. *J. Virol.* *85*, 13204–13213.
- Weller, T.H. (1970). Review. Cytomegaloviruses: the difficult years. *J. Infect. Dis.* *122*, 532–539.
- White, E.A., and Spector, D.H. (2007). Early viral gene expression and function. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), p.
- Williams, S.L., Hartline, C.B., Kushner, N.L., Harden, E.A., Bidanset, D.J., Drach, J.C., Townsend, L.B., Underwood, M.R., Biron, K.K., and Kern, E.R. (2003). In vitro activities of benzimidazole D- and L-ribonucleosides against herpesviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* *47*, 2186–2192.
- Winston, D.J., Young, J.-A.H., Pullarkat, V., Papanicolaou, G.A., Vij, R., Vance, E., Alangaden, G.J., Chemaly, R.F., Petersen, F., Chao, N., et al. (2008). Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus infection in allogeneic stem cell transplant recipients: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study. *Blood* *111*, 5403–5410.
- Wolf, D.G., Shimoni, A., Resnick, I.B., Stamminger, T., Neumann, A.U., Chou, S., Efferth, T., Caplan, O., Rose, J., Nagler, A., et al. (2011). Human cytomegalovirus kinetics following institution of artesunate after hematopoietic stem cell transplantation. *Antiviral Res.* *90*, 183–186.
- Wussow, F., Yue, Y., Martinez, J., Deere, J.D., Longmate, J., Herrmann, A., Barry, P.A., and Diamond, D.J. (2013). A vaccine based on the rhesus cytomegalovirus UL128 complex induces broadly neutralizing antibodies in rhesus macaques. *J. Virol.* *87*, 1322–1332.
- Xiong, X., Smith, J.L., and Chen, M.S. (1997). Effect of incorporation of cidofovir into DNA by human cytomegalovirus DNA polymerase on DNA elongation. *Antimicrob. Agents Chemother.* *41*, 594–599.
- Yamane, Y., Furukawa, T., and Plotkin, S.A. (1983). Supernatant virus release as a differentiating marker between low passage and vaccine strains of human cytomegalovirus. *Vaccine* *1*, 23–25.
- Zhang, X., Wang, R., Piotrowski, M., Zhang, H., and Leach, K.L. (2015). Intracellular concentrations determine the cytotoxicity of adefovir, cidofovir and tenofovir. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* *29*, 251–258.
- Zhou, M., Yu, Q., Wechsler, A., and Ryckman, B.J. (2013). Comparative analysis of gO isoforms reveals that strains of human cytomegalovirus differ in the ratio of gH/gL/gO and gH/gL/UL128-131 in the virion envelope. *J. Virol.* *87*, 9680–9690.



Zuhair, M., Smit, G.S.A., Wallis, G., Jabbar, F., Smith, C., Devleesschauwer, B., and Griffiths, P. (2019). Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Rev. Med. Virol.* 29, e2034.





## Annexes

---

Annexe 1. Liste des Publications Et Communications.....	209
Annexe 2. Activités complémentaires .....	211





## Annexe 1. Liste des Publications Et Communications

- Publications :

Antiviral Research : en révision

“A highly potent trimeric derivative of artesunate shows promising profiles in experimental models for HCMV congenital infection *in vitro* and *ex vivo*”

**Auteurs** : Chloé Jacquet, Manfred Marschall, Déborah Andouard, Chahrazed El Hamel, Thierry Chianea, Svetlana Tsogoeva, Sébastien Hantz, Sophie Alain

- Communications orales :

- ❖ 39<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (16 et 17 décembre 2019, Paris) : « Un dérivé trimérique de l'artésunate montre des profils prometteurs dans des modèles expérimentaux d'infection congénital à CMVH *in vitro* et *ex vivo* »

**Auteurs** : Chloé Jacquet, Manfred Marschall, Déborah Andouard, Chahrazed El Hamel, Thierry Chianea, Svetlana Tsogoeva, Sébastien Hantz, Sophie Alain

- ❖ Séminaire Bio-Santé des Ecoles doctorales de Limoges et Poitiers (7 au 9 mars 2018, Cussac) : « Evaluation du potentiel antiviral de nouvelles molécules dans des modèles tissulaires d'infection à cytomégalovirus humain »

**Auteurs** : Chloé Jacquet, Sébastien Hantz, Sophie Alain

- ❖ Immunotherapies for Infectious Diseases (I4ID2017) Congress (11 et 12 décembre 2017 Lyon) : “Potential of anti-CMV immunoglobulins in transplant patient's refractory to anti-CMV antiviral treatment”

**Auteurs** : Sophie Alain, **Chloé Jacquet**, Alix Merey, and the CMV rescue therapy group



- Communications affichées :

- ❖ 7<sup>th</sup> International Congenital CMV Conference and the 17th International CMV Workshop (7 au 11 avril 2019, Birmingham, Alabama) : “A highly potent trimeric derivative of artesunate shows promising profiles in experimental models for HCMV congenital infection *in vitro* and *ex vivo*”

**Auteurs** : Chloé Jacquet, Manfred Marschall, Déborah Andouard, Chahrazed El Hamel, Thierry Chianea, Svetlana Tsogoeva, Sébastien Hantz, Sophie Alain

- ❖ Journée institut GEIST, 17 décembre 2017, Limoges : “A highly potent trimeric derivative of artesunate shows promising profiles in experimental models for HCMV congenital infection *in vitro* and *ex vivo*”

**Auteurs** : Chloé Jacquet, Déborah Andouard, Svetlana Tsogoeva, Manfred Marschall, Sébastien Hantz, Sophie Alain

- ❖ Séminaire Bio-Santé des Ecoles doctorales de Limoges et Poitiers (9 et 10 mars 2018, Pouligny Notre Dame) et prix du meilleur poster : « Evaluation du potentiel antiviral de nouvelles molécules dans des modèles tissulaires d’infection à cytomégalovirus humain »

**Auteurs** : Jacquet Chloé, Andouard Déborah, Marschall Manfred, Morère Lucie, Hantz Sébastien, Alain Sophie

## Annexe 2. Activités complémentaires

- **Doctorante à charge d'enseignements** (32h/an) à la faculté des Sciences et Techniques de Limoges de septembre 2017 à juin 2019
- **Animatrice du Scientibus** (18h/an) de septembre 2017 à juin 2019
- Animatrice de l'Atelier Immunoludique, actuellement Atelier LuSci, en 2017
- **Représentante des Doctorants** au Conseil de l'Ecole Doctorale ED615 : Science Biologique et Santé, depuis avril 2018.
- Participation active à la mise en place de **plateforme C-Lim** au sein de l'unité Inserm 1092 pour l'évaluation de nouvelles molécules antivirales.
- Encadrement de stagiaires :
  - Thibault Horville : co-encadrement avec Déborah Andouard, stage de Master 1 (du 3 avril au 26 mai 2017)

« Impact des molécules anti CMV ou des anticorps sur la réplication virale dans différents tissus. »

- Brice Gastineau : stage volontaire du 1<sup>er</sup> au 31 juillet 2019



## Evaluation du potentiel antiviral de nouvelles molécules dans des modèles cellulaires et tissulaires d'infection à cytomégalo­virus humain

---

L'infection à cytomégalo­virus humain (CMVH) est un problème majeur de santé publique. Les traitements couramment utilisés contre l'infection à CMVH sont efficaces mais le plus souvent toxiques et donc proscrits pour la femme enceinte. Pour disposer d'outils performants et fiables pour évaluer les nouvelles thérapeutiques en phase préclinique, et dans un contexte de l'infection congénitale à CMVH, nous avons développé les essais antiviraux sur souches endothéliotropes et dans différents types cellulaires. De plus, nous avons optimisé deux modèles : 1) Le modèle *ex vivo* d'histoculture de villosités placentaires, permettant d'évaluer les traitements au sein d'un tissu complexe. 2) Le modèle de souris humanisées par greffe d'explants placentaires pour l'étude de l'efficacité *in vivo* en tenant compte de la stricte spécificité d'espèce du CMV.

En utilisant les méthodes développées *in vitro* et *ex vivo* nous avons évalué trois approches thérapeutiques nouvelles : une molécule modèle à cible cellulaire dérivée de l'artésunate et un nouvel analogue du cidofovir à faible toxicité, afin d'évaluer leur potentiel thérapeutique, et une approche immunologique utilisant des hyperimmunoglobulines à forte capacité neutralisante afin de mieux comprendre leur mécanisme d'action au niveau du placenta. Ainsi, ce travail de thèse s'inscrit dans un contexte d'évaluation de nouveaux antiviraux pour améliorer la prise en charge de l'infection à CMVH.

---

Mots-clés : Cytomégalo­virus humain, modèle *in vitro*, souris humanisées, infection congénitale, dérivé artésunate, analogue cidofovir, hyperimmunoglobulines

## Evaluation du potentiel antiviral de nouvelles molécules dans des modèles cellulaires et tissulaires d'infection à cytomégalo­virus humain

---

Human Cytomegalovirus (HCMV) infection is a major matter of public health concern. Current treatments against HCMV infection are effective but frequently toxic, therefore proscribed during pregnancy. In order to have highly performing and reliable tools to evaluate the new treatments on the pre-clinic phase, particularly in the context of HCMV congenital infection, we have developed antiviral models using strains with tropism towards the endothelium over different cell types. Additionally, we optimized two models: 1) the *ex vivo* model of placental villi cell culture, allowing the evaluation of treatments within a complex tissue. 2) The *in vivo* model in humanized mice by transplanting human placental explants to assess the antiviral efficacy, keeping in mind the strict species specificity of HCMV.

Using the developed *in vitro* and *ex vivo* models, we evaluated three new therapeutic approaches: A model molecule with a cellular target derived from artesunate and a new cidofovir analogue of low toxicity, to assess their therapeutic potential; and an immunologic approach using hyper-immunoglobulins with high neutralizing capacity, to better understand their mode of action at the placental level. Therefore, this thesis work is placed within the context of the evaluation of new antiviral molecules to improve the treatment of HCMV infection

---

Keywords: Human Cytomegalovirus, *in vitro* model, humanized mice, congenital infection, artesunate derivate, cidofovir analogue, hyper-immunoglobulin

