



HAL
open science

Mise au point d'une technique combinée de génotypage et de recherche de résistances aux antiviraux pour le virus herpes simplex de type 1

Maëlia Etoundi

► **To cite this version:**

Maëlia Etoundi. Mise au point d'une technique combinée de génotypage et de recherche de résistances aux antiviraux pour le virus herpes simplex de type 1. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-04529371

HAL Id: dumas-04529371

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04529371>

Submitted on 2 Apr 2024

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License



THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenue le 2 avril 2021

Par M^{lle} ETOUNDI Maëlia
Née le 25/07/1994
Aux Lilas

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017 portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE COMBINÉE DE
GENOTYPAGE ET DE RECHERCHE DE RESISTANCES
AUX ANTIVIRAUX POUR LE VIRUS *HERPES SIMPLEX*
DE TYPE 1

----oOo----

JURY :

Président : Madame le Professeur Caroline SOLAS
Membres : Monsieur le Docteur Antoine NOUGAIREDE (Directeur de thèse)
Madame le Docteur Christine ZANDOTTI



THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenue le 2 avril 2021

Par Mlle ETOUNDI Maëlia
Née le 25/07/1994
Aux Lilas

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017 portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

----oOo----

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE COMBINÉE DE
GENOTYPAGE ET DE RECHERCHE DE RESISTANCES
AUX ANTIVIRAUX POUR LE VIRUS *HERPES SIMPLEX*
DE TYPE 1

----oOo----

JURY :

Président : Madame le Professeur Caroline SOLAS
Membres : Monsieur le Docteur Antoine NOUGAIREDE (Directeur de thèse)
Madame le Docteur Christine ZANDOTTI



27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

Doyen : Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Vice-Doyens : M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
Chargés de Mission : Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI, M. Guillaume HACHE
Conseiller du Doyen : M. Patrice VANELLE
Doyens honoraires : M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
Professeurs émérites : M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Henri PORTUGAL, M. Philippe CHARPIOT
Professeurs honoraires : M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
Chef des Services Administratifs : Mme Florence GAUREL
Chef de Cabinet : Mme Aurélie BELENGUER
Responsable de la Scolarité : Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	M. Robert GILLI Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER M. François DEVRED Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pascal PRINDERRE M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE	M. Jérémy MAGALON Mme Carole SIANI

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS	Mme Angélique GOODWIN
---------	-----------------------

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN-JAU Mme Florence SABATIER-MALATERRE Mme Nathalie BARDIN
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

ATER

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Anne-Claire DUCHEZ
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Mélanie VELIER
----------------------------	--------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOGNOSIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Duje BURIC
---	---------------

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE Mme Frédérique GRIMALDI M. Joseph CICCOLINI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE PHARMACIE CLINIQUE	Mme Anaïs MOYON M. Florian CORREARD
---	--

ATER.

TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Anne RODALLEC
----------------------------------	-------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier 2020

REMERCIEMENTS

A Madame le **Professeur Caroline SOLAS**, je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse et d'avoir accepté de juger mon travail. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

A Monsieur le **Docteur Antoine NOUGAIREDE**, merci de m'avoir proposé ce travail et fait l'honneur d'encadrer ma thèse. Merci pour tes conseils, ton soutien et ta patience. Merci de m'avoir autant appris dans le domaine de la biologie moléculaire et de la bio-informatique tout au long de ce travail.

A Madame le **Docteur Christine ZANDOTTI**, je vous admire beaucoup et c'est un honneur pour moi que vous ayez accepté de faire partie de mon jury. Merci pour vos conseils concernant ce travail mais également de m'avoir tant appris lors de mon semestre en virologie.

A **Paul-Rémi**, merci d'avoir été là à chaque étape de ce travail et de m'avoir autant aidée. Cette thèse n'aurait pas été telle qu'elle est sans toi. Merci d'être un modèle pour moi depuis notre premier jour comme co-interne et bien sûr merci pour toutes les calories brûlées en courant dans les couloirs de l'IHU.

A **Fleur**, merci d'être une personne aussi bienveillante et d'avoir été à mes côtés. Je suis très heureuse qu'on ait pu travailler ensemble sur ce projet, s'entraider nous aura permis d'aller plus loin (et surtout les galères de manip sont nettement moins anxiogènes à deux).

A **mes parents**, les plus belles personnes que je connaisse, vous êtes des modèles de générosité et d'amour. Votre cœur immense et les valeurs que vous m'avez inculquées ont fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir soutenue, d'avoir été patients dans les pires moments. Ce titre de docteur je vous le dois entièrement.

A **ma sœur**, tu es le plus beau cadeau que la vie m'ait donné et ce que j'ai de plus cher au monde. Je t'aime.

A **Léo** mon amour, merci de m'aimer autant depuis toutes ces années et d'avoir toujours cru en moi. A nos projets, nos voyages et je l'espère à une vie remplie d'amour.

A **ma famille**, à Jojo, merci de m'avoir aimée et entourée à chaque étape de ma vie.

A **Nais**, ma meilleure amie, merci de toujours m'écouter, me conseiller et de me connaître comme personne. Je sais que tu seras toujours à mes côtés.

A **Camille, Coco et Fanny** merci pour les souvenirs heureux en votre présence, pour les moments passés et à venir que je chéris et merci d'être là depuis toutes ces années malgré la distance.

A **Julie**, sans laquelle mes années au lycée n'auraient pas été aussi belles. Ton amitié n'a pas de prix et je ne peux pas imaginer un monde où tu ne ferais pas partie de ma vie.

A **Mélanie**, pour ta joie de vivre inégalable mais surtout merci d'être l'amie que tu es.

A ma team P1 : **Sarah, Chloé, Cyssou et Léa** ; ça n'aura pas été toujours facile de me supporter pendant la PACES. A toi Sarah, avec qui j'ai passé chaque jour de ces deux années, sans ton soutien et ton aide je ne serais pas ici aujourd'hui. A Chloé, merci d'avoir croisé ma route, j'ai su dès le premier jour que c'était le début d'une grande amitié.
A Léa, merci d'être autant à mon écoute et de me conseiller comme tu le fais.

A mes pharmabombasses : **Victoria, Léa, Emmanuelle et Perrine**. Merci pour ces années de pharma et surtout ces fous rires en TP. Merci à la meilleure des binômes, Perrine, d'être mon amie et de m'avoir supportée à la fac, tu es la preuve que le hasard fait bien les choses.

A **Camille**, merci d'être apparue dans ma vie au moment où j'avais besoin d'une amie. Merci de m'avoir fait tenir cette année de concours de l'internat, c'est grâce à toi si je suis là aujourd'hui. Merci d'être mon amie, ma co-interne, mon acolyte. J'espère que notre rêve de travailler ensemble pourra se concrétiser.

A **Julie**, merci pour cette amitié construite peu à peu, au fur et à mesure de nos voyages (et de nos galères). Merci pour tous les moments ensemble, passés et futurs.

A mes amis du lycée : **Pauline, Alexia, Anne et Hugo**. J'espère que notre amitié traversera encore de nombreuses années. Merci les filles pour nos souvenirs à la danse qui comptent tant.

A **Ivan**, merci pour tous les moments passés ensemble étant ado. Tu es bien plus qu'un ami, plutôt un frère et ces dernières années tu m'as beaucoup manqué.

A **Sara**, l'une des plus belles rencontres de mon internat. Merci d'être entré dans ma vie.

A **Laurine**, si l'IHU m'a apporté une chose c'est bien ton amitié. J'espère qu'on aura encore de beaux moments passés toutes les deux.

A **Erwan**, mon co-interne préf, à toutes nos chamailleries (je n'aurais jamais cru qu'elles me manqueraient autant).

A mes co-internes **les fils (Marc, Rémi, Marceau, Samuel, Emma), Céline, Camille, Benjamin, Sonia, Valentine, Théo, Samuel, Nicolas, Estelle, Mickaël**. J'ai beaucoup trop d'amour pour vous tous, merci d'être à mes côtés tous les jours.

A **Océane**, merci d'être toujours à mon écoute, merci pour tous ces bons moments passés à la danse, ils me manquent...

A **Cécilia**, si cette année 2020 m'a apporté une chose c'est bien notre amitié. J'ai enfin pu te découvrir, je t'admire d'être une personne aussi forte avec autant de joie de vivre.

A **Cyrielle**, merci pour tous ces moments passés ensemble.

A **Maxime**, merci d'être une personne aussi bienveillante, je suis heureuse que ma sœur ait quelqu'un comme toi à ses côtés.

A **Raph**, merci pour les moments passés ensemble, ça me manque de ne plus te commander ton petit déjeuner au Vietnam.

A mes collocs : **Claire et Natacha** ; merci de m'avoir fait rire tous les jours durant ces six derniers mois. Merci Claire pour toutes ces déclarations d'amour, je reprends tes mots : je vous adore !

A **Maxime, Lisa, Vincent et Ines**, tout simplement merci de rendre Léo heureux.

A **tous les internes, les biologistes et les techniciens** qui ont partagés mon internat que je n'ai pas cités, merci pour tout.

*« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation
aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées
comme propres à leurs auteurs »*

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	2
LISTE DES TABLEAUX	3
TABLE DE ANNEXES	4
INDEX DES ABBREVIATIONS	5
INTRODUCTION	6
I. HERPES SIMPLEX VIRUS 1	8
1. GÉNÉRALITÉS.....	8
2. ÉPIDÉMIOLOGIE.....	8
3. PHYSIOPATHOLOGIE.....	9
4. SYMPTOMATOLOGIE	11
a) Manifestations orales	11
b) Manifestations ophtalmiques	12
c) Herpès génital	13
d) Encéphalite herpétique.....	14
e) Infection herpétique in utéro	15
f) Herpès néonatal	15
g) Autres	17
h) Formes chez l'immunodéprimé.....	17
i) Fréquence des différentes localisations	17
5. DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE.....	18
a) Diagnostic indirect	18
b) Diagnostic direct.....	19
c) Particularités diagnostics de certaines formes cliniques	21
6. TRAITEMENT	22
a) Molécules disponibles.....	22
b) Formes galéniques disponibles	25
c) Paramètres pharmaco-cocinétiques.....	25
d) Stratégies thérapeutiques.....	25
II. RÉSISTANCES AUX TRAITEMENTS	30
1. ÉLIMINER UNE FAUSSE RÉSISTANCE	31
2. PRÉVALENCE DES RÉSISTANCES	32
3. GÉNOTYPES ET PHÉNOTYPES DES RÉSISTANCES	33
a) Phénotypes	33
b) Génotypes	33
4. CONSÉQUENCES CLINIQUES DES RÉSISTANCES.....	37
5. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES RÉSISTANCES	38
a) Tests de susceptibilité	39
b) Analyses phénotypiques.....	42
c) Études génétiques	42
6. TRAITEMENT DES RÉSISTANCES	44
III. GÉNOTYPAGE DE L'HERPES SIMPLEX VIRUS 1	45
1. RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISME (RFLP)	45
2. SÉQUENÇAGE	46
3. RELATIONS ENTRE CES DEUX MODÈLES	47

IV. MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE COMBINÉE DE GÉNOTYPAGE ET DE RECHERCHE DE RÉISTANCES AUX ANTIVIRAUX POUR LE VIRUS DE L'HERPES SIMPLEX DE TYPE 1	48
1. MATÉRIELS ET MÉTHODES	48
a) Analyse bio-informatique	48
b) Préparation des amorces	57
c) Sélection des échantillons	58
d) Protocole	60
2. SOURCES D'ÉCHEC D'UNE PCR	63
3. RÉSULTATS DES PCR	68
4. RÉSULTATS DU SÉQUENÇAGE	75
V. DISCUSSION	80
BIBLIOGRAPHIE.....	83
ANNEXES	94

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Séroprévalence à l'IHU méditerranée infection en fonction du sexe	9
Figure 2 : Séroprévalence à l'IHU méditerranée infection en fonction de l'âge	9
Figure 3 : Technique ELISA.....	19
Figure 4 : Gène UL23 et ses mutations conférant des résistances à l'aciclovir : Les additions et délétions sont indiquées sous les traits verticaux, les substitutions sont indiquées dans le tableau.....	34
Figure 5 : Gène UL30 et ses mutations de résistance à l'aciclovir : les substitutions dans les zones conservées sont indiquées à l'intérieur des rectangles et celles dans les zones non conservées à l'extérieur.....	36
Figure 6 : Stratégie thérapeutique en cas de résistances aux antiviraux.....	44
Figure 7 : Modèle de clivage du gène US7 de la glycoprotéine I	46
Figure 8 : Modèle de clivage du gène US2	46
Figure 9 : Phylogroupes d'herpes simplex virus 1.....	47
Figure 10 : Répartition des génotypes A, B et C de l'HSV1 parmi les phylogroupes I, II et III ⁴	47
Figure 11 : Alignement des séquences de génomes complets de l'HSV 1	48
Figure 12 : Arbre phylogénétique des séquences d'HSV 1 téléchargées à partir de la genbank (NCBI) et sélection de 40 séquences pour mon travail.....	52
Figure 13 : Variabilité des séquences d'ADN de l'HSV 1 (Logiciel MEGA)	52
Figure 14 : Logiciel primal scheme	53
Figure 15 : Proposition d'amorces par le logiciel primal scheme	54

Figure 16 :	Logiciel Sequencher	54
Figure 17 :	Protocole de préparation des échantillons pour le séquençage	62
Figure 18 :	Migration des produits des PCR test.....	69
Figure 19 :	Migration des produits de PCR de la plaque n°1.....	69
Figure 20 :	Migration des produits de PCR de la plaque n°2.....	70
Figure 21 :	Migration des produits de PCR de la plaque n°3.....	70
Figure 22 :	Pourcentage de réussite des PCR en fonction du Ct.....	71
Figure 23 :	Pourcentage de réussite des PCR en fonction de l'origine du prélèvement	71
Figure 24 :	Dosage de la quantité d'ADN au nanodrop	72
Figure 25 :	Concentration d'ADN en ng/ μ l.....	73
Figure 26 :	Quantités d'échantillon à introduire en μ l.....	73
Figure 27 :	Concentration d'ADN en ng/ μ l.....	73
Figure 28 :	Quantités d'échantillon à introduire en μ l.....	74
Figure 29 :	Nombre de reads lors du séquençage NGS par ion torrent	75
Figure 30 :	Mapping des reads à la référence sur CLC genomics.....	76
Figure 31 :	Correction des erreurs sur CLC genomics.....	76
Figure 32 :	BLAST des séquences obtenues sur le génome complet de l'HSV 1.....	77
Figure 33 :	Arbre phylogénétique avec les 40 séquences de références et les séquences des échantillons testés	79

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Localisations des manifestations herpétiques	17
Tableau 2 :	Formes galéniques disponibles	25
Tableau 3 :	Paramètre pharmacocinétiques.....	25
Tableau 4 :	Concentrations observées habituellement à différentes posologies	31
Tableau 5 :	Biodisponibilité de l'aciclovir en fonction des tissus et liquides biologiques	31
Tableau 6 :	Codes pour dessiner les amorces	54
Tableau 7 :	Séquences des amorces, % de G et C et température d'hybridation des amorces	57
Tableau 12 :	Liste des échantillons utilisé pour les PCR et le séquençage test	58
Tableau 13 :	Liste des échantillons utilisés pour les PCR et le séquençage	59

TABLE DE ANNEXES

Annexe 1 :	Polymorphisme naturel du gène UL23 de la thymidine kinase de l'HSV 1	94
Annexe 2 :	Mutations de résistances du gène UL23 de la thymidine kinase	100
Annexe 3 :	Polymorphisme naturel du gène UL30 de l'ADN polymérase virale.....	112
Annexe 4 :	Mutations de résistance du gène UL30 de l'ADN polymérase virale.....	121

INDEX DES ABBREVIATIONS

A :	adénine
AA :	acide aminé
Ac :	anticorps
ACV :	aciclovir
ADN :	acide désoxyribonucléique
AVC :	accident vasculaire cérébral
BD :	biodisponibilité
C :	cytosine
CDV :	cidofovir
CMV :	cytomégalovirus
CSH :	cellules souches hématopoïétiques
EBV :	Epstein barr virus
EC50 :	concentration effectrice 50
FCV :	famciclovir
FOS :	foscarnet
G :	guanine
HSV :	<i>Herpes simplex virus</i>
Ig :	immunoglobuline
IV :	intraveineuse
LBA :	lavage bronchoalvéolaire
LCR :	liquide céphalo-rachidien
NGS :	next generation sequencing
nt :	nucléotide
pb :	paire de base
PCR :	polymerase chain reaction
PCV :	penciclovir
PRA :	plaque reduction assay`
R :	résistant
rt-PCR :	real time polymerase chain reaction
S :	sensible
SNC :	système nerveux central
T :	thymine
TK :	thymidine kinase
VACV :	valaciclovir
Vd :	volume de distribution
VIH :	virus de l'immunodéficiência humaine
VO :	voie orale
VZV :	virus de la varicelle et du zona

INTRODUCTION

L'*Herpes simplex virus 1*, virus strictement humain, est retrouvé très fréquemment dans la population générale où sa séroprévalence s'élève à plus de 50%. Il peut être responsable d'excrétions asymptomatiques mais également d'infections de sévérité variable en fonction de la localisation et de l'état d'immunodépression du patient. Les formes cliniques sont multiples. Il peut s'agir d'une primo-infection qui a le plus souvent lieu dans l'enfance ou de réactivations.

Les molécules antivirales actives contre l'HSV1 sont connues depuis très longtemps et ont prouvé leur efficacité. Cependant des résistances ayant des répercussions chez les patients immunodéprimés ont été décrites. Des méthodes diagnostics de celles-ci ont été développées il y a de nombreuses années mais nécessitent cependant une étape préalable de culture virale. Elles permettent de documenter ces résistances et aident à la prise en charge thérapeutique. Chez un patient infecté par un virus résistant aux antiviraux il est possible de retrouver un mélange de phénotypes de résistance au sein des souches isolées. La résistance peut également toucher uniquement une partie des souches, celle-ci pouvant être minoritaire. Il a donc été décrit que le virus est classé comme résistant s'il y a au moins 20% de souches qui le sont. Il serait donc intéressant de développer une technique qui non seulement serait applicable directement sur le prélèvement mais pourrait également détecter des souches résistantes minoritaires.

Ce virus étant ubiquitaire et retrouvé dans le monde entier, il n'est donc pas souvent facile de connaître le contexte exact de sa transmission. Sa physiopathologie rend également difficile la différenciation entre une réactivation et une réinfection. Une technique de génotypage permettrait de documenter ces transmissions pour rechercher des clusters, ou s'assurer de la transmission materno-fœtale en comparant les séquences des virus retrouvés chez la mère et l'enfant. Elle permettrait également de différencier une réinfection d'une réactivation en comparant les séquences retrouvées chez un même patient à deux temps différents. D'un point de vue épidémiologique le génotypage serait utile pour retracer les mouvements de population en rattachant aux différents génotypes des origines géographiques distinctes.

Le fait de combiner une méthode de génotypage avec une méthode de recherche des mutations de résistance permettrait tout d'abord d'établir une possible association entre ces mutations et le génotypage et étudier l'épidémiologie de ces résistances au sein des différents génotypes. Elle permettrait également la détection de mutations de résistance sans conséquences cliniques n'étant donc pas systématiquement recherchées. Pour finir cela permettrait d'augmenter considérablement la banque de séquences, nécessaire pour le génotypage.

L'objectif de ce travail est donc de développer une méthode sensible directement réalisable sur l'extrait d'ADN issu de prélèvements cliniques afin qu'elle puisse être utilisée en routine à l'hôpital. Il est nécessaire de développer un système de Polymerase Chain Reaction afin d'amplifier les séquences d'ADN codant pour les gènes cibles des mutations résistance ainsi que des séquences d'ADN hypervariables utiles au génotypage. La séquence consensus obtenue par Next Generation Sequencing permettra d'établir les génotypes et de rechercher des mutations de résistance à partir d'une base de données de la littérature. Le fait d'utiliser la technique Ion torrent qui permet une grande profondeur du séquençage est utile pour phénotyper des sous populations du virus afin d'identifier des souches résistantes minoritaires.

I. Herpes simplex virus 1

1. Généralités

L'*Herpes simplex virus 1* est un virus enveloppé appartenant à la famille des *Herpesviridae*, à la sous famille *Alphaherpesvirinae* et au genre *Simplex virus*. Il est de grande taille (150 à 200 nm) et possède une capsidie icosaédrique composée de 162 capsomères entourée d'un tégument. L'enveloppe qui entoure cette capsidie est composée d'une bicouche lipidique contenant des glycoprotéines (gD, gB et gH/gL) permettant l'attachement et l'entrée dans les cellules hôtes ainsi que l'activation du système immunitaire de l'hôte.¹⁻³

Son génome se compose d'un ADN double brin dont la réplication est intranucléaire. Il contient environ 152 000 paires de bases dont 68% de G/C. Il est composé de séquences uniques dites « unique long » (U_L) et « unique short » (U_S) qui contiennent des éléments répétitifs appelés « terminal repeats » (TR_L et TR_S) et internal repeats (IR_L et IR_S) en fonction de leur position. Il contient également un segment répétitif appelé « a-sequence », des « short tandem repeats » (STRs) de moins de 100 paires de bases et des « variable number of tandem repeats » (VNTRs) de tailles de plus de 500 pb. Il contient un ensemble de gènes codant pour 74 protéines ^{1,3-6}

2. Épidémiologie

Le réservoir de l'*Herpes simplex virus* est strictement humain.^{1,3} Sa séroprévalence mondiale est indépendante du sexe et s'élève à 67% (étude de 2012 sur 3709 millions de patients âgés de 0 à 49 ans).⁷ Cette prévalence qui augmente avec l'âge est supérieure au sein des classes socio-économiques défavorisées³ ainsi que dans les pays en développement^{7,8}. Elle diminue au fur et à mesure des années dans les pays développés.⁹⁻¹³ on observe notamment une nette diminution dans la population âgée de 14 à 19 ans ce qui entraîne l'augmentation du nombre d'adolescents ne possédant pas d'anticorps protecteurs au moment du premier rapport sexuel.³

Aux hôpitaux publics de Marseille (laboratoire IHU Méditerranée Infection), de janvier 2017 à décembre 2020, 11 997 sérologies HSV ont été réalisées. L'étude de ces sérologies montre une séroprévalence de 75,7% et un ratio Homme/Femme=1. En prenant en compte le biais de sélection chez les patients, on peut observer une séroprévalence augmentant avec l'âge.

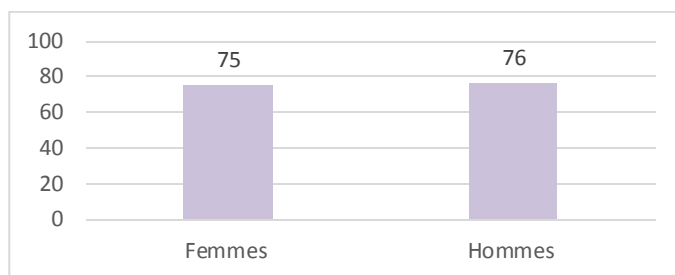


Figure 1 : Séroprévalence à l'IHU méditerranée infection en fonction du sexe

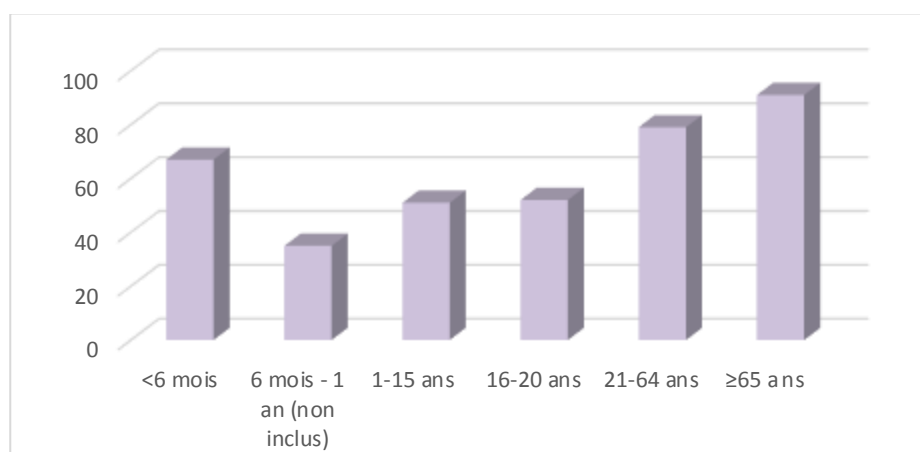


Figure 2 : Séroprévalence à l'IHU méditerranée infection en fonction de l'âge

3. Physiopathologie

C'est un virus dermoneurotrope¹⁴ transmis par contacts directs cutanéomuqueux via la salive, les lésions cutanées ainsi que les relations sexuelles lors de l'excrétion du virus chez un sujet symptomatique ou asymptomatique.^{1,15,16}

Les glycoprotéines permettent l'attachement du virus aux cellules cibles (cellules épithéliales) ainsi que sa diffusion dans l'organisme.¹⁻³ Une fois la fusion de la membrane plasmique et de l'enveloppe virale terminée, la capsid est libérée dans le cytoplasme, migre

et s'attache aux pores nucléaires. Elle libère ensuite l'ADN qui, après être entré dans le noyau sera d'une part répliqué et d'autre part transcrit en ARNm. Ce dernier migre à son tour dans le cytoplasme pour permettre la traduction en protéines virales. Celles-ci une fois formées reviennent dans le noyau permettant ainsi l'assemblage de nouveaux virions. Ces derniers bourgeonnent à travers la membrane nucléaire et leur passage par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi permet la maturation protéique.^{3,14} Ce cycle de réplication court permet au virus d'avoir une propagation rapide⁴ qui s'effectue soit via la libération de virions par exocytoses depuis les cellules infectées (« cell free spread ») soit en diffusant directement d'une cellule à l'autre (« cell-to-cell spread »). Ce dernier moyen de diffusion permet de court-circuiter les barrières biophysiques et la réponse humorale.^{1,2,14}

- Primo infection

La primo infection survient en règle générale dans l'enfance et se manifeste après une période d'incubation de 2 à 12 jours. La réplication virale est intense bien qu'elle soit asymptomatique dans 70% des cas. Au cours de cette phase le virus utilise alors deux voies de dissémination. Soit le long des axones neuronaux pour se diriger vers les ganglions sensitifs crâniens ou sacrés avec exceptionnellement une migration vers les méninges, la moelle osseuse et l'encéphale entraînant des méningites, myélites et encéphalites. Soit le virus se dissémine par voie sanguine entraînant une virémie peu intense pouvant être responsable dans de rares cas d'infections systémiques, par exemple chez l'immunodéprimé.^{1,15,16}

- Phases de latences

Le génome viral se circularise sous forme d'épisome et persiste sans réplication virale au niveau des noyaux des neurones des ganglions sensitifs. Au cours de cette phase le virus n'est pas sensible aux antiviraux.^{1,15,16}

- Réactivations

Les réactivations se produisent sous l'influence de nombreux facteurs tels que l'exposition au soleil, le stress, les menstruations, la grossesse, la baisse de l'immunité à médiation cellulaire et les infections à pneumocoque ou méningocoque. Le virus migre par voie axonale

centrifuge au niveau de la peau et/ou des muqueuses où il peut être responsable soit d'une excrétion virale asymptomatique soit de récurrences locales avec des signes cliniques de moindre intensité par rapport à ceux observés lors de la primo infection. Une infection neuro-méningée peut également survenir. ^{1,15,16}

- Cas de l'immunodéprimé

L'infection à HSV est plus sévère chez les patients immunodéprimés et particulièrement ceux dont l'immunité à médiation cellulaire est réduite. Chez les patients infectés par le VIH, les transplantés d'organes ou les greffés de CSH, les lésions herpétiques peuvent être étendues, persister et se disséminer. Les récurrences sont plus fréquentes et peuvent se présenter sous formes atypiques. ¹⁵

4. Symptomatologie

La symptomatologie de l'infection à *Herpes simplex virus 1* est dépendante du site de l'infection ainsi que de la situation de primo infection ou de réactivation. ^{1,16,17}

L'infection peut être néanmoins asymptomatique. En effet 20 à 25% des patients avec des anticorps anti-HSV n'ont aucun antécédent clinique d'infection herpétique génitale ou labiale.¹⁸ Ces formes asymptomatiques exposent tout de même à une transmission du virus via les sécrétions ou les muqueuses.¹⁹

a) Manifestations orales

- Gingivostomatite aiguë

La gingivostomatite aiguë est la manifestation de la primo infection symptomatique dont la période d'incubation dure 2 à 12 jours (médiane de 4 jours). Elle survient le plus souvent chez l'enfant et se traduit d'une part par des lésions douloureuses au niveau des muqueuses buccales ou gingivales ou bien de la langue, pouvant aller jusqu'aux lèvres et au menton (2/3 des enfants). Ces lésions s'ulcèrent rapidement et entraînent une dysphagie très douloureuse empêchant de boire et de s'alimenter. Chez l'enfant elle est également souvent responsable d'une fièvre élevée (>38°C) durant 4 jours et d'adénopathies sous angulomaxillaires et prétragiques. Il existe un risque de surinfection bactérienne. ^{1,16,20}

La guérison est spontanée en 12 à 15 jours (ulcération des lésions en six jours puis disparition progressive) mais l'excrétion virale peut être prolongée jusqu'à 3 semaines. Le virus sera ensuite latent dans le ganglion de Gasser.^{1,16,20} Si la primo infection a été symptomatique, les récurrences sont associées à un risque supérieur de présenter des signes généraux, une augmentation de la durée des lésions et une excrétion virale prolongée.^{21,22}

Un traitement précoce permet de diminuer la quantité de virus accédant aux ganglions nerveux et ainsi de diminuer la latence et la capacité de réactivation étroitement liées à la charge virale latente.¹⁷

- Herpès labial

L'herpès labial est la manifestation des récurrences. Elle se traduit par des vésicules en bouquet, unilatérales, localisées au niveau de la jonction cutanéomuqueuse des lèvres. Plus rarement, elles peuvent être localisées au niveau des narines ou du menton.^{1,16,17}

b) Manifestations ophtalmiques

- Kératite herpétique

La kératite herpétique, souvent récidivante, est le plus souvent une manifestation des récurrences. Elle entraîne à terme un risque d'opacification de la cornée et donc un retentissement sur la vision avec une possible cécité. Plusieurs formes cliniques existent :

- Conjonctivites folliculaires unilatérales (évolution bénigne)
- Kératite superficielle qui provoque une sensation de corps étranger unilatéral avec larmoiement et photophobie.
- Kératite profonde causée par les réactions immunopathologiques qui accompagnent de multiples récurrences. Elle entraîne un risque d'opacité cornéenne définitive.
- Plus rarement les uvéites, les iridocyclites et les nécroses rétiniennes aiguës

Elle se complique souvent d'uvéites antérieures de l'œil dues à une excrétion virale dans les corps ciliaires.^{1,16,17}

- Rétinite nécrosante herpétique :

C'est une infection aiguë nécrosante de la rétine, retrouvée le plus souvent lors de réactivations.

Elle est rare mais très grave étant donné que son évolution rapide peut entraîner une cécité en quelques jours. Elle est liée à des lésions de vascularites occlusives qui entraînent une nécrose rapide de la rétine et se manifestent par une baisse brutale et massive de l'acuité visuelle. L'œil devient rouge et douloureux. Malgré l'instauration d'un traitement rapide, le pronostic visuel est souvent sévère.^{1,16,17}

c) Herpès génital

L'herpès génital était causé historiquement par l'HSV 2, cependant l'HSV 1 est devenu prédominant et représente maintenant jusqu'à 80% des herpes génitaux dans certaines populations de femme jeunes.^{23,24}

Les facteurs de risques identifiés sont le sexe féminin, les classes socio-économiques défavorisées, les minorités ethniques, la durée de l'activité sexuelle, les antécédents d'infections génitales et le nombre de partenaires sexuels.²⁵

- Primo infection

La primo infection de l'herpès génital, asymptomatique dans 70% des cas, survient après une incubation de 2 à 7 jours. On observe l'apparition de multiples vésicules érythémateuses localisées chez l'homme, au niveau du gland ou sur le reste du pénis où elles peuvent persister plusieurs jours, chez la femme sur la vulve, le périnée, les fesses, le col ou le vagin (responsables souvent de leucorrhées) où elles s'ulcèrent rapidement. Ces formes sont souvent très douloureuses et peuvent s'accompagner de signes locaux (dyspareunie, dysurie, rétention urinaire en cas d'atteinte urétrale) ou généraux (fièvre, malaises, adénopathies inguinales bilatérales sensibles, radiculomyélite sacrée). La cicatrisation totale des lésions peut prendre plusieurs semaines.^{1,16,17}

- Réactivations

Les récurrences sont d'intensité moindre et entraînent l'apparition de vésicules en bouquet peu douloureuses qui persistent 6 à 7 jours. Elles sont précédées de prodromes tels que des brûlures, des prurits et des paresthésies durant quelques heures. L'existence de

porteurs asymptomatiques ainsi que d'autres localisations vaginales et cervicales pouvant passer inaperçues, le risque de contagiosité est élevé. ^{1,16,17}

- Vulvovaginite : Cette manifestation est retrouvée chez la petite fille où la contamination se fait par ses doigts souillés de salive. ^{1,16,17}
- Herpès anal et péri anal

Lors de la primo infection on retrouve l'apparition de vésicules et/ou d'ulcérations cryptiques confluentes péri-anales sur muqueuse hyperémiée, des adénopathies inguinales bilatérales et un écoulement anal. La symptomatologie est bruyante, elle entraîne localement de la douleur, des prurits, des ténésmes et une dysurie. Au niveau général, de la fièvre, des frissons ainsi que des malaises. La résolution se fait en une à trois semaines mais il y a un risque de surinfection bactérienne. ^{1,16,17}

d) Encéphalite herpétique

L'*Herpes simplex* virus est la première cause d'encéphalites dans les régions tempérées¹⁷ représentant 21% des encéphalites infectieuses en France.²⁶ Elle peut survenir à tout âge et est causée dans 95% des cas par l'HSV 1 (en dehors des cas d'herpès néonatal)¹⁷. Elle peut survenir lors de la primo infection (principalement chez l'enfant) ou bien d'une récurrence (principalement chez l'adulte). Elle doit être évoquée systématiquement devant toute encéphalite aiguë associée à une méningite lymphocytaire.¹⁷

Le virus entraîne une atteinte directe de la substance grise par l'infection des neurones et des cellules gliales qui a pour conséquence une encéphalite aiguë nécrosante temporale.

Les premiers symptômes apparaissent rapidement (en moins de 48h) et s'accompagnent de fièvre et de céphalées. On retrouve des troubles phasiques, du caractère, de la mémoire, du comportement ainsi que des hallucinations auditives ou visuelles rare mais évocatrices. Lors de la phase d'état l'obnubilation pouvant aller jusqu'au coma, des hémipariés et des crises convulsives peuvent être observées. ^{1,16,17}

L'évolution spontanée se traduit par une létalité de 80% et des séquelles très graves pour les patients survivants. La précocité du traitement conditionne le pronostic, elle permet de diminuer la mortalité ainsi que le risque de séquelles. ^{1,16,17}

Cas particulier de l'encéphalite herpétique avec accident vasculaire cérébral :

➤ Encéphalite herpétique mimant un AVC

C'est une manifestation rare décrite dans la littérature chez des patients âgés de plus de 60 ans possédant des facteurs de risques cardiovasculaires. Une imagerie caractéristique de l'AVC ainsi que la présence du génome de l'HSV1 ont été mis en évidence dans le LCR pour chacun des cas. ²⁷⁻²⁹

➤ AVC comme complication d'une encéphalite herpétique

Des études dans la littérature montrent que des AVC ischémiques ou hémorragiques peuvent survenir au décours d'une encéphalite herpétique. ^{30,31}

e) Infection herpétique in utéro

L'infection in utéro est rare, sa prévalence est estimée à 1 sur 300 000 naissances aux Etats Unis. Elle peut s'observer lors de la primo infection maternelle ou lors de récurrences. Dans ce deuxième cas les risques associés sont plus faibles. Avant la 28^{ème} semaine d'aménorrhée elle peut entraîner des fausses couches voir des embryopathies ou fœtopathies. A la naissance, à un possible retard de croissance intra utérin s'ajoute une triade caractéristique comprenant des lésions cutanées (lésions actives ou cicatrisées, hyper ou hypo pigmentation), neurologiques (microcéphalie, calcification intracrânienne, hydrocéphalie) et oculaires (choriorétinites, microphthalmie, atrophie optique). ^{1,3,16,17}

f) Herpès néonatal

L'herpès néonatal représente 1 à 3 nouveaux nés pour 100 000 naissances en France soit 20 cas annuels.³² En principe le nouveau-né s'infecte par contact direct avec la muqueuse du tractus génital lors de l'accouchement, bien qu'une contamination post natale reste possible. Cela se produit en cas de lésion herpétique chez la mère mais également lors d'une excrétion virale asymptomatique. Certains facteurs sont favorisants comme la prématurité, la rupture prolongée de la poche des eaux (plus de 6h), les blessures du scalp (par des électrodes, forceps), des lésions cervico-vaginales d'herpès importantes. Du fait de l'augmentation de la proportion d'HSV 1 lors d'herpès génital, l'herpès néonatal est maintenant causé majoritairement par l'HSV1. ^{1,16,17}

En cas d'herpès génital, le risque de transmission de l'HSV au nouveau-né s'élève à 30 à 50% chez une femme ayant une primo infection à proximité du terme et est inférieure à 1% chez une femme ayant des antécédents de récurrences ou présentant une primo infection pendant la première partie de la grossesse.³³ Dans 60 à 80% des cas de transmission verticale on ne retrouve pas d'antécédent d'herpès génital au niveau maternel.³

Chez les femmes enceintes ayant des antécédents d'herpès génitaux, 75% d'entre elle feront au moins une réactivation pendant la grossesse. En cas de séronégativité pour l'HSV 1 et 2, la femme enceinte possède 4% de risque d'acquérir un des deux *Herpes simplex virus* ; si la femme enceinte possède des anticorps anti-HSV 1, elle aura alors 2% de chance d'acquérir l'HSV 2 au cours de sa grossesse.³

Lors de primo infection chez la mère, l'absence d'anticorps maternel entraîne un risque d'infection néonatal herpétique grave s'élevant à 50-80%. En cas de récurrence, la présence d'anticorps maternel explique des formes bénignes dans la plupart des cas.¹⁷

L'herpès néonatal peut se présenter sous trois formes : les formes cutanéomuqueuses et disséminées qui apparaissent entre le 9^{ème} et 11^{ème} jours de vie et la forme touchant uniquement le système nerveux central qui apparait entre le 16^{ème} et le 17^{ème} jours de vie.³

La forme cutanéomuqueuse, représentant 45% des herpès néonataux, entraîne des lésions uniquement oculaires (kératites), buccales et cutanées. La forme touchant uniquement le système nerveux central (méningo-encéphalite) représente 30% des herpès néonataux et n'entraîne aucune lésion organique. Elle peut cependant provoquer des lésions cutanéomuqueuses. La forme disséminée se présente comme un sepsis grave. Elle représente 25% des herpès néonataux et touche de multiples organes : foie (hépatite nécrosante cytolytique), poumons (pneumopathie interstitielle grave), tractus gastro-intestinal (entéocolite nécrosante, œsophagite) ; Elle peut également entraîner une atteinte du système nerveux central (encéphalites) dans deux tiers des cas et des lésions cutanéomuqueuses.^{1,3,16,17}

La forme disséminée entraîne une mortalité de 85% à 1 an tandis que la forme touchant uniquement le système nerveux central entraîne une mortalité de 50%. La forme neurologique entraîne néanmoins plus de séquelles en cas de survie. En effet, après celle-ci un développement neurologique normal est possible seulement dans 33% des cas contre 50% lors de la forme disséminée.³

g) Autres

Certaines manifestations sont rarement observées, on peut citer :

- Le panaris herpétique qui est retrouvé sur la main dominante et se présente avec un aspect vésiculeux.
- L'angine herpétique
- La pustulose varioliforme de Kaposi-Juliusberg se présentant comme un herpès diffus survenant sur des lésions d'eczéma. Cette forme est grave, avec un risque de déshydratation, de choc, de surinfection ainsi que de bactériémie^{1,16,17}

h) Formes chez l'immunodéprimé

Chez l'immunodéprimé les récurrences peuvent se traduire par des atteintes cutanéomuqueuses extensives et prolongées telles que des ulcérations buccales, nasales, génitales, périnéales, œsophagiennes ou trachéales. Il existe un risque de dissémination viscérale (par exemple une pneumonie interstitielle), d'hépatite et de surinfection bactérienne. ^{1,16,17}

i) Fréquence des différentes localisations

Les résultats de deux études sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Manifestations	France ³⁴ (15 laboratoires de virologie) : 2405 patients présentant une infection à l'HSV1		Pays Bas ³⁵ : 496 patients présentant une infection à HSV	
	1237 immunocompétents	1168 immunodéprimés	368 Immunocompétents	496 immunodéprimés
Hautes (oculaires, cutanées, buccales, labiales, infections pulmonaires hautes et basses)	67%	82%	45,1%	52%
Basses (anales, génitales, cutanées)	24%	5%	36%	24%
Hautes + basses	2%	2%		
Systémiques	4%	6%		
Autres	3%	5%	18,9%	

Tableau 1 : Localisations des manifestations herpétiques

5. Diagnostic microbiologique

a) Diagnostic indirect

Le diagnostic indirect se fait sur prélèvement de sérum (tube sec) et permet de mettre en évidence des anticorps anti-HSV dans le sérum du patient.

La sérologie, utilisée dans la plupart des cas à visée épidémiologique, n'a pas d'intérêt pour le diagnostic des récurrences. Cependant elle permet de différencier les primo infections des récurrences, ce qui est parfois important car le pronostic peut être différent (par exemple dans le cas de la femme enceinte). La primo infection peut être mise en évidence par la présence d'IgM anti HSV1 (apparaissant entre J5 et J7) ainsi que d'une séroconversion des IgG (les IgG ne sont pas encore présents au stade précoce des lésions). Cependant la présence d'IgM seule ne signe pas toujours une primo-infection puisqu'ils peuvent réapparaître lors de réactivations.^{16,17}

Les IgG peuvent être également dosés dans le LCR et l'humeur aqueuse, ce qui permet de comparer le titre dans le sérum et dans ces prélèvements et d'apporter la preuve d'une production intra-thécale ou intra oculaire d'IgG.¹⁷

- Technique ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay)

C'est une technique combinée permettant la mise en évidence d'anticorps anti HSV 1 et 2. Des puits sont recouverts d'antigènes d'HSV 1 et 2 où est introduit le sérum testé qui apporte les anticorps recherchés s'ils sont présents. Après lavage on ajoute des anticorps anti IgM ou IgG humain (selon le type recherché) couplés à une enzyme. Le substrat de l'enzyme est ensuite introduit dans les puits et la réaction entraîne la formation d'un produit coloré. L'absorbance finale mesurée est proportionnelle à la quantité d'anticorps présente dans le sérum initial. Il faut noter qu'il existe un risque de réactions croisées lors de la détection des IgM en cas d'infection aiguë à *Leptospira*^{36,37}

Une fois le dépistage effectué par technique combinée il est possible d'avoir recourt à des tests ELISA permettant de différencier les anticorps anti HSV 1 et 2.

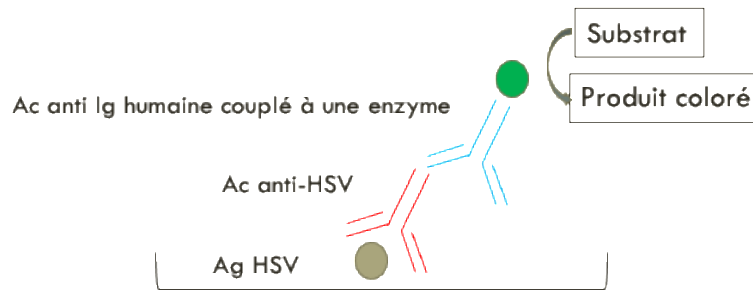


Figure 3 : Technique ELISA

- Western blot

Le western blot permet de mettre en évidence des anticorps présents dans un sérum. Dans un premier temps on fait une séparation de protéines d'intérêt en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel (SDS-PAGE = sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis) qu'on transfère ensuite sur une membrane PVDF (polyvinylidene fluoride). Pour finir on applique des anticorps spécifiques (se trouvant dans le sérum du patient) aux protéines sur la membrane afin d'observer la position de ces protéines. L'apparition de bandes montre une réaction antigène/anticorps et permet de mettre en évidence la présence d'anticorps spécifiques.³⁸

b) Diagnostic direct

Il repose sur la mise en évidence du virus directement dans les échantillons prélevés au site de l'infection. Il peut se faire sur échantillon sanguin (prélèvement veineux sur tube EDTA), sur liquide céphalorachidien (ponction lombaire), sur humeur aqueuse ainsi que sur écouvillons cutanéomuqueux (écouvillonnage des lésions/vésicules/ulcérations puis déchargement de l'écouvillon dans le milieu de transport).^{16,17}

- Immunofluorescence

L'immunofluorescence permet de mettre en évidence le virus sur une suspension de cellules provenant du prélèvement étalé sur lame. Le frottis une fois séché et fixé à l'acétone est recouvert d'anticorps monoclonaux anti-HSV et incubé trente minutes à 37°C dans une chambre humide. Après lavage une deuxième étape consiste à le recouvrir d'anticorps murins

couplés à la fluorescéine. Après une nouvelle incubation de trente minutes, lavage et séchage, les lames peuvent être observées au microscope. Les cellules infectées par l'HSV sont alors fluorescentes. Des contrôles positifs (cellules infectées par l'HSV) et négatifs (cellules non infectées par l'HSV) doivent être effectués en parallèle.^{39,40}

- Real-time Polymerase chain reaction (rt-PCR)

La polymerase chain reaction est une méthode de biologie moléculaire très sensible et très spécifique¹⁶ qui permet de mettre en évidence l'ADN du virus dans les prélèvements. C'est la technique de référence devant un prélèvement de LCR, d'humeur aqueuse, de sang et de sérum.¹⁷

Elle ne permet pas de recueillir d'information sur le pouvoir infectieux surtout en cas de faible quantité d'ADN détectée sur un prélèvement muqueux sans lésions visibles (excrétion asymptomatique). La détection d'ADN d'HSV dans un le LCR, quel que soit la charge virale, signe une invasion neuroméningée. La détection d'ADN d'HSV dans le sérum signe une primo infection symptomatique ou une infection systémique (hépatite, pneumonie)¹⁷

Cette technique permet d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique (ADN ou ARN) afin d'obtenir une quantité suffisante nécessaire pour le détecter et l'étudier. Une étape préliminaire d'extraction de l'ADN à partir des échantillons est requise. La PCR consiste en une série de cycles d'amplification à l'aide d'un thermocycler. Dans le cas de l'*herpes simplex virus*, l'acide nucléique à amplifier est l'ADN. Dans un premier temps, une dénaturation de l'ADN a lieu à 94°C permettant la séparation du double brin en deux simples brins. Ensuite, l'hybridation des amorces sur ces simples brins d'ADN se fera à 55°C. Cette température permet d'augmenter la spécificité des amorces pour la cible et de diminuer la spécificité pour des morceaux d'autres acides nucléiques qui seraient présents dans l'échantillon. Deux amorces spécifiques (de 10 à 20 paires de bases) de la région à amplifier sont alors hybridées, ce sont les amorces sens et antisens. Pour finir, l'étape de polymérisation du brin complémentaire se fera à 72°C grâce à la Taq polymérase (ADN polymérase d'origine bactérienne) qui fonctionne toujours dans le sens 5' vers 3'. Ce cycle est répété 30 à 40 fois.⁴¹⁻

43

La PCR en temps réel utilise un colorant se liant à l'ADN double brin de façon spécifique. Ce colorant détecté par fluorescence s'accumule au fur et à mesure des cycles de PCR.⁴⁴ Une

courbe de fluorescence est alors établie où on observe un décrochage au moment où l'ADN commence à être détectable. Celui-ci correspond à un nombre de cycle à partir duquel l'ADN est détectable (Ct). Plus l'ADN est détectable tôt, plus la quantité d'ADN présente dans l'échantillon était importante. ⁴⁵

Dans le cas de l'*herpes simplex virus* il est possible de rechercher la présence du genre *herpes simplex virus* mais aussi de typer l'espèce HSV 1 ou 2. Des PCR multiplex ont été développées permettant de rechercher un panel de microorganismes en cas de diagnostic syndromique.¹⁶

- Culture cellulaire

La culture cellulaire se fait sur écouvillon cutanéomuqueux. Elle est facile et rapide (1 à 2 jours) si la charge virale des lésions est élevée. Elle permet de diagnostiquer une infection à HSV grâce à son effet cytopathogène caractéristique (après inoculation d'une monocouche cellulaire et mise en culture⁴⁶) puis le typage par des anticorps monoclonaux spécifiques permet de déterminer l'espèce. Cette technique n'est plus utilisée en routine mais reste indispensable pour les études de sensibilité.¹⁷

c) Particularités diagnostics de certaines formes cliniques

- Encéphalite herpétique

Lors d'une encéphalite herpétique le liquide céphalorachidien montrera une glycorachie normale (en regard de la glycémie périphérique), une protéinorachie moyennement élevée ainsi qu'une pléiocytose à prédominance lymphocytaire.¹⁶

Il est possible d'avoir des résultats de PCR faussement négatifs si la ponction lombaire a été faite de manière trop précoce par rapport au début des signes cliniques. Le LCR sera alors paucicellulaire (<10 éléments / mm³) ou acellulaire. Si la suspicion clinique est forte, il faut répéter la ponction lombaire à 48 ou 72h malgré le traitement antiviral. En cas de difficulté du diagnostic une recherche de production intrathécale d'IgG peut être effectuée sur un LCR prélevé tardivement (15 jours après le début des symptômes). Au décours d'une encéphalite herpétique la production intrathécale est constante et persiste des mois voire des années ce qui permet un diagnostic rétrospectif de certitude.¹⁷

- Gingivostomatite aiguë ou infection génitale aiguë

Des PCR doivent être réalisées à partir d'écouvillons des vésicules et ulcérations sur peau et muqueuses. Dans le cas de gingivostomatites aiguës ou d'infections génitales aiguës, il est classique de retrouver une virémie (ADN détectable dans le sang ou le sérum)¹⁷

- Infections oculaires

Lors d'une kérato-conjonctivite herpétique la PCR se réalise sur le milieu de transport de l'écouvillon alors qu'en cas de rétinite herpétique on utilisera l'humeur aqueuse dans laquelle la charge virale sera très élevée.¹⁷

- Herpès néonatal

Chez un nouveau-né de maman porteuse de lésions génitales herpétiques, des PCR doivent être effectuées sur écouvillons nasopharyngés, de la muqueuse oculaire ainsi que des lésions cutanées évocatrices. Le bilan d'extension comporte une PCR sur sérum et sur LCR. Devant un sepsis inexplicé et une atteinte hépatique il est recommandé de rechercher une virémie de façon systématique.¹⁷

Lors de l'accouchement, s'il y a un doute concernant une lésion, il est recommandé d'effectuer des prélèvements du col, du vagin et de la vulve.¹⁷

6. Traitement

a) Molécules disponibles

L'ADN polymérase virale est la cible commune de toutes les molécules disponibles.^{16,47} Elles sont donc virostatiques, actives uniquement sur le virus en réplication et n'ont pas d'effet sur le virus latent.^{48,49}

- Aciclovir (ACV), penciclovir (PCV), valaciclovir (VACV), famciclovir (FCV)

L'**aciclovir** (9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine) et le **penciclovir** (9-(4-hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl) guanine) sont des analogues de la deoxyguanosine. Afin d'être actifs

ils doivent, après pénétration intracellulaire, être phosphorylés en aciclovir/penciclovir mono phosphate par une kinase virale puis en aciclovir/penciclovir tri phosphate par deux kinases cellulaires, la GMP kinase puis la nucleoside diphosphate kinase. Les analogues de la deoxyguanosine une fois triphosphorylés agissent comme inhibiteurs compétitifs de l'ADN polymérase virale en entrant en compétition avec des deoxynucléotides triphosphate (dNTPs) lors de leur incorporation à l'ADN virale au moment de la réplication. L'aciclovir tri phosphate agit également comme terminateur de chaîne.^{15,16,47,50}

La biodisponibilité de l'aciclovir par voie orale étant de 15 à 35%, sa prodrogue, le **valaciclovir** (ester L-valyl de l'aciclovir), permet d'augmenter la biodisponibilité par voie orale à 54%. Le valaciclovir est totalement transformé en aciclovir et en L-valine lors du premier passage hépatique.^{16,47}

La biodisponibilité du penciclovir par voie orale étant insuffisante, sa prodrogue, le **famciclovir** (diacétyléster du 6-deoxypenciclovir) est toujours utilisé et permet d'obtenir une biodisponibilité par voie orale de 77%.^{16,47}

Ces molécules étant éliminées par voie rénale, leur utilisation nécessite une adaptation posologique en cas d'insuffisance rénale modérée à sévère.^{33,51}

Concernant le spectre d'action ces molécules sont actives sur l'HSV 1, l'HSV 2 et le VZV. Le famciclovir possède également une activité limitée contre le CMV et l'EBV.¹⁶

- Ganciclovir et Valganciclovir

Le **ganciclovir**, analogue nucléosidique, est transformé en ganciclovir triphosphate au niveau intracellulaire et bloque la synthèse de d'ADN viral en s'incorporant à l'ADN.^{16,47} Sa biodisponibilité par voie orale étant insuffisante il est administré soit par voie intraveineuse soit par voie orale à travers sa prodrogue le valganciclovir.^{16,47} Il est actif sur le CMV (molécule de référence) et l'HSV ainsi que sur le VZV et l'EBV à moindre degré. Il permet ainsi d'être utilisé en cas de co-infection CMV et HSV.^{16,52} Il est également utilisé pour traiter les kératites herpétiques grâce à sa forme topique⁵³⁻⁵⁵

- Foscarnet

Le **foscarnet** (phosphonoformic acid), analogue du pyrophosphate, inhibe de manière spécifique et non compétitive l'ADN polymérase virale par analogie de structure avec le pyrophosphate. Il se lie au site de liaison de ce dernier sur l'ADN polymérase virale et empêche sa libération depuis le nucléoside triphosphate terminal ajouté sur la chaîne d'ADN en élongation. Le foscarnet ne nécessite aucune phosphorylation pour être actif. Du fait de sa biodisponibilité trop faible il n'existe que sous forme injectable. Il est actif sur le CMV, l'HSV et le VZV et peut être utilisé en cas de résistance à l'aciclovir.^{15,16,47,49}

- Cidofovir

Le **cidofovir**, analogue acyclique monophosphorylé nucléotidique de la cytidine, nécessite pour devenir actif, d'être phosphorylé par deux kinases cellulaires, ce qui rend donc son activation totalement indépendante du virus. Il agit comme inhibiteur compétitif de l'ADN polymérase virale ainsi que comme terminateur de chaîne. Il est administré sous forme injectable et la demi vie longue de ses métabolites permet d'espacer les doses d'une à deux semaines. Il est actif sur le CMV ainsi que l'HSV.^{15,16,47,49,56}

- Brivudine

La **brivudine** est un analogue nucléosidique de la deoxythymidine qui interfère avec la réplication de l'ADN viral en inhibant la deoxythymidine dehydrogenase. Elle est phosphorylée consécutivement par la thymidine kinase virale, par la thymidylate kinase virale et pour finir par une kinase cellulaire pour être ensuite incorporée à l'ADN viral par l'ADN polymérase virale. Cette molécule est active sur HSV 1 et 2, le VZV et le CMV mais n'est pas commercialisée en France.⁵⁷

- Pritelivir et Amenamevir

Le **pritelivir** et l'**amenamevir**, développés récemment, sont des inhibiteurs de l'hélicase primase. Cette enzyme est nécessaire à la séparation de l'ADN bicaténaire en deux brins monocaténaires qui est une étape préliminaire de la réplication de l'ADN. Ils sont actifs sur l'HSV et le VZV et indiqués dans le traitement de l'herpès génital.⁵⁸

b) Formes galéniques disponibles

Aciclovir	Valaciclovir	Famciclovir	Ganciclovir	Valganciclovir	Foscarnet	Cidofovir
- Crème - Comprimé - Suspension buvable	- Comprimé	- Comprimé (500 mg)	- Lyophilisat - Gel ophtalmique - Implant ophtalmique	- Comprimé	- Soluté injectable (6g/250 ml)	- Solution (75mg/ml ; 5 ml)

Tableau 2 : Formes galéniques disponibles^{49,51,59}

c) Paramètres pharmacocinétiques

	BD VO	Fixation aux protéines plasmatiques	Distribution	Métabolisme	Demi-vie d'élimination	Élimination
ACV	15-30%	9-22%		Hépatique (léger)	3h	Rénale
VACV	54%	15%		Intestinal, hépatique (léger)	3h	
FCV	77%	<20%		Aucun	2,3h	
GCV	Pas de VO	1-2%		Non décrit	3h	
VGCV	60%		Faible (Vd : 0,68L/kg)	Intestinal	4,1h	
FOS	Pas de VO	<20%	Fixation osseuse importante Vd : 5L/kg Demi-vie de distribution : 2-4h	Aucun	80h	
CDV	Pas de VO	≤10%		Aucun	5-6h	

Tableau 3 : Paramètre pharmacocinétiques^{16,49}

d) Stratégies thérapeutiques

Le traitement est différent en cas de primo infection ou une réactivation, de la sévérité des symptômes, du site de l'infection (muqueuse ou disséminée), de la fréquence des récurrences ainsi que de l'immunodépression.

- Indications

Les formes orales de l'Aciclovir, du valaciclovir et du famciclovir sont utilisées en cas de primo-infections et récurrences herpétiques (en particulier génitales) dans le cadre d'un traitement de courte durée ainsi que lors de la prophylaxie des récurrences génitales ou des infections à HSV chez l'immunodéprimé dans le cadre d'un traitement de longue durée.^{15,47}

Les formes intraveineuses de l'aciclovir, du valaciclovir et du famciclovir sont utilisées en cas d'infections sévères (encéphalites et herpès néonatal) ou lors d'infections chez l'immunodéprimé. ^{15,47}

Les formes topiques de l'aciclovir, du penciclovir et du ganciclovir sont utilisées en cas de récurrences d'herpès labial et de kératite.^{15,47}

- Herpès oral

- Primo infection

En cas de primo infection symptomatique (gingivostomatite et pharyngite) une thérapie antivirale doit être mise en place dans les 72h après l'apparition des symptômes. Une mise sous traitement précoce permet une guérison des lésions plus rapide, une diminution de la douleur et de la durée de la fièvre. Si le délai est dépassé mais que le patient présente de nouvelles lésions et/ou des douleurs, une mise sous traitement antiviral est toujours possible. La thérapie antivirale peut se faire par voie orale via l'aciclovir (200 mg 5 fois par jour à partir de l'âge de 2 ans, disponible en suspension buvable et en comprimés), famciclovir (500 mg 2 fois par jour) ou le valaciclovir (1000 mg 2 fois par jour) pendant 7 à 10 jours. La durée du traitement étant dépendante de la sévérité des symptômes ainsi que de la réponse aux traitements, celle-ci peut être prolongée en cas de lésions non guéries ou de progression de lésions sèches après dix jours. Si le patient présente une sévère odynophagie il peut nécessiter une hospitalisation afin d'administrer l'aciclovir par voie IV (5 mg/kg toutes les 8 heures) ainsi que des fluides pour réhydratation, un switch se fera ensuite par voie orale quand le patient sera capable d'avaler.^{21,22,60}

- Récurrences

Chez l'immunocompétent la stratégie thérapeutique doit être adaptée au cas par cas en prenant en compte la sévérité des symptômes, la fréquence des récurrences, la présence d'un prodrome bien défini, les préférences du patient ainsi que le coût du traitement.⁶¹

Il existe trois possibilités : l'abstention thérapeutique, un traitement épisodique des récurrences ou bien un traitement chronique.

En cas de récurrences avec symptômes minimes, un traitement antiviral n'est pas nécessaire. En cas d'inconfort il est possible d'administrer des analgésiques topiques (par exemple un bain de bouche à la lidocaïne ou de la benzocaïne topique).

En cas de récurrences plus sévères, particulièrement celles avec un prodrome bien identifié, il est recommandé de mettre en place un traitement antiviral au moment du prodrome pour diminuer la durée de la récurrence.⁶² Pour cela le patient devrait avoir une prescription à l'avance pour une mise en place du traitement précoce lors de l'apparition des symptômes. Un traitement précoce (dans les 48 heures) est important étant donné l'apparition très rapide des vésicules après le prodrome et la diminution rapide de l'excrétion virale lors des réactivations. Ce traitement épisodique se fait par voie orale avec de l'aciclovir (400 mg trois fois par jour pendant 5 jours), du famciclovir (750 mg deux fois par jour pendant un jour ou dose unique de 1500 mg) ou valaciclovir (2000 mg deux fois par jour pendant 1 jour).⁶³

En cas de récurrences fréquentes (particulièrement celles qui ne présentent pas de prodrome), douloureuses, de lésions défigurantes ou de complications sérieuses (par exemple érythème multiforme) un traitement chronique est recommandé. Ce traitement se fait par administration par voie orale d'aciclovir (400 mg deux fois par jour) ou valaciclovir (500 mg une fois par jour). La nécessité de ce traitement doit être évaluée annuellement et le patient doit être informé du risque de réactivation à l'arrêt du traitement.⁶⁴⁻⁷¹

Si un facteur déclencheur de récurrence a été identifié il est important de le prendre en compte dans la prophylaxie de celles-ci.

L'exposition au soleil (UV) peut conduire à des réactivations.^{72,73} Dans ce cas il est recommandé l'éviter et d'utiliser une crème solaire adaptée.⁷⁴

Les interventions chirurgicales peuvent être à l'origine de réactivations comme lors de la décompression des racines du nerf trijumeau (dans la névralgie des trijumeaux). Il est alors recommandé d'administrer par voie orale de l'aciclovir 400 mg deux fois par jour pendant 5 jours en commençant la nuit précédant l'intervention.⁷⁵⁻⁷⁸

Le resurfaçage cutané au laser ou par dermabrasion peut entraîner des réactivations. Il est recommandé d'administrer par voie orale du valaciclovir 500 mg deux fois par jour pendant 14 jours en commençant la veille ou le jour de l'intervention.⁷⁹⁻⁸¹ Dans le cas d'utilisation du

laser le famciclovir peut être utilisé par voie orale à la dose de 250 mg deux fois par jour ou chez des patients avec des antécédents importants d'infection à HSV, 500 mg deux fois par jour, le traitement doit être débuté la veille et durer 5 à 10 jours après l'intervention.^{82,83}

Des cas de réactivations ont été rapportés lors d'extractions dentaires mais il n'est pas recommandé de faire une prophylaxie antivirale dans cette situation.^{84,85}

- Infection disséminée ou herpès viscéral

Lors d'une infection disséminée ou d'une atteinte viscérale (par exemple hépatique) il est recommandé d'administrer par voie IV de l'aciclovir 5 mg/kg toute les 8 heures. La durée de traitement doit être évaluée en fonction de la réponse clinique, la normalisation des enzymes hépatiques lors d'une hépatite herpétique ainsi que la diminution de la charge virale.⁸⁶

- Infections sévères : infections disséminées, pneumopathies, hépatites, méningo-encéphalites

Un traitement par voie intraveineuse est recommandé en cas d'infections sévères ou de complications nécessitant une hospitalisation. Le traitement de première intention est l'aciclovir IV 5-10 mg/kg pendant 2 à 7 jours puis un relai par voie orale quand l'état clinique le permet pour compléter la durée de traitement à 10 jours. L'encéphalite et la méningo-encéphalite herpétique nécessite 10 mg/kg d'aciclovir IV pendant 14 à 21 jours de thérapie intraveineuse^{33,87}

- Herpès génital

La primo infection génitale expose à des risques de lésions sévères et d'atteintes neurologiques. Il est donc recommandé de traiter tous les patients ayant une primo infection symptomatique. Le traitement se fait par voie orale via l'aciclovir (400 mg 3 fois par jour ou 200 mg 5 fois par jour), le valaciclovir (1000 mg deux fois par jour) ou le famciclovir (250 mg 3 fois par jour) pendant 7 à 10 jours. Le traitement peut être rallongé en cas de guérison incomplète au bout de 10 jours.³³

Le traitement des récurrences génitales nécessite une mise en route dans les 24 heures suivant l'apparition des lésions ou au moment du prodrome. Le patient devrait pour cela avoir une prescription médicale à utiliser si besoin. Le traitement se fait par voie orale via l'aciclovir (400 mg 3 fois par jour ou 800 mg deux fois par jour pendant 5 jours, 800 mg 3 fois par jour pendant 2 jours), valaciclovir (500 mg 2 fois par jour pendant 3 jours, 1000 mg une fois par jour pendant 5 jours), famciclovir (125 mg deux fois par jour pendant 5 jours, 1000 mg 2 fois par jour pendant 1 jour, 500 mg une fois puis 250 mg 2 fois par jour pendant 2 jours) ³³

En cas de récurrence fréquente, un traitement chronique permet de réduire leur fréquence de 70 à 80%. Ce traitement se fait par voie orale via l'aciclovir (400 mg deux fois par jour), valaciclovir (500 mg une fois par jour ou 1000 mg une fois par jour) ou famciclovir (250 mg deux fois par jour). Le traitement par valaciclovir 500 mg est moins efficace chez des patients avec des récurrences très fréquentes, c'est-à-dire au moins 10 par an.³³

- Herpès génital pendant la grossesse

Le traitement des infections sévères chez la femme enceinte est identique aux autres patients.³³

Un traitement prophylactique tard pendant la grossesse permet de réduire la fréquence des récurrences génitales au moment du terme et ainsi limiter le nombre de césariennes. Celui-ci consiste à administrer par voie orale de l'aciclovir (400 mg 3 fois par jour) ou du valaciclovir (500 mg deux fois par jour)³³

Le traitement de ces récurrences génitales ne permet cependant pas de protéger entièrement l'enfant d'une éventuelle transmission³³

- Herpès néonatal

Il est recommandé d'administrer de l'aciclovir aux nouveaux nés dont les mamans se sont infectées avec l'HSV à proximité du terme. Les nouveaux nés exposés à l'HSV au moment de la naissance doivent être suivis par PCR sur muqueuses pour détecter la présence d'HSV avant le développement de signes cliniques permettant de mettre en place un traitement précoce. Si le nouveau-né présente un herpès néonatal, le traitement consiste à administrer de l'aciclovir 20 mg/kg par voie IV toutes les 8h pendant 14 jours si la maladie est limitée à des

signes cutanéomuqueux ou pendant 21 jours si l'infection est disséminée ou atteint le système nerveux central. ^{33,87,88}

- Kératite herpétique

Le traitement des kératites herpétiques nécessite l'association de collyre antiviral (ganciclovir 0,15% en gel ou aciclovir 3% en pommade) 5 fois par jour pendant 2 à 3 semaines. Un collyre anti inflammatoire stéroïdien doit être prescrit en cas d'inflammation de la cornée. Un traitement systémique (aciclovir VO 400 mg 2 fois par jour) n'est nécessaire qu'en cas de kératite sévère ou de récurrences fréquentes. Dans le cas où le patient a un antécédent de kératoplastie, il est nécessaire d'instaurer un traitement prophylactique par aciclovir 400 mg 2 fois par jour pendant au moins 1 an.⁵³⁻⁵⁵ Dans certains cas du ganciclovir en intra-vitréen peut être utilisé.⁸⁹

II. Résistances aux traitements

Les résistances de l'HSV 1 à l'aciclovir ont été décrites principalement dans des populations immunodéprimées, soit au cours d'une infection au VIH, soit suite à une greffe de cellules souches hématopoïétiques ou à une transplantation d'organes solides.^{50,90}

La résistance de l'*Herpes simplex virus* aux antiviraux se produit lors de l'émergence d'un mutant préexistant sélectionné par le traitement antiviral.^{2,48} Le délai d'apparition des résistances lors de traitements antiviraux peut être très court (7 à 10 jours) chez le nouveau-né ayant une infection à HSV^{91,92} mais la médiane est de 40 jours chez les patients greffés de cellules souches hématopoïétiques.⁹³

Une résistance aux antiviraux doit être suspectée dans trois situations : lors de la persistance des lésions sans diminution de taille malgré 7 à 10 jours après l'induction d'un traitement antiviral, lors d'une aggravation de l'état ou des lésions sous traitement bien conduit ou pour finir, lors d'une apparence atypique des lésions ou de l'émergence de lésions satellites.^{15,47}

1. Éliminer une fausse résistance

Le défaut d'observance est la première cause à laquelle il convient de penser en cas d'échec de tout traitement pharmacologique.

Une mauvaise exposition à la molécule antivirale peut également expliquer un échec pharmacologique. En routine, les antiviraux ne nécessitent pas de suivi pharmacologique.⁴⁹ Cependant, il existe pour l'aciclovir une forte variabilité inter et intra individuelle de la biodisponibilité (n'existant pas en cas d'utilisation du valaciclovir),⁴⁸ dépendante du tissu ou du liquide biologique cible (cf infra). Lors d'un échec de traitement, il peut être donc nécessaire d'effectuer des dosages pharmacologiques sanguins ou dans le liquide céphalo-rachidien afin d'évaluer l'exposition à la molécule antivirale au niveau du site d'infection. L'IC50 de l'aciclovir étant de 0,29 µg/mL⁹⁴, la concentration sanguine et dans le LCR doit toujours être supérieure à celle-ci. La concentration résiduelle attendue pour une efficacité de la molécule est comprise entre 1 et 2 µg/mL dans le sang⁹⁵ et est de 1 µg/mL dans le LCR.⁹⁶ Les concentrations au pic et résiduelles observées et détaillées dans le tableau suivant sont différentes en fonction des posologies.

Posologie	Concentration au pic	Concentration résiduelle
5 mg/kg	7,5 µg/mL	1,3 µg/mL
10 mg/kg	15,3 µg/mL	2,5 µg/mL
15 mg/kg	21,5 µg/mL	3,4 µg/mL

Tableau 4 : Concentrations observées habituellement à différentes posologies⁹⁷

La biodisponibilité détaillée dans le tableau suivant est variable selon les tissus.

Tissus et liquides biologiques	% de la concentration sanguine
Salive	13%
Larmes	18%
Humeur aqueuse	30-50%
Sécrétions vaginales	Variables
SNC (cerveau et moelle épinière), LCR	25-70%

Tableau 5 : Biodisponibilité de l'aciclovir en fonction des tissus et liquides biologiques^{51,96,98}

La concentration du foscarnet au niveau du LCR représente 10 à 70% de la concentration plasmatique.¹⁶

Le traitement des récurrences doit être débuté dès l'apparition du prodrome si possible car une mise sous traitement tardive peut être à l'origine d'une pseudo résistance.⁴⁸

Un défaut de phosphorylation cellulaire peut expliquer un échec pharmacologique étant donné que les deux dernières phosphorylations nécessaires à l'activation se font à l'aide de kinases cellulaires.⁴⁸

Des phénomènes immunopathologiques peuvent entraîner une pseudo résistance. En effet la kératite stromale disciforme est la conséquence de réactions immunitaires cellulaires et humorales immunoprécipitant avec un antigène opacifiant la cornée.⁴⁸

2. Prévalence des résistances

La prévalence des résistances aux antiviraux varie en fonction de la population étudiée. Le degré d'immunodépression de même que l'utilisation prolongée de l'aciclovir sont des facteurs favorisants.⁵⁰

Différents arguments peuvent expliquer une prévalence supérieure des résistances chez le patient immunodéprimé. En effet, la réponse de l'hôte étant diminuée, cela entraîne une réplication virale prolongée et une tendance à la persistance. Les virus résistants, bien que moins pathogènes (cf infra), sont capables de produire des manifestations chez ces patients.¹⁵ De plus, la prophylaxie prolongée par l'ACV, le VACV ou le FCV peuvent entraîner le développement de résistances, spécialement chez les patients immunodéprimés.⁵⁰

Ainsi chez le patient immunocompétent la résistance aux traitements antiviraux représente 0,1 à 0,7% des isolats d'HSV^{15,34,35,47,48,99}, elle peut s'élever à 4,5% lors de traitements prophylactiques prolongés de l'herpès génital.⁴⁸ Chez l'immunodéprimé la prévalence des résistances aux traitements est fonction du type d'immunodépression. Celle-ci est comprise entre 4,1 et 11% des infections chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques mais peut s'élever jusqu'à 36%. Elle est comprise entre 2,5 et 10% des infections chez les transplantés d'organes et entre 3,5 et 7% des infections chez le patients atteint du VIH.^{15,34,35,99,100}

Une étude réalisée en France montre que parmi les patients greffés de cellules souches hématopoïétiques ayant une infection à HSV résistante aux antiviraux, 100% d'entre eux avaient reçu une greffe allogénique. Aucune résistance aux antiviraux n'a été retrouvée chez les patients ayant reçu une greffe autologue.¹⁰¹

L'augmentation du nombre d'infections chroniques ou de récurrences chez les patients immunodéprimés nécessitant une augmentation des traitements antiviraux entraîne une incidence plus importante de ces résistances.¹⁰⁰

La tolérance immune exercée au niveau de la cornée¹⁰² fait d'elle un lieu de réplication virale plus élevée qui permet la sélection de mutants résistants. Ceci explique une prévalence des résistances à l'aciclovir de 6,4% chez l'immunocompétent lors de kératite herpétique.⁴⁷

3. Génotypes et phénotypes des résistances

a) Phénotypes

Les résistances aux antiviraux ciblent les deux enzymes nécessaires à leur activité : la **thymidine kinase** virale ainsi que l'**ADN polymérase** virale. Il en découle 4 phénotypes de résistances : « **Thymidine kinase déficient** » caractérisé par un déficit complet en thymidine kinase virale (<5% de l'activité thymidine kinase d'une souche sauvage⁴⁸), « **Thymidine kinase low producer** » caractérisé par une diminution de la production ou de l'activité de la thymidine kinase virale, « **Thymidine kinase altered** » caractérisé par une altération de la spécificité pour le substrat de la thymidine kinase virale et pour finir le « **DNA polymerase altered** » caractérisé par un défaut d'affinité pour l'ADN polymérase virale.^{47,50,99} 95% des résistances ciblant la thymidine kinase entraînent des phénotypes « TK déficient » ou « TK low producer ». ^{15,48}

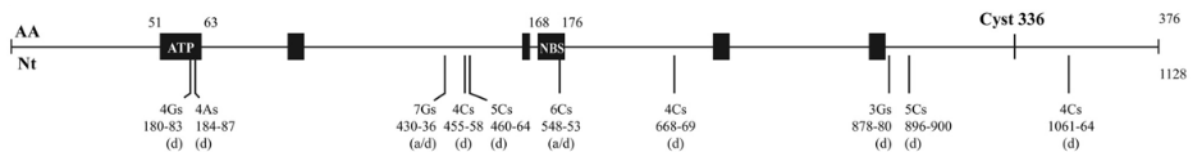
b) Génotypes

La thymidine kinase virale codée par le gène UL23 et l'ADN polymérase virale codée par le gène UL30 ne sont pas touchées à la même fréquence. En effet l'étude des résistances a montré des mutations dans le gène de l'UL23 dans 95% des cas contre des mutations dans le gène de l'UL30 dans 5% des cas.^{15,47,50} Ceci s'explique par le fait que l'HSV nécessite une ADN polymérase fonctionnelle afin de se répliquer alors que la thymidine kinase virale est, elle, non

indispensable dans les cultures cellulaires et les cultures sur tissus de mammifères. Par conséquent la probabilité d'avoir un gène UL23 muté dans une souche viable résistante à l'ACV est plus importante que celle d'avoir un gène UL30 muté.¹⁵

Il n'y a pas de relation retrouvée entre les génotypes spécifiques et le niveau de résistance à l'aciclovir.⁵⁰ L'association de deux phénotypes est possible pour le même génotype.¹⁵

- Mutations au niveau du gène de la thymidine kinase virale



	ATP/site 1	Site 2	Site 3	Site 4/NBS	Site 5	Site 6	
Régions non conservées	R51W Y53stop G56S/V P57H H58R/L G59R/V G61V K62N T63A/I/S	E83K P84S	D162A R163H	A168T P173L/R A175V R176Q	R216H/C/S R220C/H R222C	L297S	C336Y C337Y
	T65N	Q104H/stop H105P Q125E/L P131S G144N L158P	A167V	T245M S182N Q185R V187M A189V G200C T201P	R281stop		L364P
Régions conservées							

Figure 4 : Gène UL23 et ses mutations conférant des résistances à l'aciclovir : Les additions et délétions sont indiquées sous les traits verticaux, les substitutions sont indiquées dans le tableau.¹⁵

La thymidine kinase est une protéine de 376 AA codée par le gène UL23¹⁰³ contenant 1200 nucléotides⁴⁸. Ce dernier possède six régions conservées ; site 1 (AA 56 à 62), site 2 (AA 83 à 88), site 3 (AA 162 à 164), site 4 (AA 171 à 173), site 5 (AA 216 à 222) et site 6 (AA 284 à 289).¹⁰⁴ Les régions les plus importantes pour l'activité enzymatique de la thymidine kinase sont l'ATP binding site (AA 51 à 63), le nucléoside binding site (AA 168 à 176) et la cystéine au codon 336 qui permet le maintien de la structure tridimensionnelle du site actif.¹⁰⁵

L'UL23 possède un haut degré de polymorphisme et des mutations variées, ce qui rend le gène le diagnostic des résistances.¹⁰⁶ De plus certaines de ces mutations sont localisées en

dehors des zones codant pour le site actif de l'enzyme et ne confèrent donc pas de résistance.¹⁵

L'UL23 possède un grand nombre de chaînes d'homopolymères de guanine et cytosine. 50% des souches résistantes à l'aciclovir contiennent des insertions ou délétions de nucléotides à l'intérieur de ces chaînes. Ceci montre la présence de hot spot mutationnel dans le gène de l'UL23. Ces homopolymères augmentent le potentiel de mutations génétiques et de décalages du cadre de lecture qui entraînent la formation d'une enzyme non fonctionnelle tronquée.^{15,47,50,107} Les deux plus long homopolymères sont les sites où les mutations les plus fréquentes ont été rapportées pour les souches résistantes à l'aciclovir (une chaîne de 7 G et une chaîne de 6 C).

Les mutations entraînant la formation d'un codon STOP et donc d'une TK tronquée sont les suivantes : Insertion ou délétion de 1 ou 2 G dans une chaîne de 7 G entre l'ATP binding site et le nucléoside binding site, délétion d'un C dans une chaîne de 4, 5 ou 6 C avant (4 C) ou après (5 ou 6 C) le nucléoside binding site, délétion d'un A dans chaîne de 4 A au niveau de l'ATP binding site.⁵⁰

Les mutations comprises dans le site catalytique sont les suivantes : mutations ponctuelles des nucléotides 170, 186, 188 de l'ATP binding site et substitution du nucléotide 527 du nucléoside binding site.⁵⁰

La mutation C336Y a été rapportée comme entraînant des phénotypes de résistances à l'aciclovir TK low producer et TK altered. Elle affecte l'ATP binding site et conduit à des altérations de l'affinité des liaisons avec les analogues nucléosidiques. La mutation semble aussi modifier la structure tridimensionnelle de l'intégralité du site actif.¹⁵

Des mutations ont été décrites comme conférant une résistance à l'aciclovir malgré leur localisation au niveau de zones non conservées¹⁵. Ce sont les substitutions des nucléotides 312, 601, 646, 664, 841, 890.⁵⁰

- Mutations au niveau du gène de l'ADN polymérase virale

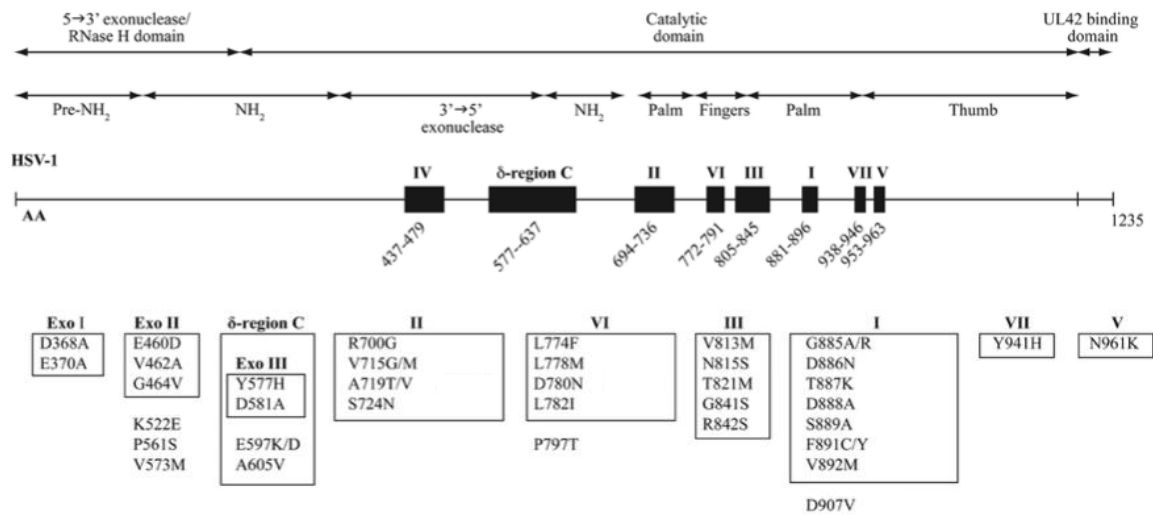


Figure 5 : Gène UL30 et ses mutations de résistance à l'aciclovir : les substitutions dans les zones conservées sont indiquées à l'intérieur des rectangles et celles dans les zones non conservées à l'extérieur¹⁵

L'ADN polymérase est un hétérodimère composé des produits des gènes UL30 (contenant 3000 nucléotides⁴⁸), codant pour la sous unité catalytique, et UL42 codant pour une phosphoprotéine permettant la liaison à l'ADN double brin. Elle appartient à la famille des α polymérase et est proche des DNA polymérase δ . La famille des α like DNA polymérase partage une homologie de séquences d'acides aminés dans la partie C terminale de la sous unité catalytique. Ces régions conservées sont numérotées de I à VII en fonction de leur degré de conservation des gènes de l'ADN polymérase, la région I étant la mieux conservée. L'ADN polymérase de l'HSV possède en plus une γ -région C partagée par les polymérase des eucaryotes de la famille des DNA polymérase.

Les régions II, III, VI et VII sont directement ou indirectement impliquées dans la reconnaissance et la liaison des nucléotides ou des pyrophosphates ou bien impliquées dans l'activité catalytique. C'est pourquoi les résistances aux analogues nucléosidiques sont des substitutions d'un seul nucléotide localisé dans ces régions. Les régions II et III sont les régions préférentielles des mutations. Les mutations dans les régions II et VII sont associées fréquemment à une résistance croisée au foscarnet. Quelques mutations seulement ont été décrites dans les autres régions conservées ou à l'extérieur de ces régions.

Les mutations de résistance K522E, P561S, V573M, P797T, D907V se trouvent dans des régions non conservées. Les mutations E460D, G464V, K522E et P561S sont létales pour le

virus. Les mutations Y577H et D581A sont associées à une hyper susceptibilité à l'aciclovir. La mutation D907V induit un bas niveau de résistance à l'aciclovir. Aucune des mutations de la région III n'est induite spontanément. Quelques mutations de la χ -région C conférant des résistances à l'aciclovir ont été retrouvées chez des souches de laboratoire.¹⁵

4. Conséquences cliniques des résistances

- Conséquences intrinsèques au virus

La thymidine kinase est importante pour la pathogénicité du virus particulièrement lors de réactivations dans le cadre de latence infectant les ganglions trijumeaux. Les souches TK low producer et TK négatif ont une pathogénicité diminuée en rapport avec les souches sauvages sauf chez l'immunodéprimé, le nouveau-né et dans le cas des kératites. Les souches TK altered et DNA pol altered ont une pathogénicité identique aux souches sauvages.^{15,108,109}

La majorité des mutants résistants aux antiviraux présentent une neuro-virulence atténuée par rapport aux souches sauvages. Une étude retrouve une diminution d'un facteur 10 chez des patients atteints de souches TK altered.^{15,108} Ceci peut être expliqué dans le cas l'ADN polymérase par son rôle crucial dans le cycle de réplication. Différents degrés de diminution de cette neuro-virulence ont été mis en évidence. En effet, certains mutants restent capables de se répliquer dans le système nerveux central pouvant causer des encéphalites. Le degré de neuro-virulence des mutants résistants à l'aciclovir et/ou au foscarnet ne sont pas corrélés avec les études de susceptibilité in vitro et aux études génétiques.^{15,108} L'aptitude du virus à se répliquer est corrélée à la neuro-invasion, c'est pourquoi l'étude de la capacité de réplication du virus permet de prédire la neuro-virulence.¹¹⁰ Une étude a cependant rapporté un mutant ayant la capacité de se répliquer dans le système nerveux central mais avec paradoxalement une diminution de neurovirulence.¹¹¹

Les mutants résistants présentent également une capacité de latence diminuée par rapport aux souches sauvages, ce qui entraîne une diminution de la capacité à produire des récurrences. Cette capacité de latence est fonction du phénotype TK. Ainsi les souches TK low producer gardent leur capacité à se réactiver tandis que les souches TK négatives ont une capacité à établir une latence ainsi qu'une capacité à réactiver plus faible. En général, après guérison d'une infection par un virus TK négatif et arrêt du traitement antiviral, les récurrences

sont associées à des souches sensibles. Des souches TK négatives ont été cependant isolées lors de réactivations, ceci peut être expliqué car des souches sensibles et résistantes peuvent coexister en latence dans les ganglions sensitifs ce qui permet la réactivation des souches TK négative.^{15,47,108} Étant donné que 50% des mutations ont lieu au niveau des chaînes d'homopolymères de guanine et cytosine, la question se pose sur le rôle de ces chaînes dans la réactivation.¹⁵

Le délai d'obtention de souches sensibles après guérison est très court (13 jours).¹¹²

- Conséquences dues à l'état du patient

La résistance aux antiviraux ont des conséquences pathologiques uniquement chez l'immunodéprimé.⁹³ Seuls quelques cas d'infection à HSV résistant ont été décrit chez des patients immunocompétents.¹¹³⁻¹¹⁵ On retrouve ces souches dans le cas de kératites herpétiques, d'infection disséminées à HSV, d'encéphalites et de récurrences d'herpès génital mais elles ne sont en général pas associées à des conséquences cliniques.¹⁵ On observe une guérison des lésions en cas de reconstitution immunitaires.

Chez l'immunodéprimé, les souches résistantes à l'aciclovir sont associées à une morbidité significative due à la persistance du virus ainsi qu'à des infections disséminées réfractaires au traitement.¹⁵

La plupart des infections résistantes à l'aciclovir détectée chez le patient sidéen sont associées à des lésions cutanéomuqueuses étendues mais pas en général à des infections sévères généralisées. Quelques cas d'infections généralisées létales à HSV résistants à l'aciclovir ont été décrit chez le greffé de CSH ainsi que des cas de méningoencéphalites chez le patient sidéen.¹⁵

5. Diagnostic biologique des résistances

Le diagnostic des résistances aux antiviraux fait appel à des tests phénotypiques et génotypiques.¹⁷ En routine, il se fait à travers les tests de susceptibilité. Le diagnostic par séquençage appartient actuellement au domaine de la recherche.⁴⁸

a) Tests de susceptibilité

Les tests de susceptibilité permettent de déterminer la concentration inhibitrice 50 (IC50) qui est la concentration en antiviraux permettant de réduire l'effet cytopathogène ou la production virale de 50%. Ils se basent sur la mesure de l'inhibition d'une culture virale en présence d'antiviraux. Après une période d'incubation appropriée avec des antiviraux, l'inhibition de la production virale (diminution de l'effet cytopathogène ou augmentation du nombre de cellules non infectées) est mise en évidence par microscopie optique (objectif x20 ou x40) par le biais de méthodes de plaques de lyses ou colorimétriques ou par quantification de la charge virale par des méthodes d'amplification génique.^{15,17,48,100,116}

L'IC50 varie en fonction de la souche (même sauvage) et du titre de l'inoculum, selon la nature et la qualité des cellules et en fonction de la technique diagnostic utilisée.⁴⁸

Les souches résistantes aux antiviraux sont obtenues à partir de cultures cellulaires en laboratoire ou d'isolats de patients. Elles constituent une population hétérogène contenant un mélange de souches sauvages et de souches résistantes. On estime que la concentration de virus résistant à l'aciclovir doit être supérieure à 20% afin de pouvoir obtenir une IC50 supérieure au seuil de résistance. Il faut noter que la proportion naturelle de virus résistant à l'aciclovir et au penciclovir est de même ordre de grandeur dans les deux cas.¹⁵

La susceptibilité est dépendante du virus lui-même ainsi que du temps post infection¹¹⁷

- Plaque reduction assay (PRA)¹¹⁶

« Plaque reduction assay » est la technique la plus utilisée, c'est le gold standard des tests de susceptibilité. Le principe repose sur l'inoculation de cellules par 50 à 100 PFU (plaque forming unit) d'HSV. Les cellules infectées sont incubées avec une série de concentrations en antiviraux (aciclovir, penciclovir, foscarnet) pendant 2 à 3 jours puis elles sont fixées (crystal violet ou méthanol) et colorées (au giemsa). Le nombre de plaques virales est compté et l'IC50 correspond à une réduction de 50% des plaques virales par rapport au nombre de plaques pour des cellules infectées par le virus mais non traitées par antiviraux.^{15,100,118}

Ce test est long et dépendant de la lecture par l'opérateur mais il permet de distinguer les différents phénotypes, l'association de phénotypes et l'association de souches résistantes et sensibles.¹⁵

Les seuils de résistance pour ce test sont un IC50 ≥ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour l'aciclovir, un IC50 ≥ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour le foscarnet. Il n'y a pas de valeur consensus concernant le penciclovir.^{15,48,118} Concernant l'aciclovir, ces critères permettent une prédiction de la résistance clinique in vivo de 95% en cas de souches résistantes in vitro.⁴⁸

- Quantification de l'ADN viral

- DNA Hybridization test

Dans un premier temps, les échantillons sont mis en culture cellulaire puis après 48h d'incubation à 37°C la culture est mise en présence de différentes concentrations d'aciclovir.¹¹⁶ Le principe de l'hybridation de l'ADN est d'utiliser des séquences spécifiques (sondes) qui vont se fixer à la séquence d'acide nucléique cible par appariement spécifique des bases et formeront des hétérodimères. L'acide nucléique (ADN pour l'HSV) de l'échantillon est tout d'abord dénaturé pour obtenir des acides nucléiques simples brins puis il est fixé à une membrane. Cette membrane est alors plongée dans une solution aqueuse de sonde d'acide nucléique marqué qui vont s'hybrider avec les acides nucléiques cibles de l'échantillon. Après lavage, tout marquage restant sur la membrane sera constitué de l'hétérodimère sonde/acide nucléique.¹¹⁹

Dans le cadre du test phénotypique de résistance de l'HSV, la membrane est une membrane genescreen plus, le marquage se fait à l'iode 125 et le comptage par compteur émission gamma.¹¹⁶

La résistance à l'aciclovir est définie avec un IC50 $\geq 2,25$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ⁵⁰ ou IC50 ≥ 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ¹¹⁶ et la susceptibilité intermédiaire est définie comme un IC50 compris entre 0,45 et 2,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.⁵⁰

Cette technique a été remplacée par des techniques de biologie moléculaire plus performantes et qui n'utilisent plus la radioactivité. Elle n'est donc que très rarement utilisée à l'heure actuelle.

- DNA reduction assay

Dans le « DNA reduction assay » l'HSV1 est mis en culture cellulaire pendant 48h puis une subculture est effectuée après traitement de la culture par antiviraux (aciclovir, foscarnet).

Une rt-PCR est effectuée sur les surnageants de culture et subculture ou après lyse cellulaire (charge virale intracellulaire) afin d'évaluer la quantité d'ADN du virus présent. L'IC50 est alors défini comme la concentration en antiviraux réduisant la quantité d'ADN de 50%. Le seuil de résistance est $IC_{50} \geq 0,23$ mg/L pour l'aciclovir et $IC_{50} \geq 13$ mg/L pour le foscarnet. La résistance peut aussi être définie comme une augmentation de 3 à 5 fois l'IC50 par comparaison avec l'isolat de base du même patient. ^{15,100,118,120}

C'est une technique sensible et précise mais la lecture doit être faite tôt dans la phase exponentielle du virus. En effet, la persistance longue de l'ADN dans les cultures cellulaires peut gêner l'interprétation à un stade avancé de l'infection. ¹⁵

- Quantification de l'antigène viral

La mesure de l'expression de l'antigène viral sur culture cellulaire après incubation peut être faite par ELISA ou par cytométrie en flux.

- ELISA : Sandwich ELISA ou microplaque in situ ELISA (MISE test)

La culture cellulaire est tout d'abord mise en présence d'immunoglobulines anti HSV puis on ajoute des anticorps anti immunoglobulines conjugués avec de la peroxydase. La mesure de l'activité enzymatique est proportionnelle à la quantité d'antigènes présents. La réaction est ensuite stoppée par de l'acide sulfurique avec ajout de o-phenylenediamine hypochloride ^{15,121}

- Cytométrie en flux

La cytométrie en flux détecte les cellules infectées par l'HSV 1 en utilisant le marqueur glycoprotéine C. L'IC50 est alors défini comme la concentration en antiviraux (aciclovir, ganciclovir, foscarnet) diminuant de 50% le nombre de cellules exprimant la glycoprotéine C de l'HSV 1 avec une intensité de fluorescence $\geq 10^2$. Cette technique permet de rechercher les résistances chez les patients avec de faibles charges virales. Elle permet également de détecter des souches résistantes parmi un mélange avec des souches sensibles. Sa sensibilité va jusqu'à 1-2% de virus résistants dans le mélange. Le seuil de résistance à l'aciclovir est un $IC \geq 3,134$ μ M. ¹¹⁷

- Dye uptake assay

C'est une mesure quantitative de la réduction de l'effet cytopathogène lors du traitement par molécule antivirale. L'utilisation d'un colorant rouge permet de différencier les cellules mortes et vivantes en colorant les cellules vivantes qui n'ont donc pas été infectées par le virus.¹⁰⁸ Une IC50 \geq permet une bonne corrélation entre une résistance in vitro et un échec de traitement in vivo.⁴⁸

b) Analyses phénotypiques

- Plaque autoradiography assay

La deoxycytidine marquée à l'iode 125 ($[^{125}\text{I}]$ deoxycytidine = IdC) et la thymidine marquée au carbone 14 ($[^{14}\text{C}]$ thymidine = TdR) sont phosphorylées par la thymidine kinase virale des cultures cellulaires infectées par l'HSV 1. Leur incorporation au sein des cellules sera détectée par radiographie.

Cette technique permet de détecter la présence ou l'absence de thymidine kinase virale ainsi que de différencier les phénotypes entre eux. Les phénotypes « TK competent » auront des réactions positives avec l'IdC et le TdR. Les phénotypes TK déficient auront des réactions négatives avec l'IdC et le TdR. Les phénotypes TK low producer et TK altered auront une réaction négative avec l'IdC et une réaction positive avec le TdR.¹²²

Cette technique permet de compléter le PRA car elle permet de mettre en évidence une hétérogénéité de phénotypes TK dans un mélange alors que le PRA mesure la sensibilité globale de la population virale.¹⁵

c) Études génétiques

Les études génétiques consistent à séquencer les gènes UL23 et UL30 afin de détecter des mutations de résistances. Les mutations du gène de la thymidine kinase doivent être recherchées en première intention. Celles du gène de l'ADN polymérase virale sont recherchées en deuxième intention où lors d'une résistance au foscarnet.⁴⁸ Le gène d'intérêt est amplifié par PCR puis les produits de PCR sont séquencés. Les mutations sont ensuite interprétées en comparant avec un panel de mutations décrites dans la littérature. Les

conséquences de nombreuses mutations retrouvées lors de séquençages sont encore inconnues, or il est essentiel de différencier le polymorphisme des mutations de résistances.^{15,118} L'avantage du séquençage est qu'il permet de travailler directement sur le prélèvement sans isolement préalable par culture cellulaire.^{17,48}

De nos jours, de nombreuses techniques de séquençages existent. Le technique SANGER et l'ion torrent (NGS) sont deux méthodes utilisées pour le diagnostic des résistances de l'HSV 1 aux antiviraux. Toutes les mutations détectées par séquençage SANGER sont retrouvées avec la technique ion torrent tandis qu'à l'inverse, certaines mutations conférant des résistances à l'aciclovir sont retrouvées uniquement en ion torrent.¹²³

- Séquençage par méthode SANGER

La méthode SANGER est la technique de séquençage historique. L'ADN à séquencer est mis en présence d'amorces, d'ADN polymérase, de nucléotides ainsi que de déoxynucléotides marqués par un fluorochrome (vert pour l'adénine, rouge pour la thymidine, jaune pour la guanine et bleu pour la cytidine). L'ADN polymérase va former un brin complémentaire en incorporant des nucléotides au fur et à mesure. De façon aléatoire le nucléotide incorporé pourra être un déoxynucléotide ce qui entraînera un arrêt de l'élongation. A la fin de la réaction, de nombreuses séquences d'ADN de tailles différentes auront été produites. Elles seront séparées par électrophorèses en fonction de leur taille. Cela permet l'obtention d'une succession de bandes colorées correspondant aux fluorochromes marquant les déoxynucléotides. Étant donné que l'élongation commence toujours au même endroit de l'ADN (amorce unique) tous les fragments ayant la même taille vont finir par le même déoxynucléotide et donc la même couleur. Cette succession de bandes colorées pourra alors être convertie en une succession de nucléotides ce qui permet de retrouver la séquence d'ADN d'intérêt.¹²⁴

- Next generation sequencing par Ion torrent

Le principe de l'ion torrent est introduire dans le milieu de réaction un nucléotide à la fois. Si le nucléotide introduit est complémentaire au brin à séquencer il sera incorporé dans l'ADN en élongation ce qui entraînera la libération d'ion hydrogène. Cela engendre une variation de

pH détectée par un capteur ionique. Si plusieurs nucléotides identiques adjacents sont incorporés, plusieurs ions hydrogènes seront libérés et la variation de pH sera d'autant plus forte. Dans le cas où le nucléotide introduit dans la solution n'est pas complémentaire au brin d'ADN, celui-ci ne sera pas incorporé et il n'y aura donc pas de libération d'ion hydrogène ni de libération de pH détectable.¹²⁵

6. Traitement des résistances

L'aciclovir et penciclovir tous deux dépendants de la thymidine kinase virale pour leur activation, présentent des résistances croisées, il est donc recommandé de ne pas remplacer ces deux molécules l'un par l'autre.^{15,99} Des résistances croisées à l'aciclovir et au foscarnet sont plus rares mais ont été décrites, notamment dans des « cases reports » chez des patients greffés de cellules souches hématopoïétiques pour le traitement de leucémies aiguës myéloïdes.⁵⁶ Les inhibiteurs de l'hélicase primase présentent moins de résistances et celles-ci ne sont pas croisées puisqu'elles agissent sur une cible totalement différente des molécules habituelles.⁵⁸

La stratégie thérapeutique proposée dans le cadre de résistances à l'aciclovir est la suivante^{15,47,48,99} :

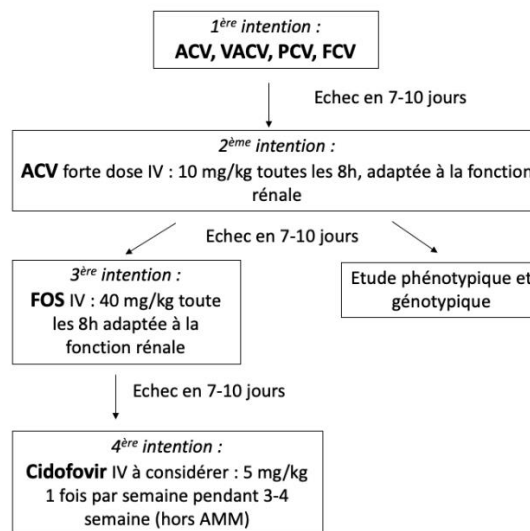


Figure 6 : Stratégie thérapeutique en cas de résistances aux antiviraux

Le cidofovir a montré son efficacité dans le traitement d'infection cutanéomuqueuses à *Herpes simplex virus* multirésistant chez des patients immunocompétents. Un case report

relate également son utilisation avec succès chez un patient greffé de CSH ayant reçu 5 mg/kg 1 fois par semaine en IV à l'induction puis une fois toutes les deux semaines jusqu'à reconstitution de la moelle osseuse. La demi vie longue de ses métabolites permet des administrations espacées d'une à deux semaines. Malgré ces arguments, cette indication n'a pas encore été validée^{47,56}

Des formes topiques du foscarnet et du cidofovir ont été efficaces dans le traitement d'herpès cutanéomuqueux ne répondant pas à l'aciclovir, notamment chez le patient immunodéprimé¹²⁶. Leur utilisation en routine permettrait d'éviter des effets indésirables d'une administration IV mais ils ne sont pas commercialisés.⁴⁷

Un anticorps monoclonal humanisé (mAb hu2c) a été développé. Il empêche la dissémination du virus par le passage direct de cellules en cellules, mécanisme clé par lequel l'HSV échappe à la réponse humorale. Il neutralise ainsi l'HSV de manière entièrement indépendante du complément ou du recrutement des cellules effectrices de l'immunité.²

III. Génotypage de l'herpes simplex virus 1

Deux grands modèles de génotypes ont été décrits, et s'appuie tous deux sur le polymorphisme de l'ADN.

1. Restriction fragment length polymorphisme (RFLP)

Ce modèle définit les génotypes en fonction des glycoprotéines G (gG) codée par le gène US4, I (gI) codée par le gène US7^{4,127,128} et du gène US2⁵. Il définit 3 génotypes (A, B et C) et prévoit l'existence de génotypes recombinants A/C, B/A, B/C, C/A, C/B.

Il utilise la méthode RFLP (restriction fragment length polymorphism) après amplification de l'ADN par PCR. Les échantillons d'ADN sont coupés en morceaux par des enzymes de restriction sélectives puis ces morceaux sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose. Cette technique exploite donc les variations de séquences d'ADN homologues. En effet, une différence de molécules d'ADN homologues peut être détectée par une différence de tailles des fragments d'ADN après digestion par des enzymes de restrictions.^{5,129} Cette méthode est capable de fournir des informations sur des polymorphismes d'un seul nucléotide aux points de restrictions et d'identifier des groupes

génétiqumnt similaire de souches mais n'est pas capable de décrire des relations phylogénétiques. ⁴

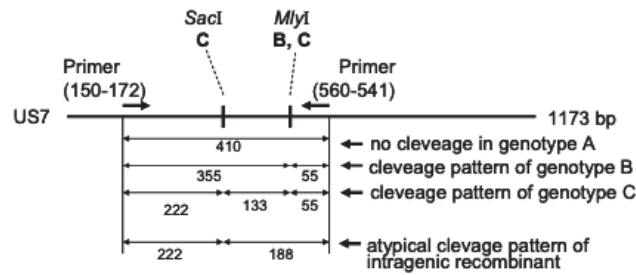


Figure 7 : Modèle de clivage du gène US7 de la glycoprotéine I¹²⁸

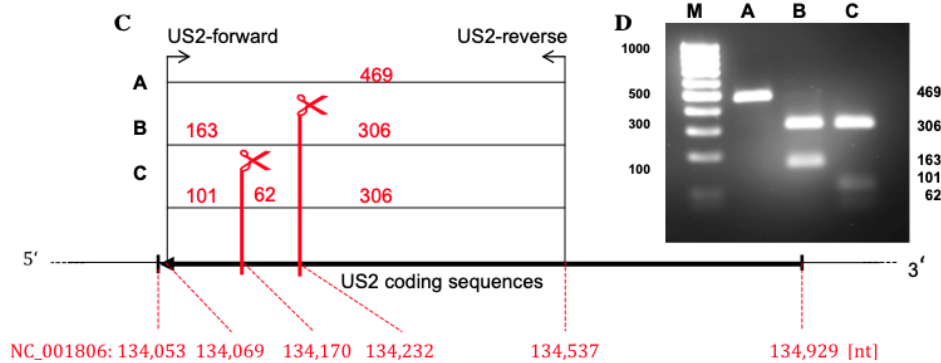


Figure 8 : Modèle de clivage du gène US2⁵

2. Séquençage

Le deuxième modèle de génotypage repose sur le séquençage par technique illumina (NGS) du génome complet de l'HSV après PCR puis comparaison des séquences obtenues à des séquences retrouvées dans la GenBank. L'analyse se fait après alignement des segments non redondant U_L, IR_L, « a », IR_S et U_S.

Trois groupes phylogénétiques ont été identifiés ayant des origines géographiques distinctes ce qui permet de suivre les mouvements de populations : phylogroupe I retrouvé sur des souches originaires d'Europe et d'Amérique du nord ; Phylogroupe II retrouvé sur des souches originaires d'Asie (Japon, Corée du sud, Inde, Chine) ainsi que sur une souche allemande et une souche américaine ; Phylogroupe III retrouvé sur des souches africaines. ⁴

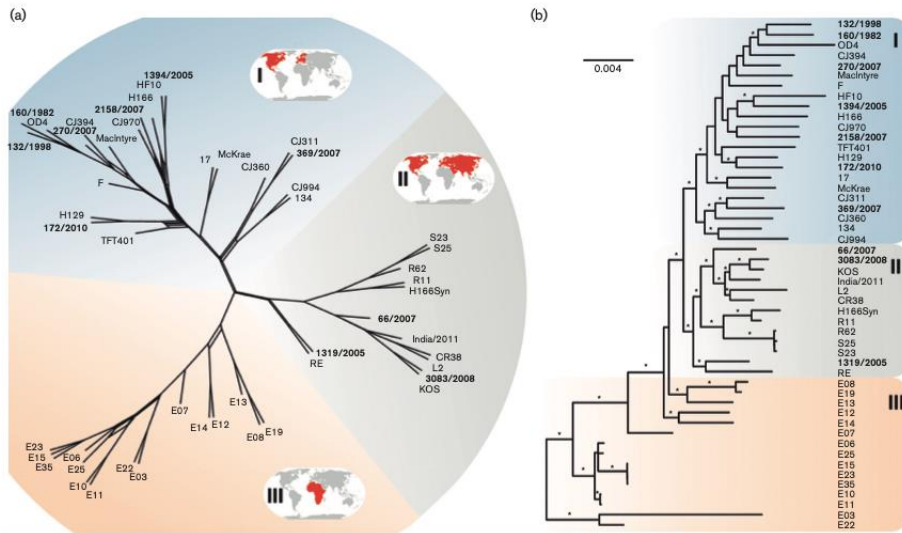


Figure 9 : Phylogroupes d'*herpes simplex virus 1*⁴

3. Relations entre ces deux modèles

L'analyse génotypiques du gène US2 et des glycoprotéine gG et gI n'est pas ou peu corrélé aux groupes phylogénétiques de l'analyse du génome complet. Le génotype A est majoritaire dans les phylogroupes II et III (à l'exception du gène de la glycoprotéine gI pour le phylogroupe III). Les génotypes B et C sont retrouvés plus fréquemment dans le phylogroupe I. Le génotype C n'est pas présent dans le phylogroupe II pour les gènes des glycoprotéines gG et gI et dans le phylogroupe III pour le gène de la glycoprotéine gG. Le génotype B n'est pas présent dans le phylogroupe III pour le gène US2 et le gène de la glycoprotéine gG.⁴

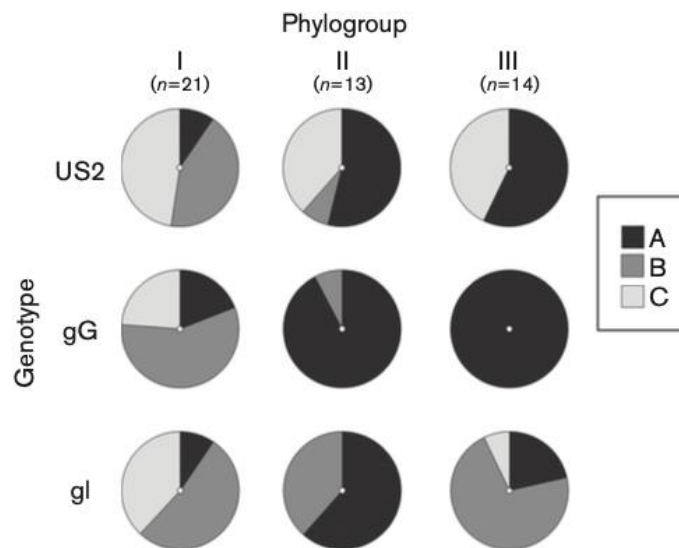


Figure 10 : Répartition des génotypes A, B et C de l'HSV1 parmi les phylogroupes I, II et III⁴

IV. Mise au point d'une méthode combinée de génotypage et de recherche de résistances aux antiviraux pour le virus de l'Herpes simplex de type 1

1. Matériels et méthodes

a) Analyse bio-informatique

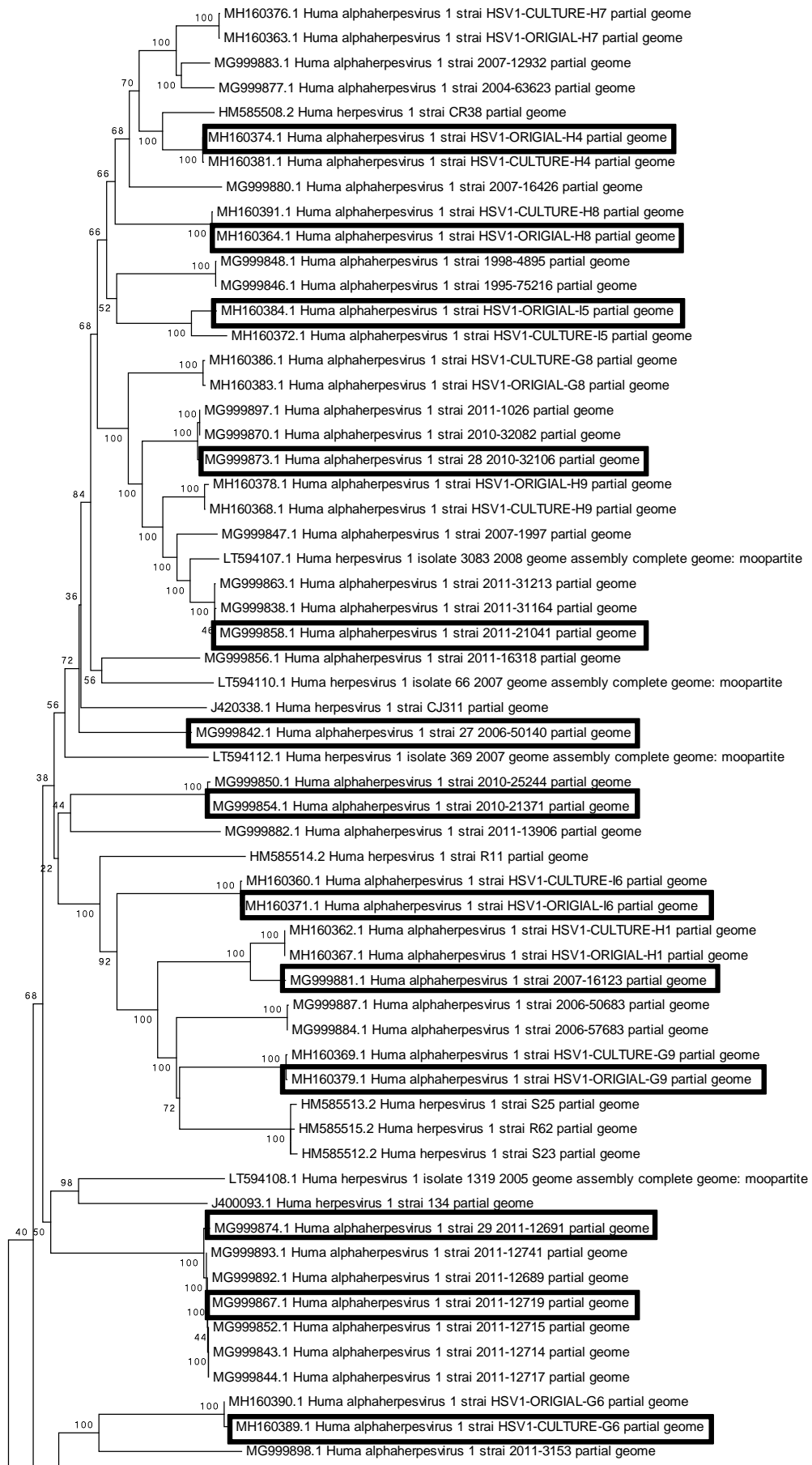
Cette analyse bio-informatique avait deux objectifs. Le premier était de déterminer des séquences d'ADN à l'intérieur du génome de l'HSV 1 intéressantes à étudier. Le second, de créer des séquences d'amorces permettant l'amplification des régions étudiées par PCR et ainsi leur séquençage par NGS.

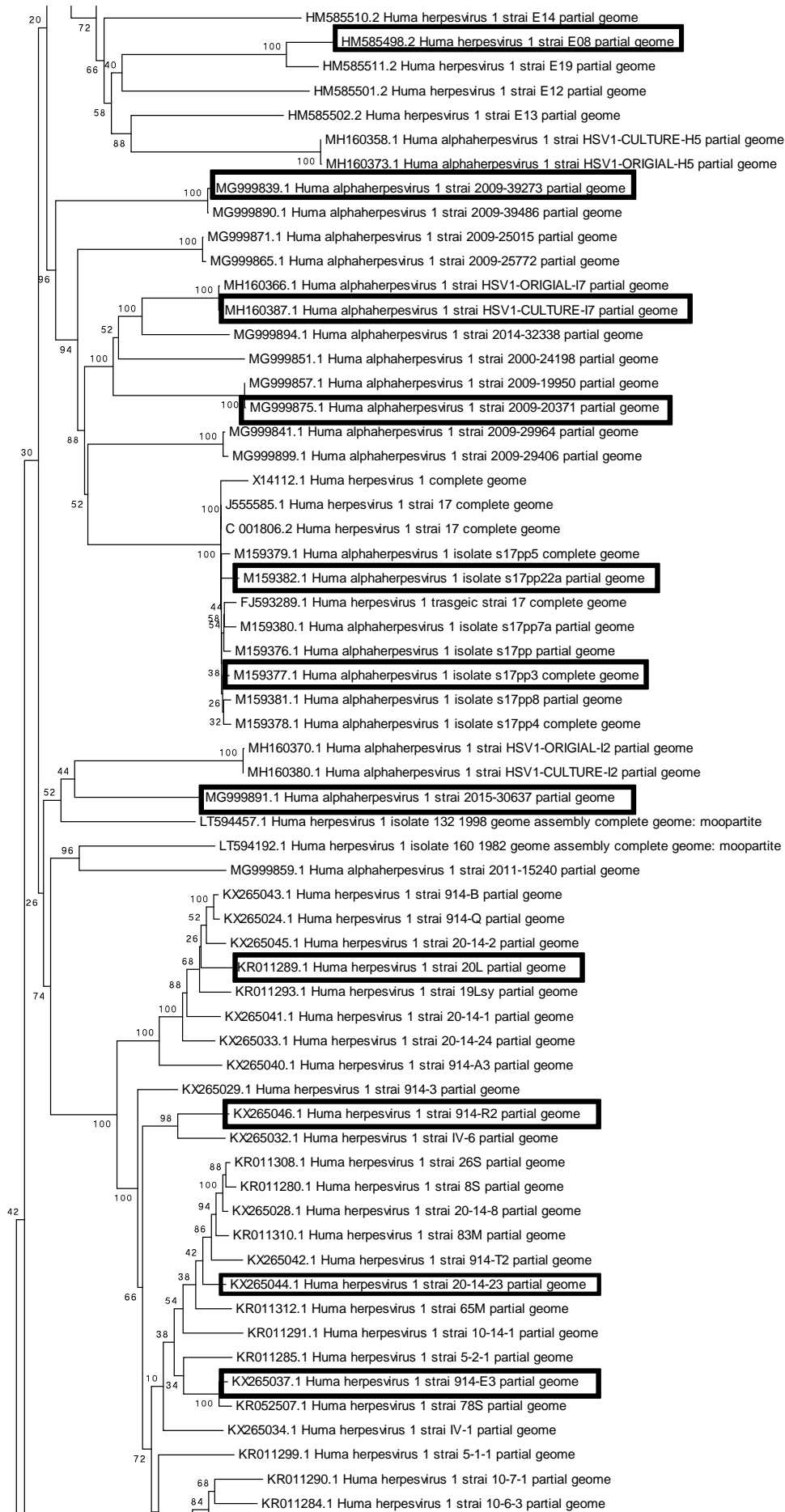
La première étape a été de sélectionner 193 séquences de génomes complets à partir de la plateforme *NCBI genbank*.¹³⁰ Je les ai ensuite alignées à l'aide du logiciel *MAFFT*¹³¹⁻¹³³ et cet alignement a été corrigé manuellement à l'aide du logiciel *MEGA*¹³⁴ afin d'éliminer les séquences incomplètes, erronées ou issues de virus non circulants.

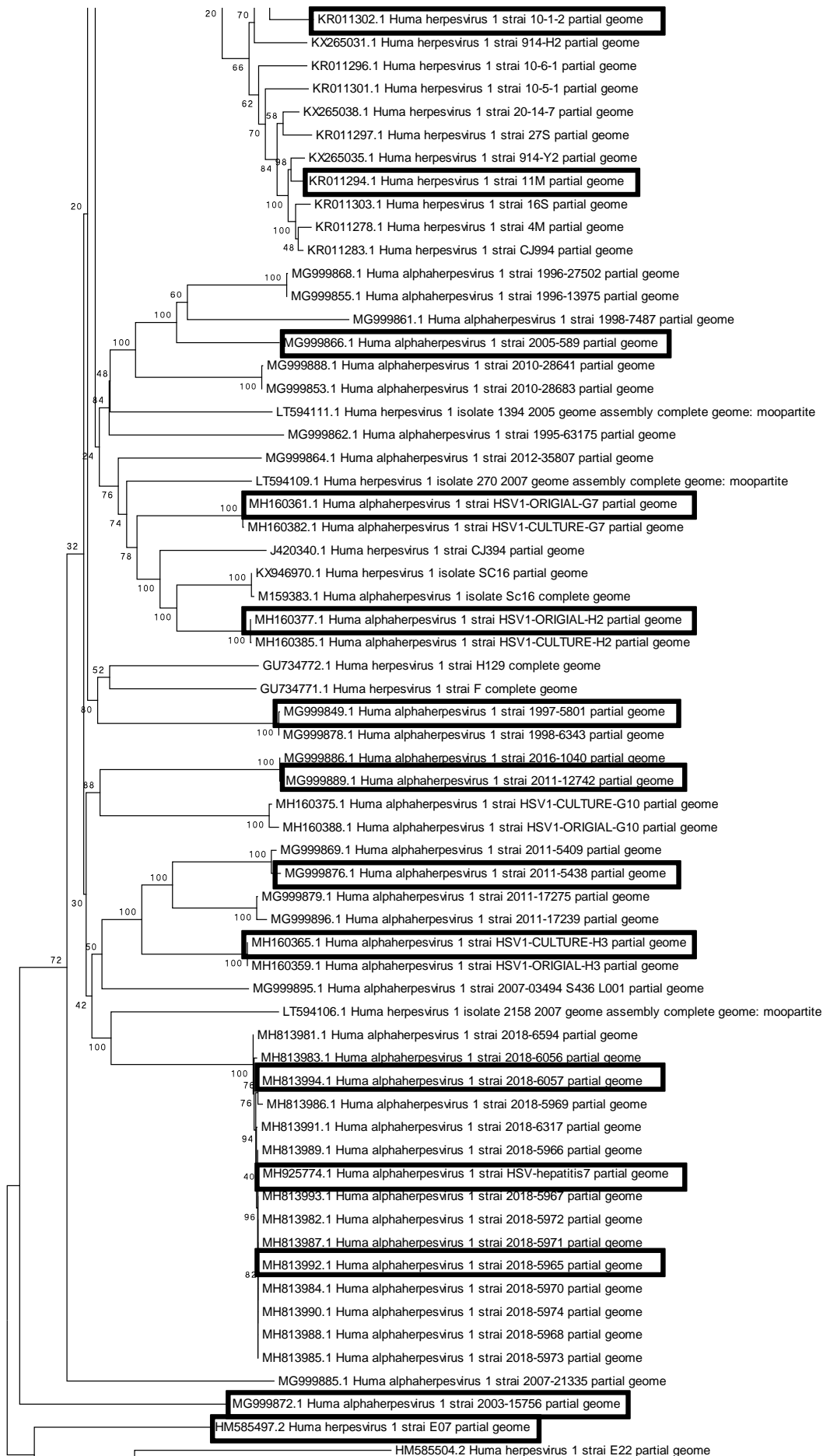


Figure 11 : Alignement des séquences de génomes complets de l'HSV 1

La seconde étape avait pour but de sélectionner 40 séquences espacées les unes des autres d'un point de vue phylogénétique. C'est pourquoi j'ai réalisé un arbre phylogénétique à l'aide du logiciel *MEGA*¹³⁴ et ai sélectionné les séquences en fonction du résultat obtenu.







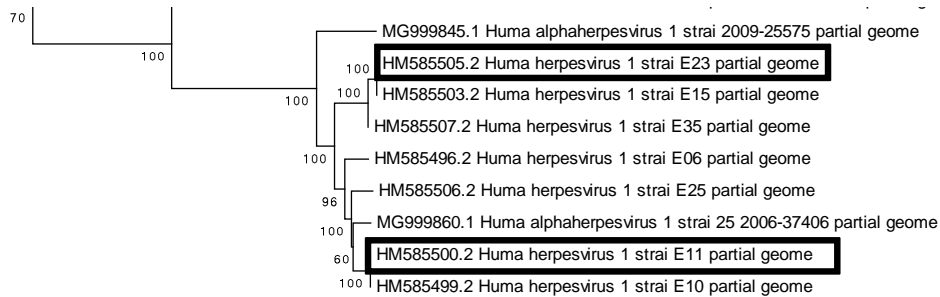


Figure 12 : Arbre phylogénétique des séquences d'HSV 1 téléchargées à partir de la *genbank* (NCBI) et sélection de 40 séquences pour mon travail.

La troisième étape consistait à choisir dans l'alignement 3 zones contenant des séquences homologues hypervariables. Ces zones hypervariables ont permis par la suite de réaliser le génotypage. Pour cela, il a fallu aligner, comme vu précédemment, les 40 séquences sélectionnées. J'ai ensuite analysé le nombre de positions variables tout au long des séquences d'ADN pour choisir les trois zones sur lesquelles travailler. Pour cela le logiciel *MEGA* calcule la variabilité pour chaque position. Afin de l'analyser on utilise une fenêtre glissante (« sliding window ») de 200 nucléotides le long du génome qui donne au fur et à mesure la moyenne de la valeur de variabilité pour les 200 positions scannées. Pour finir on obtient le graphique ci-dessous. Lorsque la variabilité est élevée sur celui-ci elle le sera donc pour la région tout entière scannée et non pas juste pour un nucléotide.

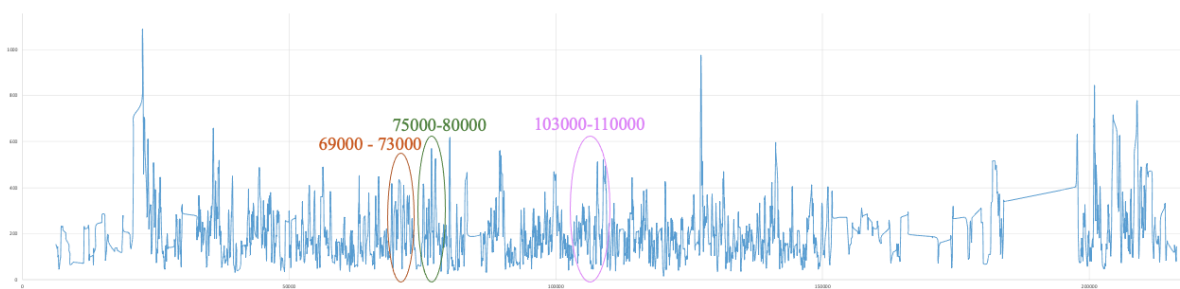


Figure 13 : Variabilité des séquences d'ADN de l'HSV 1 (Logiciel *MEGA*)

J'ai choisi de ne pas étudier les premiers et derniers segments d'ADN ; sur le graphique on peut voir qu'au niveau de ces zones les séquences sont très variables, mais cela est dû à un problème d'alignement. On peut observer un nombre élevé de régions variables mais peu conservent une bonne homologie de la séquence d'ADN. Or il est important qu'elle soit bonne et que l'alignement soit correct pour la phylogénie.

Les positions sur l'alignement des trois zones hypervariables que j'ai choisi de séquencer sont du nucléotide n°69000 au nucléotide n°73000, du nucléotide n°75000 au nucléotide n°80000 et du nucléotide n°103000 au nucléotide n°110000.

Une fois mes zones choisies, j'ai téléchargé sur *genbank NCBI* les séquences des gènes UL23 de la thymidine kinase et UL30 de l'ADN polymérase virale qui contiennent les mutations de résistances à l'aciclovir.

J'ai donc obtenu plusieurs fragments d'ADN à séquencer : les trois zones hypervariables ainsi que les 2 gènes UL23 et UL30.

La PCR que je souhaitais mettre en place est une PCR multiplex, c'est-à-dire que plusieurs PCR se font en parallèle dans le puit. Pour cela il faut de nombreux couples d'amorces (sens et anti-sens) qui vont amplifier une partie de la séquence cible. Les couples d'amorces sont divisés en deux pools afin d'être sûr que les fragments à amplifier ne se chevauchent pas au niveau des amorces.

Le design des amorces est donc la quatrième étape. Pour cela, j'ai utilisé le logiciel *primal scheme*⁴¹ et ai ensuite étudié les amorces dessinées par celui-ci avec le logiciel *sequencher*¹³⁵. Celui-ci m'a permis de vérifier que tous les nucléotides de mes amorces soient complémentaires avec toutes les séquences à séquencer. En cas de complémentarité imparfaite, j'ai dégénéré les amorces qui en avaient besoin. C'est-à-dire que j'ai remplacé un nucléotide par le code nécessaire afin que l'amorce correspondante ait à la place du nucléotide plusieurs nucléotides possibles.

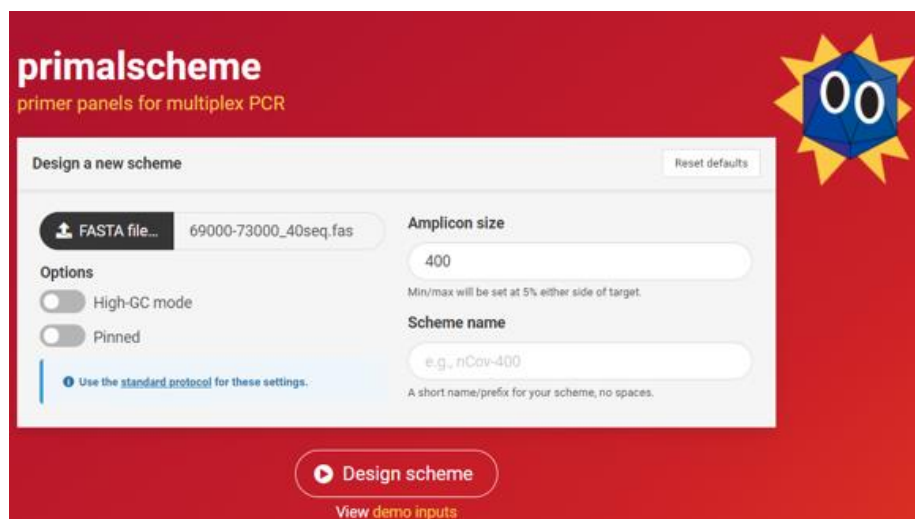


Figure 14 : Logiciel *primal scheme*

Your results

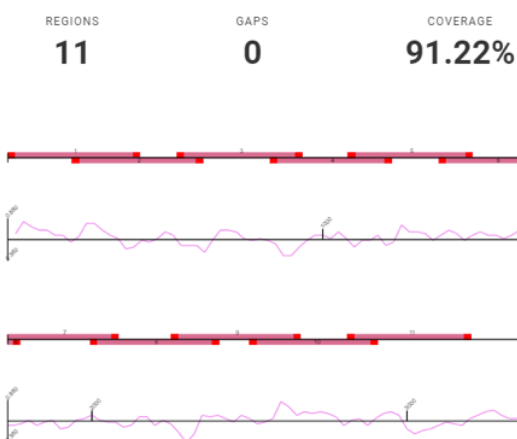


Figure 15 : Proposition d'amorces par le logiciel *primal scheme*

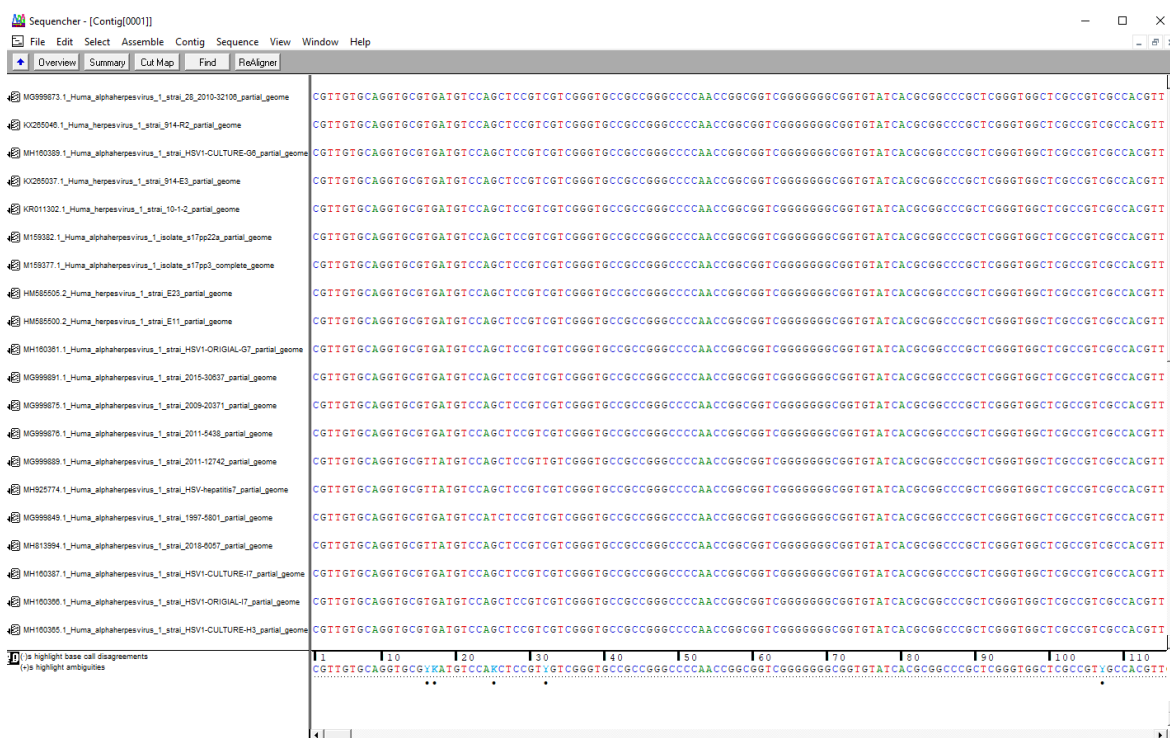


Figure 16 : Logiciel *Sequencher*

A	Adénine
C	Cytosine
G	Guanine
T	Thymine
K	G ou T
M	A ou C
R	A ou G
Y	C ou T

Tableau 6 : Codes pour dessiner les amorces

NOM	SEQUENCE
hsv1_69000-73000_1_LEFT	TGGATTGTGCAAGAGACCCTTA
hsv1_69000-73000_1_RIGHT	GAGCAGACAGACCCATGGTTTT
hsv1_69000-73000_2_LEFT	GTAGTCAGGTTTAGTTCGTCCGG
hsv1_69000-73000_2_RIGHT	CTCTGTCGATACCCACCGAGA
hsv1_69000-73000_3_LEFT	CCCCACGAACCATAAACATT
hsv1_69000-73000_3_RIGHT	CTCCATACCGACGATCTGCGAC
hsv1_69000-73000_4_LEFT	AACCCCGCGTTTATGAACAAAC
hsv1_69000-73000_4_RIGHT	GGGGAMACGTTATTTACCCTGT
hsv1_69000-73000_5_LEFT	CACGTTTRTACAGGTCGCCGTTG
hsv1_69000-73000_5_RIGHT	CGRTACCTTATGGGCAGCATGA
hsv1_69000-73000_6_LEFT	CGTATTGGCAAGYAGCTCGTAA
hsv1_69000-73000_6_RIGHT	GGTAATGACAAGCGCCCAGATA
hsv1_69000-73000_7_LEFT	ATGGGATGGCGGTCGAAGATRA
hsv1_69000-73000_7_RIGHT	AGAAAATGCCACGCTACTGCG
hsv1_69000-73000_8_LEFT	GGCTCGGTACGTAGACGATAT
hsv1_69000-73000_8_RIGHT	TTCGCATATTAAGGTGACGCGT
hsv1_69000-73000_9_LEFT	AAGCCATACGCGCTTCTACAAG
hsv1_69000-73000_9_RIGHT	GGGGCACAGGTACACTATCTTG
hsv1_69000-73000_10_LEFT	GCGGGGTTTGTGTCATCATAGA
hsv1_69000-73000_10_RIGHT	ACCTTTTCGGTCTGCTCRCAGA
hsv1_69000-73000_11_LEFT	CTCCAGAGCCTGTCCACGTATA
hsv1_69000-73000_11_RIGHT	CCGGATCCAAATGAGCTTTCGG
hsv1_69000-73000_12_LEFT	GAGAGTGTTCGTTCTTCCCC
hsv1_69000-73000_12_RIGHT	TAAAGACGGGCGACATCCAAA
hsv1_75000-80000_1_LEFT	GCTGGGTTAGCGTTTAGTTMGC
hsv1_75000-80000_1_RIGHT	GAGGGCAGGTAGTTGGTGATCA
hsv1_75000-80000_2_LEFT	TTTTGTGGGRCGTGATCGCCTG
hsv1_75000-80000_2_RIGHT	TTTGAATTTTCGCTCGCCTGG
hsv1_75000-80000_3_LEFT	CACCGCGTTAACAACATGATG
hsv1_75000-80000_3_RIGHT	GGAGGGTAATGCTGGGAAAGAC
hsv1_75000-80000_4_LEFT	CTCCATTACAACCAGCTCGTC
hsv1_75000-80000_4_RIGHT	CAGTTCCTGYTGCAGAGACGTC
hsv1_75000-80000_5_LEFT	GTGACGTCTCTGCARCAGGAAC
hsv1_75000-80000_5_RIGHT	CATCCCATGGTACCAAAGACCG
hsv1_75000-80000_6_LEFT	CCTATGGRATGTACACGCCGGT
hsv1_75000-80000_6_RIGHT	AAAAARAACATACACCAATGGGTCT
hsv1_75000-80000_7_LEFT	AAATAAACCAGGTAATACCAAACAAGAC
hsv1_75000-80000_7_RIGHT	GATGATACGGTACATGGCCCTG
hsv1_75000-80000_8_LEFT	ACACACAAARGCGTACCAAAC
hsv1_75000-80000_8_RIGHT	GTGTCCTCCTTCATGTCCAACC
hsv1_75000-80000_9_LEFT	GTTAGMGGGTACAGGGCCTTCA

hsv1_75000-80000_9_RIGHT	TACTTCGAGGAGTACGCGTACT
hsv1_75000-80000_10_LEFT	ATGTTGAGGTCGATGAAGGTGC
hsv1_75000-80000_10_RIGHT	TACGTACAACCACATACAGCGC
hsv1_75000-80000_11_LEFT	CTGATGCGCATCGAGTTTTGGA
hsv1_75000-80000_11_RIGHT	GTACAACGCGACGCACATYAAG
hsv1_75000-80000_12_LEFT	GTTGCTGAGAAGGGGCTGGTAC
hsv1_75000-80000_12_RIGHT	GACTTTGTGTACATGTCCCCGT
hsv1_75000-80000_13_LEFT	GTAGAAGCCGTCRACCTGCTTG
hsv1_75000-80000_13_RIGHT	CGTACAAGTTCAAGGCCACCAT
hsv1_75000-80000_14_LEFT	CTCCTCGACGATGCAGTTTACC
hsv1_75000-80000_14_RIGHT	CRAACTTTTACGTGTGCCACC
hsv1_103000-110000_1_LEFT	TGTCAAAGTTCATCTCCCAGGC
hsv1_103000-110000_1_RIGHT	ATCTGAAGACCCCTGCTGAAGGT
hsv1_103000-110000_2_LEFT	TCTCCGTCTGGTCCAMCAGAAT
hsv1_103000-110000_2_RIGHT	ACGACGGGTTTATCGACTACCA
hsv1_103000-110000_3_LEFT	GCCTCGTGGTAGTCGATAAACC
hsv1_103000-110000_3_RIGHT	GAGAGCATGCCTCCCTGATCCA
hsv1_103000-110000_4_LEFT	CATCTTCTCTCSAGGTCGGCG
hsv1_103000-110000_4_RIGHT	CTTCGTGGTGGTCTGAAGAAC
hsv1_103000-110000_5_LEFT	GCGAAGAAGTGC AAGAGAAACG
hsv1_103000-110000_5_RIGHT	GACATTAACGACCARCAGGCGC
hsv1_103000-110000_6_LEFT	GCGCCTGYTGGTCGTTAATGTC
hsv1_103000-110000_6_RIGHT	CGCTTCTGTATAGAGTCCAGGC
hsv1_103000-110000_7_LEFT	AAAAGTACTCCTTAACCGCGCC
hsv1_103000-110000_7_RIGHT	GCTGGAGTTTACCCTGARCATG
hsv1_103000-110000_8_LEFT	ACCGATCAGAGAGTTTCGTCC
hsv1_103000-110000_8_RIGHT	GACTTCGGGGGAGAAAACGAAA
hsv1_103000-110000_9_LEFT	TTTCGTTTTCTCCCCGAAGTC
hsv1_103000-110000_9_RIGHT	CTGACGTATTACACCCGCRATC
hsv1_103000-110000_10_LEFT	GTCATCTTCTTCGRCCGCCTCT
hsv1_103000-110000_10_RIGHT	GTCGTACACGCTCCTAACCATT
hsv1_103000-110000_11_LEFT	GCCRTGCGGGTCAAAAAGGTAT
hsv1_103000-110000_11_RIGHT	CTCGTAGCCTAATCAGGGGAAC
hsv1_103000-110000_12_LEFT	GTATACGCGCGAGAAGACACAG
hsv1_103000-110000_12_RIGHT	CCCACGACTTGCCATTAACTA
hsv1_103000-110000_13_LEFT	CACACCATAACACCGAGAMCAAC
hsv1_103000-110000_13_RIGHT	CGAGTTTGTCCAGGA ACTCCAC
UL23_1_LEFT_P1	AAGAAACGCGGGCGTATTGGTC
UL23_1_RIGHT_P1	GGGGAMACGTTATTTACCCTGT
UL23_2_LEFT_P2	GATAAAGACGTGCATGGGACGG
UL23_2_RIGHT_P2	CGRTACCTTATGGGCAGCATGA
UL23_3_LEFT_P1	GATACCGCACCGTATTGGCAAG

UL23_3_RIGHT_P1	ACATCTACACCACACAACACCG
UL23_4_LEFT_P2	TGTTATCTGGGCGCTTGTCATT
UL23_4_RIGHT_P2	AGATCTTGGTGCGTGAAACTC
UL23_5_LEFT_P1	GGCTCGGGTACGTAGACGATAT
UL23_5_RIGHT_P1	GAATTCGAACACGCAGATGCAG
UL30_2_LEFT_P2	TATGTACACTTTACCTGGGGGC
UL30_2_RIGHT_P2	ACCGGAAAACATCGCGGTTGTT
UL30_3_LEFT_P1	GTCCGGTAATTTGCCATCCCA
UL30_3_RIGHT_P1	CCAGGATGTCRTACACGTGAAA
UL30_4_LEFT_P2	ACCCAGCGCCATACGTACTATA
UL30_4_RIGHT_P2	ATTGTAGGTGCCTGTACRACCTC
UL30_5_LEFT_P1	ACGCGGCAGTACTTTTACATGA
UL30_5_RIGHT_P1	CACATGAGCTTGATGCCGGTA
UL30_6_LEFT_P2	GCCATCAAGAAGTACGAGGGTG
UL30_6_RIGHT_P2	TCATGAAGGCCAACAGCATCTC
UL30_7_LEFT_P1	TATCCTGTCTGCTCTACGACCT
UL30_7_RIGHT_P1	GCTCAGGTCCTTCTTGTGCC
UL30_8_LEFT_P2	ACATTTACAAGGTCCCCCTGGA
UL30_8_RIGHT_P2	CTGGGTGTCCGGCAGAATAAAG
UL30_9_LEFT_P1	TTGGCGGGTATTAACATCACCC
UL30_9_RIGHT_P1	CGTGAGCCTTGACGAAGAACAG
UL30_10_LEFT_P2	GTTTCTGACTTTGCCAGCCTGTAC
UL30_10_RIGHT_P2	AGATGATGCGCATGGAATAGGG
UL30_11_LEFT_P1	GCCATCAAGGTCGTGTGTAAC
UL30_11_RIGHT_P1	CCTGGAGGTGCGGTTGATAAAC
UL30_12_LEFT_P2	GCTGTTTCTGYCCCCATCAA
UL30_12_RIGHT_P2	GTACGGGATCCKGTCCTTGATG
UL30_13_LEFT_P1	AGAGGGACATCCAGGACTTTGT
UL30_13_RIGHT_P1	CTCTCGGTGATCTTGGCGTTAT
UL30_14_LEFT_P2	CGCCCTGAACACGGACTATTAC
UL30_14_RIGHT_P2	GTTTTACCCGGACCCCACTTAC

Tableau 7 : Séquences des amorces

b) Préparation des amorces

J'ai ensuite commandé les amorces que l'on reçoit lyophilisées. Il faut donc les régénérer et pour cela mettre un volume de TE précisé sur l'étiquette pour chaque amorce.

La dernière étape est de mélanger les amorces pour créer des pools. Les amorces impaires forment le pool 1 et les paires le pool 2. Pour cela il faut introduire pour chaque

amorce 50 µl si elle n'est pas dégénérée et 100 µl si elle l'est. J'ai alors obtenu 10 pools d'amorces :

- Zone nt 69 000 à nt 73 000 : Pool 1
- Zone nt 69 000 à nt 73 000 : Pool 2
- Zone nt 75 000 à nt 80 000 : Pool 1
- Zone nt 75 000 à nt 80 000 : Pool 2
- Zone nt 103 000 à nt 110 000 : Pool 1
- Zone nt 103 000 à nt 110 000 : Pool 2

c) Sélection des échantillons

J'ai choisi de travailler sur des prélèvements de patients positifs à l'HSV 1 en PCR de routine au laboratoire de virologie de l'IHU méditerranée infection. Parmi ces patients j'ai sélectionné des prélèvements d'origines diverses et contenant des quantités de virus différentes (évaluées à l'aide du Ct) afin d'évaluer la sensibilité de ma technique.

La première série de sept patients a été un test afin d'évaluer la fonctionnalité de mes amorces et de la PCR.

NUMERO D'ECHANTILLON	SITE DE PRELEVEMENT	rt-PCR ROUTINE IHU (Résultat)	PCR STANDARD (Résultat)
9072022059	Vaginal	13 Ct	Réussite
9092206905	Vaginal	15 Ct	Réussite
0042859369	Vaginal	14 Ct	Réussite
9122497266	Cutané	19 Ct	Réussite
0042916275	Cutané	17 Ct	Réussite
0042900270	Endobuccal	16 Ct	Réussite
0012533157	LBA	23 Ct	Échec

Tableau 8 : Liste des échantillons utilisés pour les PCR et le séquençage test

Après vérification de la fonctionnalité de ma technique, la deuxième série m'a permis de tester un plus grand nombre d'échantillons.

	NUMERO D'ÉCHANTILLON	SITE DE PRELEVEMENT	rt-PCR ROUTINE IHU (Résultat)	PCR STANDARD (Résultat)
P L A Q U E 1	7120164321	Sang EDTA	24 Ct	Réussite
	7120232491	Cutané	17 Ct	Réussite
	8010292745	Cutané	20 Ct	Réussite
	8020367032	Sang EDTA	18 Ct	Réussite
	8020396540	Vaginal	17 Ct	Réussite
	8050672776	Vaginal	15 Ct	Réussite
	8050674123	Vaginal	17 Ct	Réussite
	8070876327	Vaginal	15 Ct	Réussite
	8070880251	Sérum	14 Ct	Échec
	8070919969	Vaginal	19 Ct	Réussite
	8070920784	Endobuccal	19 Ct	Réussite
	8101161685	Sérum	22 Ct	Réussite
P L A Q U E 2	8111221403	Ophthalmique	24 Ct	Réussite
	9092181889	Vaginal	17 Ct	Réussite
	9092196584	Vaginal	17 Ct	Réussite
	9102284441	Cutané	18 Ct	Réussite
	9122437418	Urètre	19 Ct	Réussite
	9122464836	Endobuccal	15 Ct	Réussite
	9122490210	LBA	20 Ct	Échec
	0012565907	Endobuccal	23 Ct	Réussite
	0012599703	Cutané	21 Ct	Réussite
	0022616954	Cutané	19 Ct	Réussite
	0022630650	Vaginal	15 Ct	Réussite
	003282079	Pharyngé	16 Ct	Réussite
P L A Q U E 3	0042909467	Endobuccal	18 Ct	Réussite
	0052992120	Cutané	20 Ct	Réussite
	0050032079	Vaginal	16 Ct	Réussite
	0050039742	Endobuccal	21 Ct	Réussite

Tableau 9 : Liste des échantillons utilisés pour les PCR et le séquençage

d) Protocole

Le protocole (cf infra) se décline en plusieurs grandes étapes.

L'étape préliminaire est celle de l'extraction de l'ADN à partir des prélèvements de patients. Afin de pouvoir être certain à posteriori que l'extraction a bien été faite, on introduit dans le prélèvement de départ des témoins d'extractions (T4 est le témoin d'ADN et MS2 est le témoin d'ARN). Ces témoins seront recherchés en cas d'échec de la PCR si l'on suspecte une mauvaise extraction.

La PCR s'inspire d'un protocole déjà existant.⁴¹ Il est nécessaire de faire ensuite migrer les produits par électrophorèse sur gel d'agarose. Cela permet de s'assurer du succès de la PCR. On pourra ainsi retrouver les différentes séquences d'ADN qui sont comparées à un témoin de poids moléculaire.

La purification de l'ADN permet d'éliminer le reste d'amorces et de nucléotides encore présent dans l'échantillon.

La quantification de l'ADN permet de connaître la quantité d'ADN présente pour chaque séquence (les 3 zones et gènes UL23 et UL30). A partir de cette quantification je peux ajuster les volumes à introduire dans le tube final pour le séquençage. Chaque séquence doit être en concentration équivalente (mélange équimolaire) ; on ajuste donc le volume en fonction de la concentration.

PROTOCOLE	
Extraction : Kit virus QIAGEN de l'EZ 1	<ul style="list-style-type: none"> - Tube échantillon : 90 µl de prélèvement + 10 µl de T4 /MS2 - Tube carrier : 60 µl de buffer + 10 µl de polyacrylamide linéaire <p>Quantité éluee : 60 µl</p>
PCR⁴¹	<p><u>Étape 1</u> : Préparer le mix : <i>pour 1 échantillon</i> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 12,5 µl de master mix (Q5 High fidelity 2x Master mix, biolabsinc) contenant la Q5 DNA polymerase - 8,5 µl d'eau stérile - 8,5 µl de pool d'amorces <p><u>Étape 2</u> : introduire le mix dans les puits de PCR puis y introduire 2,5 µl d'extrait d'ADN.</p> <p><u>Étape 3</u> : Après centrifugation de la plaque, lancer la PCR sur le thermocycler (2720 thermal cycler Applied Biosystems) :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 98°C pendant 30 secondes - 40 cycles de 15 secondes à 98°C et 5 minutes à 65°C - 4°C jusqu'à récupération de la plaque
Gel d'agarose	<p><u>Étape 1</u> : Préparer de l'Agar 2% en mélangeant 4g d'agar pour 200 ml de TBE (10 %) puis chauffer jusqu'à dilution.</p> <p><u>Étape 2</u> : Après refroidissement, introduire 20 µl de SyBR safe DNA gel stain</p> <p><u>Étape 3</u> : Couler le gel et attendre sa solidification</p>
Électrophorèse sur gel d'agarose	<p><u>Étape 1</u> : introduire le gel d'agarose dans la cuve à électrophorèse ainsi que du TBE jusqu'à ce que le gel soit recouvert</p> <p><u>Étape 2</u> : Mélanger 5 µl de tampon de charge avec 5 µl de produit de PCR (changement de couleur du tampon de charge du marron au bleu)</p> <p><u>Étape 3</u> : Introduire 8 µl du mélange tampon de charge + produit de PCR dans les puits du gel d'agarose</p> <p><u>Étape 4</u> : Introduire 8 µl de témoin de poids moléculaires dans les puits de gel d'agarose</p> <p><u>Étape 5</u> : Migration à 135 V et 93 mA</p> <p><u>Étape 6</u> : Lecture à la lampe UV</p>
Purification de l'ADN : kit Monarch PCR & DNA cleanup kit	<p><u>Étape 1</u> : déposer les 20 µl restant de produits de PCR des pools 1 et 2 dans un tube puis ajouter 200 µl de clean up binding buffer</p> <p><u>Étape 2</u> : transférer le contenu des tubes dans la colonne de purification (introduite préalablement dans un tube « poubelle ») puis centrifuger 1 minute à 13 000 rpm.</p>

	<p><u>Etape 3</u> : changer le tube poubelle puis faire 2 lavages successifs : 200 µl de solution DNA wash buffer puis centrifuger 1 minute à 13 000 rpm.</p> <p><u>Etape 4</u> : Eluer 2 fois la colonne : 10 µl d'éluant (DNA elution buffer) puis centrifuger 1 minute à 13 000 rpm.</p>
Quantification de l'ADN	<p>Appareil <i>Nanodrop 1000 (thermo scientific)</i></p> <p><u>Etape 1</u> : Initialisation : déposer 1,5 µl d'eau distillée</p> <p><u>Etape 2</u> : Faire le blanc : déposer 1,5 µl de DNA elution buffer</p> <p><u>Etape 3</u> : Effectuer les mesures : pour chaque échantillon déposer 1,5 µl</p>
Calcul	Calcul des volumes à introduire dans le tube final en fonction des concentrations : chaque séquence doit être en concentration équivalente dans le produit final.
Poolage	<p>Introduire le volume défini par calcul dans le tube final.</p> <p>1 tube = 1 patient = 5 séquences d'ADN</p>
Préparation du séquençage	<p><u>Etape 1</u> : Construction d'une librairie : fragmentation de l'ADN à séquencer par sonication (ultrason) afin d'obtenir des fragments d'environ 200 pb. Ces fragments sont liés à un adaptateur (biotine).</p> <p><u>Etape 2</u> : Amplification en émulsion à l'aide de billes d'huile dans l'eau recouvertes d'amorces permettant d'amplifier le brin anti sens après hybridation des amorces. En parallèle dans le milieu se trouvent des amorces permettant d'amplifier le brin sens. Les cycles de PCR sont les mêmes que ceux d'une PCR classique (dénaturation des fragments de la librairie, hybridation des amorces et élongation de l'ADN). Ces cycles sont répétés 30 à 60 fois pour finalement obtenir des billes avec une multitude de brins d'ADN bicaténaire fixés. La biotine liée à l'ADN amplifié va se lier à l'avidine. Le complexe biotine/streptavidine va permettre grâce à un aimant, de séparer l'ADN bicaténaire en deux brins monocaténaire disponibles pour le séquençage.</p> <p>Une bille correspond à 1 read. Le nombre de billes définira donc le nombre de reads du séquençage.</p>
Séquençage	NGS technique ion torrent

Figure 17 : Protocole de préparation des échantillons pour le séquençage

A l'issue de l'essai, je me suis rendue compte que le gène UL23 était compris dans la zone du nucléotide 69 000 au nucléotide 75 000. J'ai donc décidé pour la suite de ne plus utiliser les amorces du gène UL23.

2. Sources d'échec d'une PCR

Les sources d'échecs des PCR sont multiples, elles peuvent être liées à des problèmes dans la PCR elle-même, à la présence d'inhibiteurs de PCR ou à un défaut dans le système de détection des produits de PCR.¹³⁶

- Inhibiteurs de PCR

Les inhibiteurs de PCR peuvent être organiques (ex sel biliaires, urée, phénol...) ou inorganiques (ex calcium) et sont retrouvés dans les échantillons biologiques (organes, liquides biologiques, selles...), les aliments (viande, lait, fruits, légumes, fruits de mer...) et l'environnement (sol, air, eau). Il existe de multiples mécanismes par lesquels ils inhibent les PCR.

Ils peuvent être ajoutés au cours de la manipulation ainsi que de l'extraction comme c'est le cas pour la poudre contenue dans les gants et différents sels comme le chlorure de sodium et le chlorure de potassium.

Le contact entre les surfaces polymères et le plastique des tubes avec les réactifs chimiques de PCR peuvent diminuer la sensibilité. Ainsi le matériel et les conditions de transport (notamment les milieux de transport) ont une influence sur celle-ci.

Le sarkosyl, l'éthanol, l'alcool isopropylique et les phénols sont des substances utilisées pour la lyse cellulaire ou la préparation des acides nucléiques. Elles peuvent néanmoins inhiber les PCR à partir d'une certaine concentration.

L'inhibition de la PCR peut provenir de la dégradation de l'acide nucléique par des nucléases capables de dégrader l'ADN et l'ARN.

En ce qui concerne l'inhibition affectant l'ARN les sources sont multiples. L'ARN nécessite une rétro transcription préalable qui peut être inhibée par la mélanine. Les IgG sériques, l'hémoglobine, la lactoferrine et l'héparine l'affectent directement. Il peut être rendu moins disponible à l'amplification d'une part par les phénols qui condition oxydante peuvent établir des liaisons intra ARN ou d'autre part par les polysaccharides qui diminuent la capacité à re-suspendre l'ARN.

L'hybridation des amorces à l'ADN peut être perturbée par compétition des inhibiteurs avec l'ADN au moment de la liaison aux amorces. Un design correct des amorces permet de limiter ce phénomène.

L'urée et les phénols peuvent dégrader l'ADN polymérase. Son activité peut également être inhibée par le calcium, le collagène, l'hématine et l'acide tannique. La mélanine forme un complexe réversible avec celle-ci ce qui l'empêche d'être active. Les polysaccharides peuvent perturber la réaction enzymatique par analogie de structure avec l'acide nucléique. L'acide humique réagit avec l'ADN et l'ADN polymérase et empêche ainsi la réaction enzymatique, même à faible concentration.

Les cofacteurs de l'ADN polymérase peuvent être eux aussi la cible des inhibiteurs. En effet le calcium entraîne une inhibition compétitive du magnésium en se liant à sa place à l'ADN polymérase. Les agents complexant le magnésium (par exemple l'acide tannique ou l'EDTA qui est retrouvé dans plusieurs buffer d'élution et des kits de purification) diminuent sa quantité disponible pour la réaction enzymatique. Dans ces deux cas le magnésium ne peut plus être cofacteur de l'ADN polymérase, ce qui diminue son activité.

Une amplification avec une polymérase insensible à ces substances permet de contourner le problème. Ainsi, pour la plupart des ADN polymérases utilisées les concentrations inhibitrices des différents inhibiteurs ont été déterminés et peuvent ainsi être précisées par le fournisseur.

L'amplification peut être affectée par des hormones, des antiviraux (comme l'aciclovir) ainsi que certains additifs des mix (le dithiothreitol, le diméthyl sulfure et le mercaptoéthanol) à certaines concentrations.

Les problèmes peuvent également provenir de la détection de l'ADN ; Lors des PCR en temps réel, les inhibiteurs peuvent soit interférer avec les sondes fluorescentes soit augmenter le bruit de fond de fluorescence ce qui entraîne une diminution de la sensibilité de détection.

De nombreux inhibiteurs sont retrouvés directement dans les prélèvements biologiques. Dans le sang, le sérum ainsi que le plasma on peut retrouver des IgG, de l'hémoglobine, de la lactoferrine et des anticoagulants comme l'héparine. Dans l'urine on retrouve l'urée dont l'effet inhibiteur est dépendant de sa concentration et s'observe qu'à partir de 50 mmol/L. La composition des selles est très variable en fonction du régime alimentaire, de la flore digestive et de l'environnement du patient. On peut y retrouver des polysaccharides, de la chlorophylle (herbes et légumes), des sels biliaires, de l'urée, des glycolipides, de l'hémoglobine et de l'héparine. Les inhibiteurs les plus importants retrouvés dans la bile sont les sels et les acides biliaires. Les prélèvements ophtalmiques ainsi que les tissus musculaires contiennent de la myoglobine.¹³⁷

- Défaut d'amplification

Les sources pouvant entraîner des défauts d'amplification sont multiples.

D'un point de vue général, l'erreur peut venir des réactifs, il faut donc s'assurer qu'ils fonctionnent sur d'autres PCR. La programmation du thermocycler doit être adéquate car l'erreur peut provenir de celle-ci. L'évaporation de l'échantillon est également une source de défaut d'amplification, il faut donc vérifier que le couvercle des plaques et celui du thermocycler soient bien fermés et regarder le volume au fond des puits à la fin de la PCR.

La spécificité des amorces est très importante. Il est donc conseillé d'utiliser un logiciel de design des amorces et de les modifier en cas de défaut de spécificité.

L'ADN du prélèvement peut être dégradé ce qui entraîne un défaut d'amplification. Il est alors nécessaire de vérifier l'intégrité de celui-ci, par exemple par une PCR de routine dont le système fonctionne parfaitement. L'ADN peut également être en quantité insuffisante ce qui ne permet pas l'amplification.

Une amplification insuffisante peut être due à une mauvaise température, il faut alors essayer de l'augmenter de 2°C.

La durée et le nombre de cycles de PCR sont très importants. L'élongation et la dénaturation ne doivent pas être trop courtes. L'élongation doit être équivalente en minutes à la taille de l'amplicon en kilo bases et en cas de dénaturation trop courte il faut ajouter deux minutes. Il est nécessaire d'augmenter le nombre de cycle à cinq de plus en cas d'amplification insuffisante pour laquelle il est suspecté un nombre de cycles insuffisant.

Les concentrations en $MgCl_2$ et KCl sont importantes. Afin d'optimiser celle en $MgCl_2$ il faut effectuer une série de PCR contenant des concentrations variables de Mg^{2+} allant de 1,5mM à 5,0 mM en augmentant d'un gradient de 0,5 mM.

Les dNTPs nécessaires à l'élongation ne doivent pas être dégradés. Pour s'assurer de leur intégrité il est possible de faire une réaction contrôle avec le lot utilisé précédemment et avec un nouveau lot. En cas d'un taux excessif de dNTPs la PCR peut être inhibée.

En cas de problème au niveau de l'ADN polymérase le lot doit être changé.¹³⁶

- Mauvaise amplification

- Formation de dimères d'amorces

En cas de formation de dimères d'amorces il faut vérifier la spécificité de celles-ci grâce au logiciel de design d'amorces et les modifier en cas de besoin. Une augmentation de la température d'hybridation ou une diminution de la concentration en Mg^{2+} peuvent être également nécessaires. La concentration optimale en amorce est comprise entre 0,1 et 1 μM .¹³⁶

- Formation de nombreux produits de petite taille fortement amplifiés

Les amorces peuvent amplifier des séquences répétées dans l'ADN initial, il est donc nécessaire d'utiliser le logiciel BLAST pour aligner les séquences d'amorces avec l'ADN de référence et de modifier les amorces si besoin.¹³⁶

Des conditions non optimales peuvent en être responsables, elles peuvent être multiples. Il peut être utile d'augmenter la température ou la durée de la phase d'hybridation et/ou d'élongation, de diminuer le nombre de cycles au nombre minimum permettant d'amplifier l'ADN, d'avoir une concentration de KCl comprise entre 70 et 100 mM ainsi qu'une concentration en $MgCl_2$ de 1.75 mM, de diminuer la quantité d'amorces, d'ADN de départ ou de taq DNA polymérase.¹³⁶

- Formation de produits de plusieurs tailles différentes formant une trainée sur le gel

Cela peut se produire si la concentration des amorces, de la taq polymérase et de l'ADN de départ est trop importante, dans ce cas il faut effectuer une série de PCR contenant progressivement une concentration plus basse d'amorces et/ou de taq polymérase. Cette formation peut être également due à une hybridation non spécifique des amorces qui peut être éliminée par méthode de PCR « hot start DNA polymerase ». Une concentration en Mg^{2+} non optimale peut également en être la cause, il convient alors de l'optimiser en effectuant des PCR avec concentration allant de 1,5 à 5 mM avec un gradient de 0.5 mM.¹³⁶

- Alternative pour réduire les causes d'échecs
 - Élimination des inhibiteurs de PCR

La dilution des échantillons ou de l'extrait d'acide nucléique permettant de diluer également les inhibiteurs est une solution qui peut être utilisée mais il ne faut pas perdre de vue le fait que cela diminue aussi la sensibilité de la technique.

Afin d'éliminer les inhibiteurs présents dans les prélèvements, plusieurs techniques existent.

L'urine peut être filtrée par dialyse ou ultrafiltration ce qui permet l'élimination de l'urée. Les échantillons peuvent être séparés des inhibiteurs par chromatographie dont il existe différentes colonnes permettant d'éliminer les sels et les petites protéines comme les polysaccharides (par exemple dans le liquide séminale ou les selles)

L'inhibition par les phénols peut être réduite en utilisant du polyvinylpyrrolidone les faisant précipiter ou par une forte concentration de borate protégeant l'ARN de leurs effets. Afin de diminuer l'inhibition par le calcium il est possible soit de le chélater, soit d'ajouter du magnésium dans le mix. Le traitement par du carbone activé élimine les sels et les urates.

L'isolement de l'acide nucléique élimine en grande quantité les inhibiteurs. Il peut se faire à l'aide de billes magnétiques de silice ou par méthode immunocapture du pathogène mais cette technique ne fonctionne pas pour les virus hypervariables du fait de l'utilisation d'anticorps.

Certaines méthodes d'extractions permettent d'éliminer des inhibiteurs comme par exemple l'extraction répétée en colonne de silice. L'extraction au phénol chloroforme est plus spécifique car elle diminue la quantité de lipides ainsi que l'extraction répétée en colonne de silice.

La composition du mix est importante. Il faut s'assurer de l'absence d'éthanol¹³⁶. Il est possible d'ajouter des substances permettant d'inactiver l'action des inhibiteurs.

Le choix de l'ADN polymérase et d'un système de rétro transcription approprié est très important ; en effet certaines mutations dans le gène de l'ADN polymérase peuvent court-circuiter l'inhibition par le sang, le plasma, l'hémoglobine, la lactoferrine, les IgG sériques et l'acide humique.¹³⁷

- « Touchdown PCR »

Ce protocole de PCR permet une diminution des hybridations non souhaitées durant le premier cycle de PCR et une augmentation de la spécificité des amorces. Cela consiste en un premier cycle avec une température d'hybridation 5 à 10°C supérieure au T_m (température de demi-dénaturation) calculé des amorces. Les cycles suivant se feront avec une température d'hybridation diminuant au fur et à mesure pour arriver progressivement à 2 à 5°C sous le T_m des amorces.¹³⁸

- « Hot start PCR »

Ce protocole de PCR permet d'augmenter le rendement du produit de PCR ainsi que de diminuer les amplifications non spécifiques et la formation de dimères d'amorces. Cela consiste à n'ajouter l'ADN polymérase ou les amorces qu'au moment où le mix a atteint une température inhibant l'hybridation des amorces entre elles ou à des séquences non spécifiques.¹³⁹

3. Résultats des PCR

- Analyse des produits de PCR

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de faire migrer les produits de PCR en fonction de la taille des séquences d'ADN amplifiées. Ainsi un signal intense sera signe que la séquence d'ADN cible a bien été amplifiée.

Les photographies ci-dessous après migration de l'électrophorèse montrent que les PCR n°0012533157, 8070880251 et 9122490210 n'ont pas fonctionné. Les causes possibles de ces échecs de PCR seront discutées par la suite.

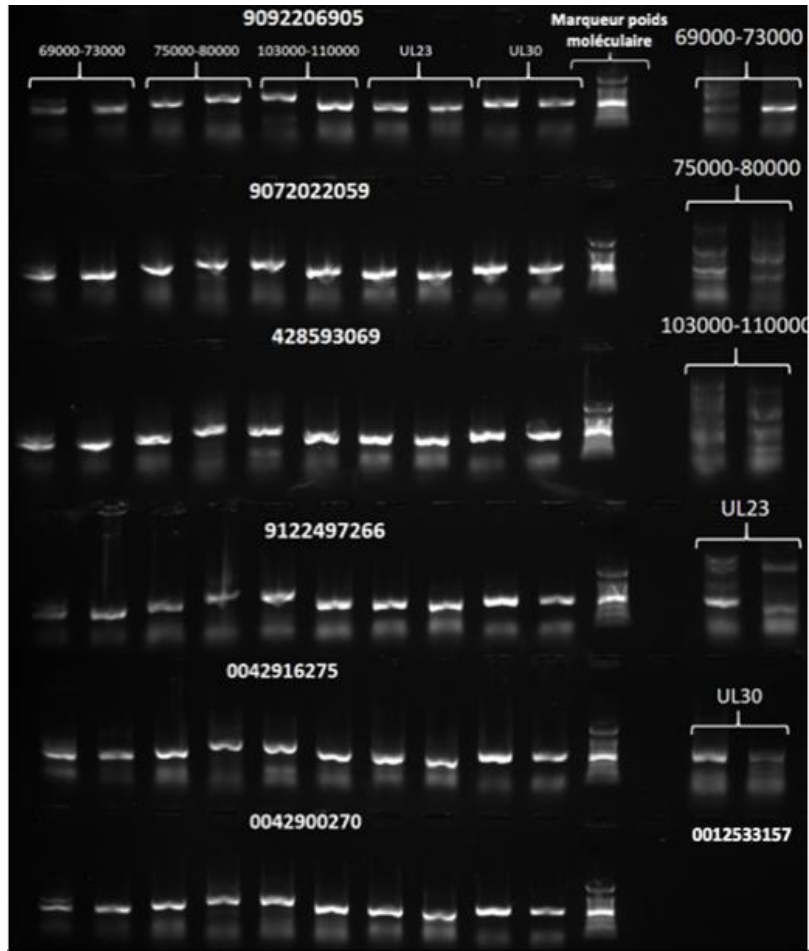


Figure 18 : Migration des produits des PCR test

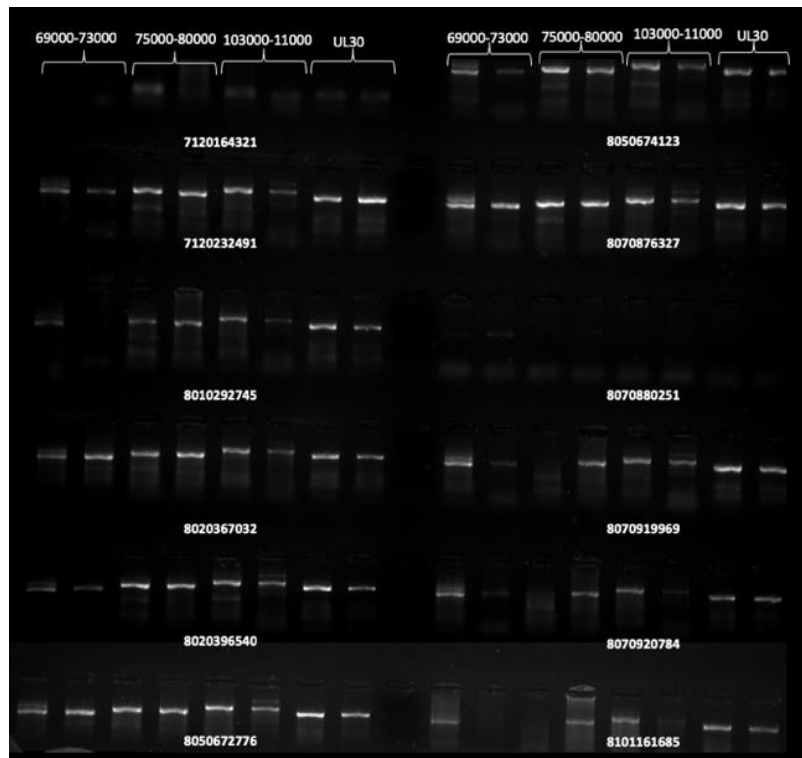


Figure 19 : Migration des produits de PCR de la plaque n°1



Figure 20 : Migration des produits de PCR de la plaque n°2

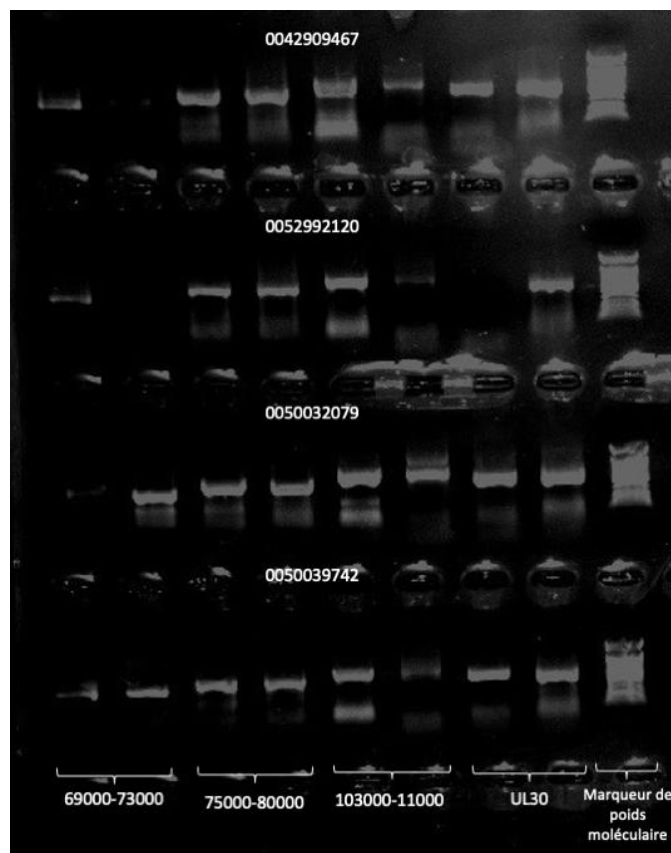


Figure 21 : Migration des produits de PCR de la plaque n°3

Les graphes ci-dessous montrent que plus la charge virale est élevée (Ct faible en PCR en temps réel) mieux la PCR fonctionne et que les échecs de PCR sont retrouvés uniquement dans des prélèvements de LBA (charge virale faible) ou de sérum.

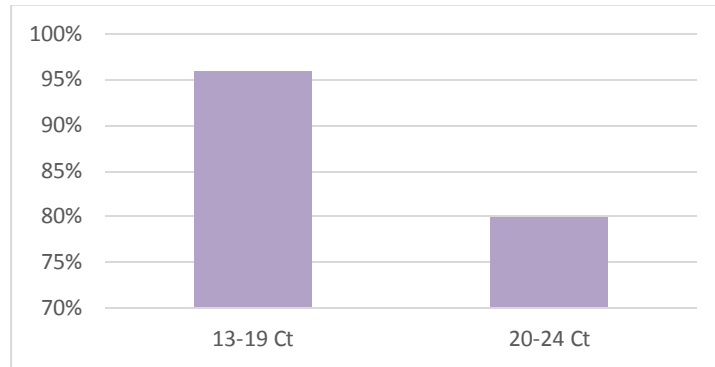


Figure 22 : Pourcentage de réussite des PCR en fonction du Ct

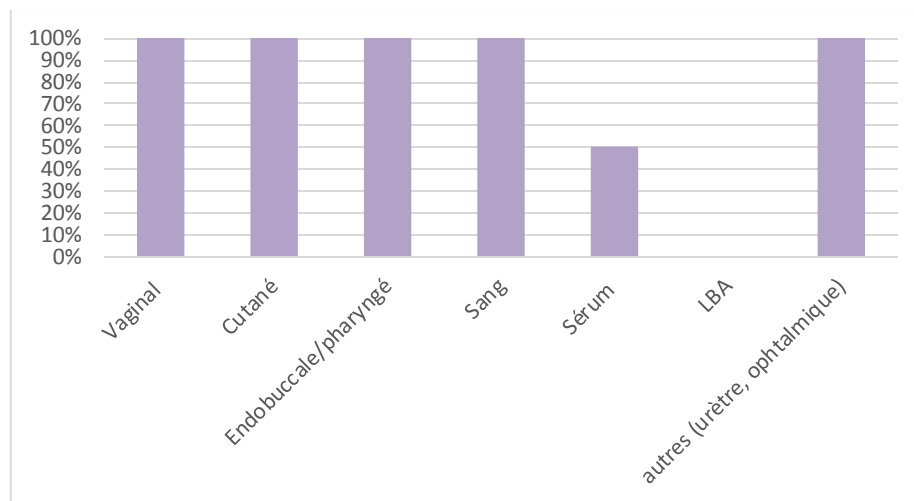


Figure 23 : Pourcentage de réussite des PCR en fonction de l'origine du prélèvement

- Probables sources d'échecs de mes PCR

Les échantillons sont conservés à l'IHU dans des congélateurs à -70°C. Cependant ceux-ci peuvent être congelés et décongelés plusieurs fois si besoin par le laboratoire de diagnostic, ce qui favorise la dégradation de l'ADN.

On peut supposer qu'une quantité insuffisante d'ADN peut être la cause d'un échec. Cependant certains échantillons avec des charges virales faibles donnent tout de même de bons résultats de PCR.

Les inhibiteurs sont très présents dans le sérum, ce qui explique qu'une seule PCR sur sérum parmi les 2 ai réussi. Cependant il n'y a pas d'inhibiteur de PCR connu dans le LBA, seule la charge virale faible de ces prélèvements peut expliquer.

- Propositions pour l'amélioration de mes PCR

Des échecs directement liés au système de PCR sont peu probables étant donné qu'il n'y a eu que 3 échecs sur 35. Mais le système peut tout de même être amélioré.

Le kit de PCR utilisé est celui correspondant au logiciel *primal scheme* ce qui permet d'avoir des concentrations de $MgCl_2$ et de KCl adéquates pour l'utilisation de mes amorces. Il serait intéressant de tester d'autres kits afin de savoir si mon protocole et mes amorces sont adaptables à ceux-là. Le fait d'utiliser au laboratoire de kits ne permet pas de moduler les concentrations en $MgCl_2$ et de KCl en cas d'échecs.

Il pourrait être également utile de modifier les paramètres d'amplification sur le thermocycler comme le nombre de cycles, la température ou la durée d'hybridation et d'élongation afin de comparer les résultats au protocole initial et d'évaluer ces paramètres.

Les quantités de mix, d'amorces ou d'extrait d'ADN peuvent aussi être modifiées.

Il est important d'évaluer la performance de tous les nouveaux protocoles.

Il serait également intéressant de développer un contrôle interne pour ma technique, en utilisant la même enzyme pour amplifier le T4 (contrôle ADN) ce qui permettrait ainsi de contrôler la réussite de l'extraction.

- Dosage de la quantité d'ADN au nanodrop après purification

Une fois la purification de l'ADN effectuée il est nécessaire de mesurer la concentration en acides nucléiques. Cela permet par la suite de calculer la quantité d'échantillon à introduire dans le tube lorsque l'on pool tous les segments d'ADN entre eux. En effet les concentrations finales doivent être équimolaires pour le séquençage. Dans le cas contraire les fragments d'ADN plus concentrés vont être d'autant plus séquencés et le séquençage va être mis en échec pour les moins concentrés.

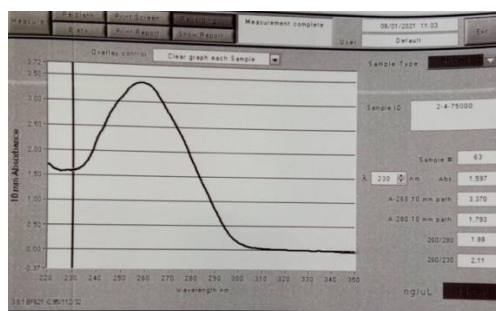


Figure 24 : Dosage de la quantité d'ADN au nanodrop

- Série 1 :

	69000-73000	75000-80000	103000-110000	UL23	UL30
9092206905	74,6	76,3	129,4	113,4	61,6
9072022059	68,1	68,4	111,2	102,4	55,7
0042859369	60,6	46,5	93,4	188,9	51,2
9122497266	77	84,3	123,8	123	113,3
0042916275	91	82,9	62,6	182,3	61,2
0042900270	126,9	71,1	125,2	116	51,4

Figure 25 : Concentration d'ADN en ng/ μ l

	69000-73000	75000-80000	103000-110000	UL23	UL30
9092206905	20	20	20	3	20
9072022059	20	20	20	3	20
0042859369	14	20	15	3	14
9122497266	20	20	20	3	11
0042916275	7,8	10,8	20	3	10
0042900270	10	20	16	3	20

Figure 26 : Quantités d'échantillon à introduire en μ l

- Série 2 :

	69000-73000	75000-80000	103000-110000	UL30
7120164321	88,7	54,2	16,2	38,9
7120232491	73,1	74,7	82,9	80
8010292745	68,2	62,6	62,6	68,5
8020367032	82,6	92,2	75,2	64,8
8020396540	51,1	88,8	90,7	58,8
8050672776	108,7	117,8	92,9	61,2
8050674123	52,1	80,8	69,5	61,3
8070876327	68,2	60,8	79,5	55,1
8070919969	52,3	65	79,9	47,7
8070920784	70	98,2	115,2	64,9
8101161685	30,8	68,4	29,2	80,8
8111221403	82,9	100,3	46	85,1
9092181889	95	80,7	50,6	24,8
9092196584	34,6	36,3	42,8	38,4
9102284441	107,8	168,5	57	66,3
9122437418	52,9	53,9	94,4	66,7
9122464836	90,3	102,9	109,6	63,8
0012565907	48,2	68,2	43,7	49,8
0012599703	49,3	61,7	84	30,7
0022616954	39	67,2	105,9	38,5
0022630650	191,4	123,5	145,3	101,3
0032802079	123	82,4	151,1	105,6
0042909467	105,4	85	121,42	103,34
0052992120	149,1	125,9	37,2	38
0050032079	136,7	78,25	163,5	84,7
0050039742	133,6	182,4	169,5	99

Figure 27 : Concentration d'ADN en ng/ μ l

	69000-73000	75000-80000	103000-110000	UL30
7120164321	4	7	20	10
7120232491	20	20	17	18
8010292745	20	20	20	20
8020367032	16	14	17	20
8020396540	20	12	11	17
8050672776	11	10	13	20
8050674123	11	10	13	20
8070876327	16	18	14	20
8070919969	18	15	12	20
8070920784	18	15	12	20
8101161685	20	9	20	7
8111221403	11	9	20	11
9092181889	5	6	10	20
9092196584	20	19	16	18
9102284441	11	7	20	17
9122437418	20	20	11	16
9122464836	14	12	12	20
0012565907	18	13	20	18
0012599703	12	10	7	20
0022616954	20	11	7	20
0022630650	11	16	14	20
0032802079	13	20	11	16
0042909467	16	20	14	16
0052992120	5	6	20	20
0050032079	11	20	10	18
0050039742	15	11	12	20

Figure 28 : Quantités d'échantillon à introduire en μ l

4. Résultats du séquençage

Afin d'obtenir une séquence exploitable il faut un nombre de reads aux alentours de 200 000.

NUMERO D'ECHANTILLON	NOMBRE DE READS	NUMERO D'ECHANTILLON	NOMBRE DE READS
9072022059	3 129 849	8111221403	617 583
9092206905	3 368 062	9092181889	560 813
0042859369	4 467 445	9092196584	356 323
9122497266	3 230 624	9102284441	293 071
0042916275	4 159 382	9122437418	465 711
0042900270	3 809 715	9122464836	557 769
7120164321	354 151	0012565907	375 123
7120232491	471 872	0012599703	430 301
8010292745	361 273	0022616954	563 556
8020367032	1 072 766	0022630650	401 613
8050672776	441 734	003282079	477 488
8050674123	394 094	0042909467	227 830
8070876327	477 667	0052992120	1 519 668
8070919969	147 665	0050032079	1 035 908
8070920784	315 140	0050039742	949 317
8101161685	315 228		

Figure 29 : Nombre de reads lors du séquençage NGS par ion torrent

J'ai utilisé le logiciel *CLC genomics*¹⁴⁰ de QIAGEN afin de traiter les données obtenues par séquençage. La première étape est de retirer les reads d'une taille inférieure à 100 pb, avec un score de qualité <49% et de retirer les 30 premières et 30 derniers nucléotides, ce qui permet de supprimer les amorces et les mauvais reads. Ensuite il faut effectuer un « mapping » c'est-à-dire comparer les reads à une séquence d'ADN de référence et générer une séquence consensus de tous les reads.

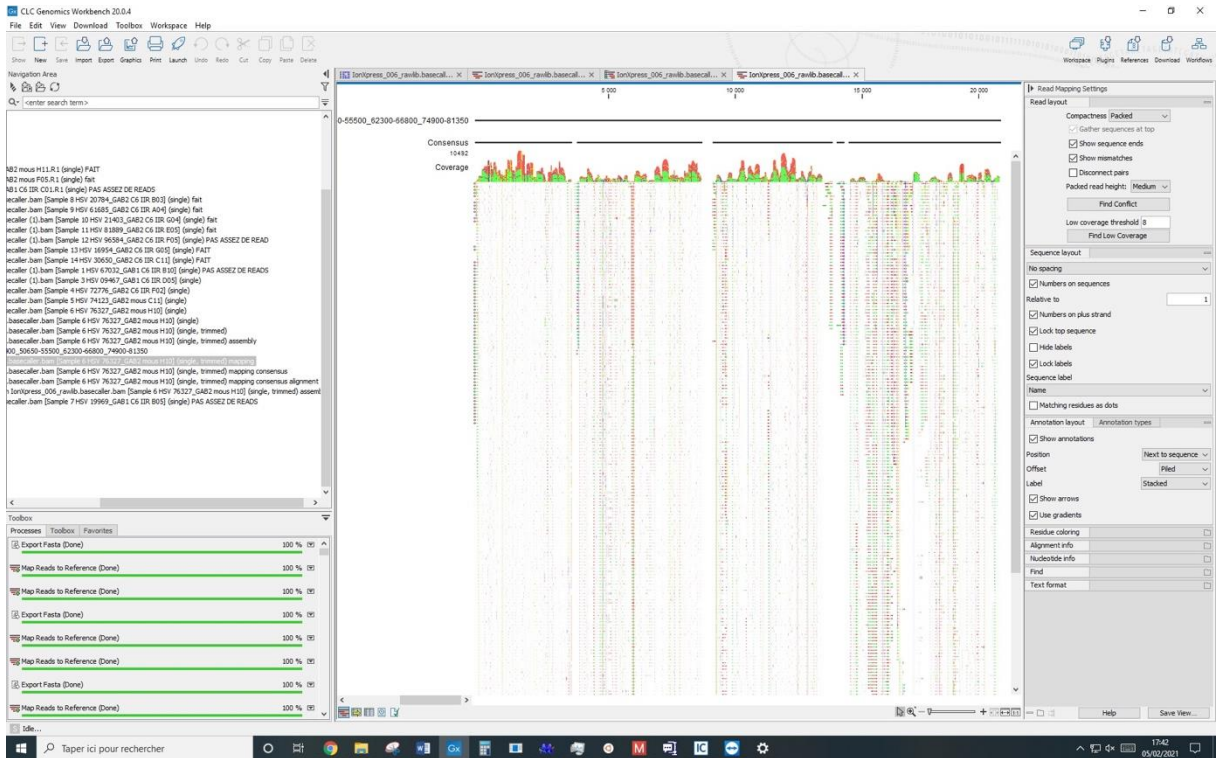


Figure 30 : Mapping des reads à la référence sur *CLC genomics*

Il faut ensuite aligner la séquence consensus à la séquence de référence, et les comparer afin d'identifier les potentielles mutations ponctuelles, délétions, substitutions ou erreurs dans la séquence consensus. Après correction des erreurs, la séquence consensus est prête à être extraite.

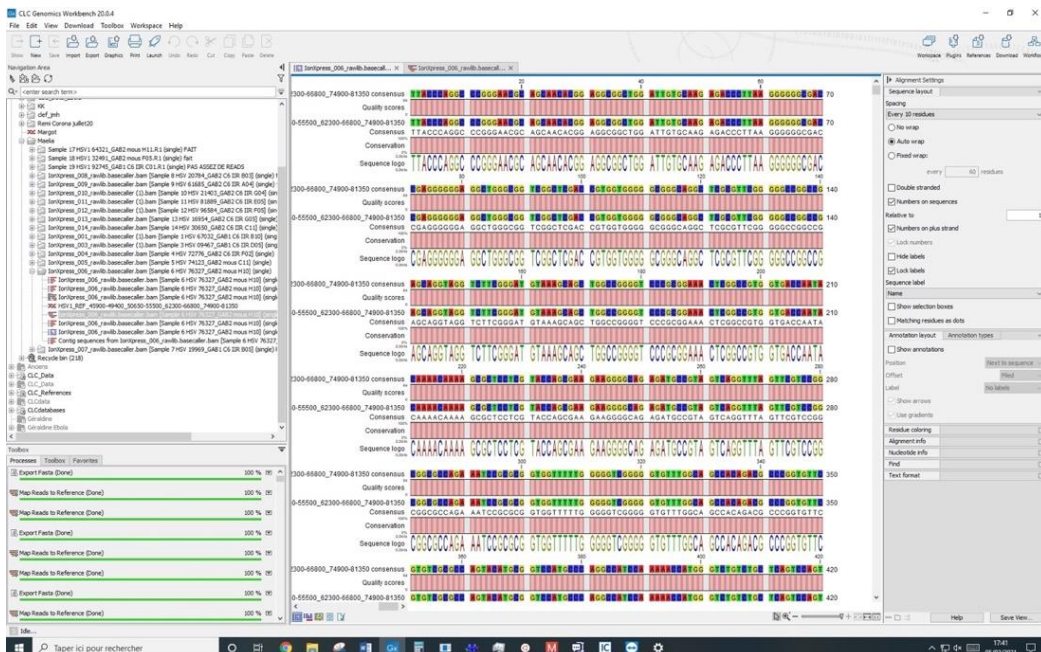


Figure 31 : Correction des erreurs sur *CLC genomics*

La dernière étape consiste à créer une séquence de référence de novo à partir des reads et à comparer (mapping) cette séquence à la séquence consensus obtenue précédemment afin d'identifier des potentielles erreurs dans la séquence consensus.

- Analyse bio-informatique

En téléchargeant les séquences obtenues sur le logiciel *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)*^{141,142} j'ai pu identifier à quels gènes de l'HSV 1 correspondaient mes séquences hypervariables :

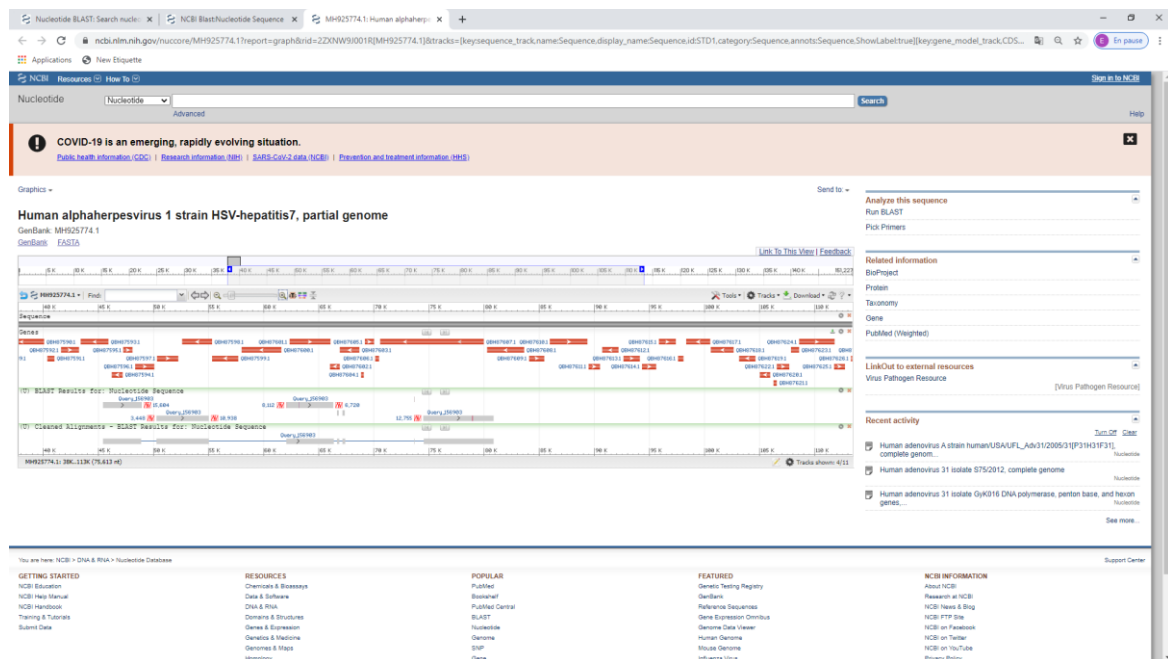


Figure 32 : BLAST des séquences obtenues sur le génome complet de l'HSV 1

La première zone (nt 69000 à 72000) comprend le gène UL23 codant pour la thymidine kinase,¹⁵ le gène UL24 codant pour une protéine limitant l'accumulation de transcrits viraux (permet la régulation de l'expression génique)¹⁴³ ainsi que le début des gènes UL22 codant pour la glycoprotéine H membranaire^{144,145} et de l'UL25 codant pour une protéine permettant l'encapsidation de l'ADN viral.¹⁴⁶

La deuxième zone (nt 75000 à 80000) comprend les gènes UL26 codant pour une protéase¹⁴⁷ et UL27 codant pour la glycoprotéine B membranaire.¹⁴⁸

La troisième zone (nt 103000 à 110000) comprend la première moitié du gène UL36 codant une protéine du tégment.¹⁴⁹

Pour finir, j'ai téléchargé les séquences obtenues par séquençage dans le logiciel *MEGA* et je les ai alignées avec les 40 séquences de références choisies précédemment. L'analyse de cet alignement a permis de calculer le nombre de nucléotides différents entre ces séquences. Les deux séquences les plus éloignées possèdent 122 nucléotides différents, la taille des séquences étant de 14 000 nucléotides, cela représente au maximum 0,9% de différences entre les séquences. Ceci montre d'une part que le virus HSV 1 est très conservé et d'autre part que les séquences hypervariables choisies pour l'étude ont bien une bonne homologie. Du fait de la conservation de ce virus, il est donc nécessaire de séquencer de grosses régions d'ADN (comme c'est le cas dans cette étude) afin d'obtenir assez de variabilité inter séquence pour que les résultats soient interprétables.

L'intérêt des arbres phylogénétiques est de représenter les variabilités et les similarités de différentes séquences d'acides nucléiques. Le logiciel *MEGA* a permis de construire un arbre (figure ci-dessous) sur lequel on observe une diversité génétique des séquences. Le fait que celles provenant des échantillons de l'étude soient dispersées dans l'arbre montre que séquencer les régions hypervariables choisies permettra de génotyper le virus.

Sur l'arbre on peut voir se profiler plusieurs groupes, dont l'origine géographique des souches virales est différente. Actuellement le manque d'informations sur l'origine géographique des séquences de référence et celles des patients ne permet pas d'affirmer avec certitude les différents génotypes. On peut cependant supposer que comme décrit dans la littérature, trois grands groupes pourront être mis en évidence (un asiatique, un africain et un américano-européen).⁴

On observe également que pour deux prélèvements (0042900270 et 0042909467) d'un même patient à quelques jours d'intervalles, les génomes sont identiques. Ceci montre la reproductibilité de la technique.

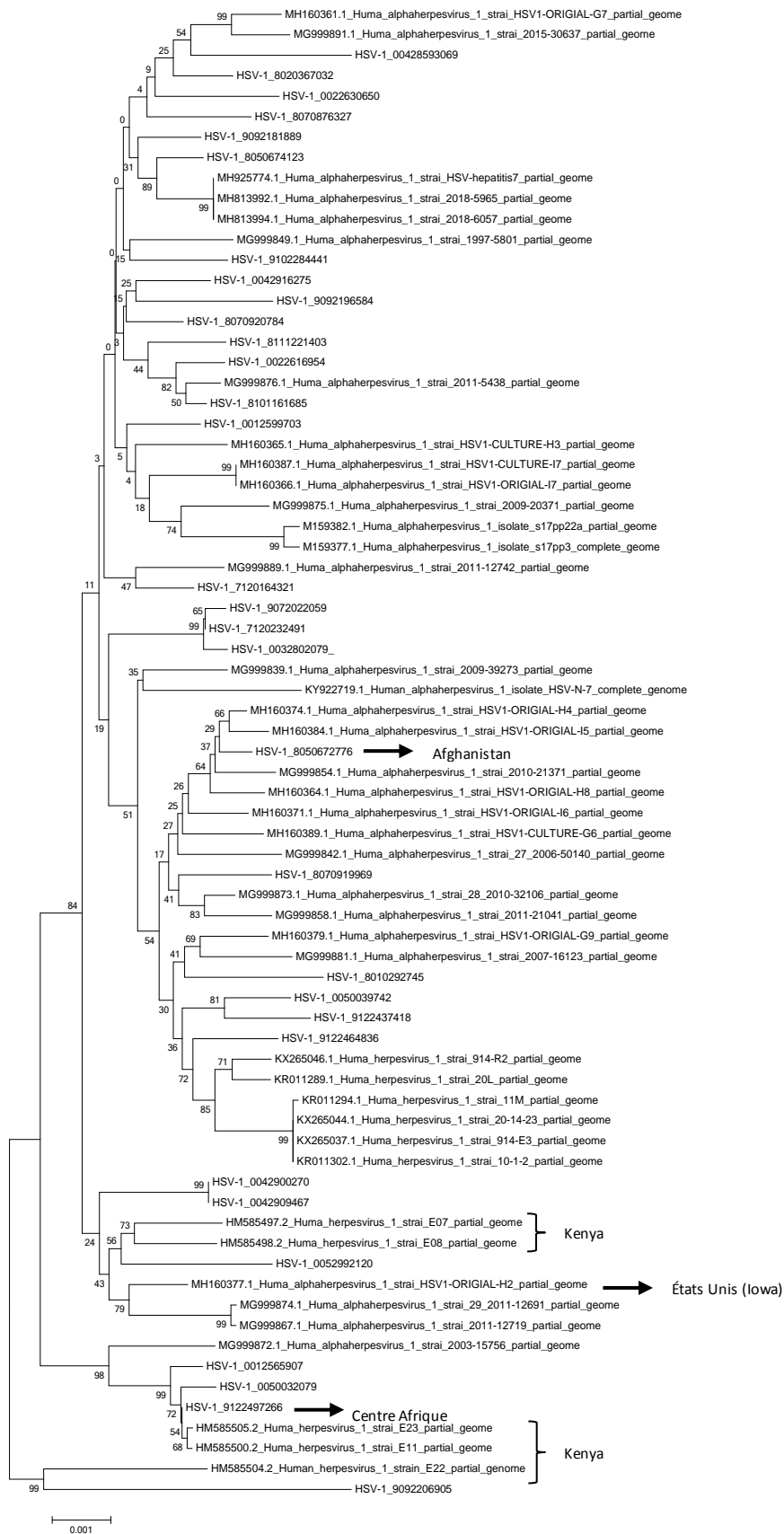


Figure 33 : Arbre phylogénétique avec les 40 séquences de références et les séquences des échantillons testés

V. Discussion

L'*Herpes simplex virus 1* est retrouvé très fréquemment dans la population générale et peut être responsable d'excrétions asymptomatiques mais également d'infections de sévérité variable en fonction de la localisation et de l'état d'immunodépression du patient. Il peut s'agir d'une primo-infection ou de réactivations. Dans ces deux cas les formes cliniques sont multiples. Certaines infections ne nécessiteront ni diagnostic microbiologique ni thérapie antivirale. Pour les autres, des molécules antivirales ayant pour cible l'ADN polymérase virale sont connues depuis de nombreuses années. Cependant des résistances à celles-ci ont été décrites et peuvent avoir des conséquences cliniques, surtout chez le patient immunodéprimé.

L'objectif de ce travail était de développer une technique combinée de génotypage et de recherche des mutations de résistance.

L'intérêt du génotypage est multiple. D'un point de vue épidémiologique, il permet de détecter des clusters de transmission mais également de documenter cette transmission lors des infections materno-fœtales en comparant les séquences obtenues à partir des prélèvements de la mère et de l'enfant. Le génotypage permet de retracer les mouvements de populations en rattachant les différents génotypes à des origines géographiques distinctes. D'un point de vue physiopathologique il permet de préciser si le virus isolé chez le patient est issu d'une réactivation ou bien d'une réinfection. Pour ce faire il est nécessaire de réaliser prospectivement une banque de séquences. Ainsi, lors d'une nouvelle forme clinique chez un patient, la séquence du virus pourra être comparée à celle retrouvée chez ce même patient des mois ou des années auparavant. Ce nouvel outil ne sera donc pas utilisable immédiatement.

Le diagnostic des résistances est un outil utile dans le cas d'infections avec échec de la thérapie antivirale. Il permet ainsi de documenter celui-ci et aide à la prise en charge thérapeutique.

Une technique combinée permet d'établir une possible association entre les mutations de résistances et le génotypage ainsi que d'étudier l'épidémiologie de ces résistances au sein des différents génotypes. Elle permet également la détection de mutations de résistance sans conséquences cliniques, retrouvées la plupart du temps chez le patient immunocompétent et n'étant pas systématiquement recherchée. Cela permet également d'ajouter à chaque recherche de mutation de résistance, une séquence à la banque, nécessaire au génotypage.

Ce travail m'a donc permis de développer une méthode sensible directement réalisable sur l'extrait d'ADN issu de prélèvements cliniques, pouvant être utilisée en routine à l'hôpital. J'ai pu mettre en place un système de Polymerase Chain Reaction multiplex ayant pour finalité d'amplifier des séquences d'ADN ensuite séquencées par NGS en Ion torrent.

Le choix des séquences s'est porté d'une part sur les gènes cibles des résistances aux antiviraux. Ce sont les gènes UL23 codant pour la thymidine kinase virale et UL30 codant pour l'ADN polymérase virale. D'autre part pour le génotypage j'ai choisi trois régions hypervariables dont l'homologie était conservée (0,9% de variations au maximum). Cette étape a été cruciale dans mon travail et m'a permis d'obtenir une diversité génétique suffisante pour établir un génotypage. Le séquençage s'étend sur 14 000 pb, cette taille permet une analyse correcte du génotypage tout en conservant un coût modéré. Un séquençage complet du génome est plus onéreux, difficilement réalisable directement sur le prélèvement ainsi que sur des faibles charges virales.

L'utilisation du Next Generation Sequencing permet d'obtenir une séquence consensus que l'on peut comparer aux séquences de référence ainsi qu'aux autres séquences obtenues pour établir un génotypage. Cette séquence consensus permet également la recherche de mutations de résistance à partir d'une base de données de la littérature. Utiliser la technique Ion torrent est important car cela permet d'avoir une grande profondeur du séquençage utile pour détecter des souches résistances minoritaires en phénotypant les sous populations virales.

Cependant cette technique mériterait d'être optimisée. Le diagnostic des mutations de résistance est utile le plus souvent pour des patients avec une infection profonde. Dans ces cas-là les prélèvements reçus au laboratoire sont des prélèvements précieux (par exemple

LBA, LCR) dans lesquels la charge virale est beaucoup plus faible comparée à d'autres prélèvements superficiels dont les infections ne nécessitent souvent pas de thérapie antivirale. J'ai pu observer que deux des trois échantillons pour lesquels la PCR n'avait pas fonctionné avait un Ct (évaluation de la charge virale) entre 20 et 24. Il est donc nécessaire d'améliorer la sensibilité de la technique. Pour cela il me faudra tester plusieurs petits groupes d'échantillons avec des conditions de PCR à chaque fois différentes (par exemple modification de la quantité d'amorces, de mix ou d'extrait d'ADN, modification des conditions de température, nombre de cycles ou durée de l'hybridation ou de l'élongation) afin d'identifier les conditions optimales pour cette technique. Ainsi l'idéal serait de réussir à amplifier des échantillons détectés jusqu'à 30 Ct par PCR de routine en temps réel.

Il est également nécessaire de développer un outil bio-informatique qui regrouperait une base de données des mutations de résistance et utiliserait celle-ci pour les rechercher automatiquement à l'intérieur des séquences consensus obtenues en NGS mais également au sein des sous populations virales. Cet outil présenterait des avantages conséquents par rapport à l'analyse manuelle. Il permettrait en effet d'être plus sensible, éviterait l'erreur humaine et serait nettement plus rapide. Ce système devra alors être validé à partir d'échantillons de patients dont les résistances sont connues (souches envoyées au CNR) ou suspectées.

Afin que le géotypage soit optimisé il est nécessaire de rajouter à l'alignement, des séquences de référence dont l'origine géographique est bien connue. Il faut également tester de nombreux autres échantillons pour obtenir un pool de séquences plus conséquent et ainsi augmenter la précision de l'arbre phylogénétique. Il serait utile lors de la réception de nouveaux échantillons au laboratoire, d'obtenir systématiquement des informations sur l'origine géographique du patient.

La création en prospective d'une banque de séquences conséquente permettrait également de comparer le géotype avec la symptomatologie clinique. Cela pourrait permettre de rattacher des manifestations particulières (comme des atteintes oculaires ou du système nerveux central) à des géotypes spécifiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bactériologie et virologie pratique. *De Boeck Supérieur* <https://www.deboecksuperieur.com/ouvrage/9782807306493-bacteriologie-et-virologie-pratique> (2020).
2. Krawczyk, A. *et al.* Overcoming drug-resistant herpes simplex virus (HSV) infection by a humanized antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 6760–6765 (2013).
3. Sh, J. & Dw, K. Neonatal herpes simplex virus infection: epidemiology and treatment. *Clinics in perinatology* vol. 42 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25677996/> (2015).
4. Pfaff, F., Groth, M., Sauerbrei, A. & Zell, R. Genotyping of herpes simplex virus type 1 by whole-genome sequencing. *J Gen Virol* **97**, 2732–2741 (2016).
5. Glück, B., Möbius, S., Pfaff, F., Zell, R. & Sauerbrei, A. Novel method for genotyping clinical herpes simplex virus type 1 isolates. *Arch Virol* **160**, 2807–2811 (2015).
6. Whitley, R. J. & Roizman, B. Herpes simplex virus infections. *The Lancet* **357**, 1513–1518 (2001).
7. Looker, K. J. *et al.* Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. *PLoS One* **10**, e0140765 (2015).
8. Sukik, L., Alyafei, M., Harfouche, M. & Abu-Raddad, L. J. Herpes simplex virus type 1 epidemiology in Latin America and the Caribbean: Systematic review and meta-analyses. *PLoS One* **14**, e0215487 (2019).
9. Bradley, H., Markowitz, L. E., Gibson, T. & McQuillan, G. M. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and 2--United States, 1999-2010. *J Infect Dis* **209**, 325–333 (2014).
10. Xu, F. *et al.* Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. *JAMA* **296**, 964–973 (2006).
11. Korr, G. *et al.* Decreasing seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in Germany leaves many people susceptible to genital infection: time to raise awareness and enhance control. *BMC Infect Dis* **17**, 471 (2017).
12. McQuillan, G., Kruszon-Moran, D., Flagg, E. W. & Paulose-Ram, R. Prevalence of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 in Persons Aged 14-49: United States, 2015-2016. *NCHS Data Brief* 1–8 (2018).
13. Malvy, D. *et al.* Epidemiology of genital herpes simplex virus infections in a community-based sample in France: results of the HERPIMAX study. *Sex Transm Dis* **32**, 499–505 (2005).
14. Goffard, A. Infections à Herpes Simplex virus. 13.
15. Piret, J. & Boivin, G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 459–472

- (2011).
16. E. Pilly. *Maladies infectieuses et tropicales Edition 2020 - CMIT*, Catherine Chirouze, Olivier Epaulard, Rozenn Le Berre.
 17. Référentiel en microbiologie Médicale - Société Française de Microbiologie. <https://www.sfm-microbiologie.org/boutique/referentiel-en-microbiologie-medicale-remic/>.
 18. Oliver, L. *et al.* Seroprevalence of herpes simplex virus infections in a family medicine clinic. *Arch Fam Med* **4**, 228–232 (1995).
 19. Corey, L. & Spear, P. G. Infections with herpes simplex viruses (1). *N Engl J Med* **314**, 686–691 (1986).
 20. Amir, J. Clinical aspects and antiviral therapy in primary herpetic gingivostomatitis. *Paediatr Drugs* **3**, 593–597 (2001).
 21. Amir, J., Harel, L., Smetana, Z. & Varsano, I. Treatment of herpes simplex gingivostomatitis with aciclovir in children: a randomised double blind placebo controlled study. *BMJ* **314**, 1800–1803 (1997).
 22. Ducoulombier, H. *et al.* [Herpetic stomatitis-gingivitis in children: controlled trial of acyclovir versus placebo]. *Ann Pediatr (Paris)* **35**, 212–216 (1988).
 23. Bernstein, D. I. *et al.* Epidemiology, clinical presentation, and antibody response to primary infection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in young women. *Clin Infect Dis* **56**, 344–351 (2013).
 24. Roberts, C. M., Pfister, J. R. & Spear, S. J. Increasing proportion of herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes infection in college students. *Sex Transm Dis* **30**, 797–800 (2003).
 25. ACOG Committee on Practice Bulletins. ACOG Practice Bulletin. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. No. 82 June 2007. Management of herpes in pregnancy. *Obstet Gynecol* **109**, 1489–1498 (2007).
 26. De Broucker, T. *et al.* Étude nationale de cohorte des encéphalites infectieuses en France (ENCEIF) : résultats préliminaires. *Revue Neurologique* **174**, S135 (2018).
 27. Townend, B. S., Hanson, J. A., Sturm, J. W. & Whyte, S. Stroke or encephalitis? *Emerg Med Australas* **17**, 401–404 (2005).
 28. Shoaib, M., Kraus, J. J. & Khan, M. T. Herpes Simplex Virus Encephalitis: Atypical Presentation as a Right Middle Cerebral Artery Stroke. *Cureus* **10**,
 29. Clark, C. N., Khandanpour, N. & Pereira, A. C. Herpes simplex virus infection presenting as stroke-like symptoms with atypical MRI findings. *The Lancet Infectious Diseases* **19**, 914 (2019).

30. Modi, S., Mahajan, A., Dharaiya, D., Varelas, P. & Mitsias, P. Burden of herpes simplex virus encephalitis in the United States. *J Neurol* **264**, 1204–1208 (2017).
31. Hauer, L. *et al.* Cerebrovascular manifestations of herpes simplex virus infection of the central nervous system: a systematic review. *Journal of Neuroinflammation* **16**, 19 (2019).
32. Renesme, L. Herpès néonatal : épidémiologie, manifestations cliniques et prise en charge. Recommandations pour la pratique clinique du Collège national des gynécologues obstétriciens français (CNGOF). *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie* **45**, 691–704 (2017).
33. Workowski, K. A., Bolan, G. A., & Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recomm Rep* **64**, 1–137 (2015).
34. Danve-Szatanek, C. *et al.* Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up. *J Clin Microbiol* **42**, 242–249 (2004).
35. Stránská, R. *et al.* Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the Netherlands: prevalence and characterization. *J Clin Virol* **32**, 7–18 (2005).
36. IBL, I. IBL international, Fiche technique, Herpes simplex virus 1 IgG ELISA.
37. IBL, I. IBL international, Fiche technique, Herpes simplex virus 1/2 IgM ELISA.
38. Kim, B. Western Blot Techniques. *Methods Mol Biol* **1606**, 133–139 (2017).
39. Pouletty, P. *et al.* Detection of herpes simplex virus in direct specimens by immunofluorescence assay using a monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* **25**, 958–959 (1987).
40. de Mesa, A. A., Cheyroux, M. & Edlinger, E. Mise en évidence du virus herpès simplex (VHS) par effet cytopathogène en culture cellulaire, par immunofluorescence et par un test d'hybridation. *Médecine et Maladies Infectieuses* **15**, 515–517 (1985).
41. Quick, J. *et al.* Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc* **12**, 1261–1276 (2017).
42. Ramesh, R., Munshi, A. & Panda, S. K. Polymerase chain reaction. *Natl Med J India* **5**, 115–119 (1992).
43. Green, M. R. & Sambrook, J. The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc* **2018**, (2018).
44. Wittwer, C. T. Democratizing the Real-Time PCR. *Clin Chem* **63**, 924–925 (2017).
45. Green, M. R. & Sambrook, J. Analysis and Normalization of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Experimental Data. *Cold Spring Harb Protoc* **2018**, (2018).

46. Kowalski, R. P., Thompson, P. P. & Cronin, T. H. Cell culture isolation can miss the laboratory diagnosis of HSV ocular infection. *Int J Ophthalmol* **3**, 164–167 (2010).
47. Piret, J. & Boivin, G. Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections: diagnosis and management. *Current Opinion in Infectious Diseases* **29**, 654–662 (2016).
48. La Lettre de l'Infectiologue / N° 8 décembre 2002. https://www.edimark.fr/lettre-infectiologue/n_8_12-2002.
49. Pharmacomédicale.org. <https://pharmacomedicale.org/>.
50. Gaudreau, A., Hill, E., Balfour, H. H., Erice, A. & Boivin, G. Phenotypic and Genotypic Characterization of Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Viruses from Immunocompromised Patients. *J Infect Dis* **178**, 297–303 (1998).
51. Dictionnaire VIDAL 2019. *VIDAL France* <https://www.vidalfrance.com/solutions/solutions-professionnels/le-dictionnaire-vidal/>.
52. Griffiths, P., Baraniak, I. & Reeves, M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *The Journal of Pathology* **235**, 288–297 (2015).
53. Tabbara, K. F. Treatment of herpetic keratitis. *Ophthalmology* **112**, 1640 (2005).
54. Harris, K. D. Herpes Simplex Virus Keratitis. *Home Healthc Now* **37**, 281–284 (2019).
55. Tsatsos, M. *et al.* Herpes simplex virus keratitis: an update of the pathogenesis and current treatment with oral and topical antiviral agents. *Clin Exp Ophthalmol* **44**, 824–837 (2016).
56. Blot, N. *et al.* Treatment of an acyclovir and foscarnet-resistant herpes simplex virus infection with cidofovir in a child after an unrelated bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant* **26**, 903–905 (2000).
57. Rabasseda, X. Brivudine: a herpes virostatic with rapid antiviral activity and once-daily dosing. *Drugs Today (Barc)* **39**, 359–371 (2003).
58. Shiraki, K. Antiviral Drugs Against Alphaherpesvirus. *Adv Exp Med Biol* **1045**, 103–122 (2018).
59. Ganciclovir implants (Vitrasert). *Treat Rev* **10** (1996).
60. Prise en charge de l'herpès cutanéomuqueux chez le sujet immunocompétent (manifestations oculaires exclues). *Haute Autorité de Santé* https://www.has-sante.fr/jcms/c_272087/fr/prise-en-charge-de-l-herpes-cutaneo-muqueux-chez-le-sujet-immunocompetent-manifestations-oculaires-exclues.
61. Cernik, C., Gallina, K. & Brodell, R. T. The treatment of herpes simplex infections: an evidence-based review. *Arch Intern Med* **168**, 1137–1144 (2008).

62. Gilbert, S. C. Management and prevention of recurrent herpes labialis in immunocompetent patients. *Herpes* **14**, 56–61 (2007).
63. Jensen, L. A., Hoehns, J. D. & Squires, C. L. Oral antivirals for the acute treatment of recurrent herpes labialis. *Ann Pharmacother* **38**, 705–709 (2004).
64. Rooney, J. F. *et al.* Oral acyclovir to suppress frequently recurrent herpes labialis. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* **118**, 268–272 (1993).
65. Baker, D. & Eisen, D. Valacyclovir for prevention of recurrent herpes labialis: 2 double-blind, placebo-controlled studies. *Cutis* **71**, 239–242 (2003).
66. Vestey, J. P. & Norval, M. Mucocutaneous infections with herpes simplex virus and their management. *Clin Exp Dermatol* **17**, 221–237 (1992).
67. Green, J. A., Spruance, S. L., Wenerstrom, G. & Piepkorn, M. W. Post-herpetic erythema multiforme prevented with prophylactic oral acyclovir. *Ann Intern Med* **102**, 632–633 (1985).
68. Worrall, G. Acyclovir in recurrent herpes labialis. *BMJ* **312**, 6 (1996).
69. Lebrun-Vignes, B. *et al.* A meta-analysis to assess the efficacy of oral antiviral treatment to prevent genital herpes outbreaks. *J Am Acad Dermatol* **57**, 238–246 (2007).
70. Fife, K. H., Crumpacker, C. S., Mertz, G. J., Hill, E. L. & Boone, G. S. Recurrence and resistance patterns of herpes simplex virus following cessation of > or = 6 years of chronic suppression with acyclovir. Acyclovir Study Group. *J Infect Dis* **169**, 1338–1341 (1994).
71. Nikkels, A. F. & Pièrard, G. E. Treatment of mucocutaneous presentations of herpes simplex virus infections. *Am J Clin Dermatol* **3**, 475–487 (2002).
72. Raborn, G. W., Martel, A. Y., Grace, M. G. & McGaw, W. T. Oral acyclovir in prevention of herpes labialis. A randomized, double-blind, multi-centered clinical trial. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **85**, 55–59 (1998).
73. Spruance, S. L. *et al.* Peroral famciclovir in the treatment of experimental ultraviolet radiation-induced herpes simplex labialis: A double-blind, dose-ranging, placebo-controlled, multicenter trial. *J Infect Dis* **179**, 303–310 (1999).
74. Rooney, J. F. *et al.* Prevention of ultraviolet-light-induced herpes labialis by sunscreen. *Lancet* **338**, 1419–1422 (1991).
75. Berra, L. V., Armocida, D., Pesce, A., Di Rita, A. & Santoro, A. Herpes Simplex Reactivation After Surgical Treatment of Trigeminal Neuralgia: A Retrospective Cohort Study. *World Neurosurg* **127**, e16–e21 (2019).
76. Tenser, R. B. Occurrence of Herpes Simplex Virus Reactivation Suggests a Mechanism of Trigeminal Neuralgia Surgical Efficacy. *World Neurosurg* **84**, 279–282 (2015).

77. Pazin, G. J., Ho, M. & Jannetta, P. J. Reactivation of herpes simplex virus after decompression of the trigeminal nerve root. *J Infect Dis* **138**, 405–409 (1978).
78. Schädelin, J., Schilt, H. U. & Rohner, M. Preventive therapy of herpes labialis associated with trigeminal surgery. *Am J Med* **85**, 46–48 (1988).
79. Silverman, A. K., Laing, K. F., Swanson, N. A. & Schaberg, D. R. Activation of herpes simplex following dermabrasion. Report of a patient successfully treated with intravenous acyclovir and brief review of the literature. *J Am Acad Dermatol* **13**, 103–108 (1985).
80. Gilbert, S. & McBurney, E. Use of valacyclovir for herpes simplex virus-1 (HSV-1) prophylaxis after facial resurfacing: A randomized clinical trial of dosing regimens. *Dermatol Surg* **26**, 50–54 (2000).
81. Metelitsa, A. I. & Alster, T. S. Fractionated laser skin resurfacing treatment complications: a review. *Dermatol Surg* **36**, 299–306 (2010).
82. Wall, S. H., Ramey, S. J. & Wall, F. Famciclovir as antiviral prophylaxis in laser resurfacing procedures. *Plast Reconstr Surg* **104**, 1103–1108; discussion 1109 (1999).
83. Alster, T. S. & Nanni, C. A. Famciclovir prophylaxis of herpes simplex virus reactivation after laser skin resurfacing. *Dermatol Surg* **25**, 242–246 (1999).
84. Martin, E. T. *et al.* A pooled analysis of the effect of condoms in preventing HSV-2 acquisition. *Arch Intern Med* **169**, 1233–1240 (2009).
85. Openshaw, H. & Bennett, H. E. Recurrence of herpes simplex virus after dental extraction. *J Infect Dis* **146**, 707 (1982).
86. Mantry, P., Desai, D., Kumar, V. & Udwadia, T. Herpes simplex hepatitis. *Indian J Gastroenterol* **16**, 33–34 (1997).
87. Stahl, J. P. [Herpetic meningo-encephalitis]. *Pathol Biol (Paris)* **50**, 469–471 (2002).
88. Funaki, T. *et al.* Therapeutic Drug Monitoring in Neonatal HSV Infection on Continuous Renal Replacement Therapy. *Pediatrics* **136**, e270-274 (2015).
89. Yu, T., Peng, R.-M., Xiao, G.-G., Feng, L.-N. & Hong, J. Clinical Evaluation of Intravitreal Injection of Ganciclovir in Refractory Corneal Endotheliitis. *Ocul Immunol Inflamm* **28**, 270–280 (2020).
90. Boivin, G., Erice, A., Crane, D. D., Dunn, D. L. & Balfour, H. H. Acyclovir susceptibilities of herpes simplex virus strains isolated from solid organ transplant recipients after acyclovir or ganciclovir prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 357–359 (1993).
91. Nyquist, A. C. *et al.* Acyclovir-resistant neonatal herpes simplex virus infection of the larynx. *J Pediatr* **124**, 967–971 (1994).

92. Levin, M. J., Weinberg, A., Leary, J. J. & Sarisky, R. T. Development of acyclovir-resistant herpes simplex virus early during the treatment of herpes neonatorum. *Pediatr Infect Dis J* **20**, 1094–1097 (2001).
93. Langston, A. A. *et al.* Development of drug-resistant herpes simplex virus infection after haploidentical hematopoietic progenitor cell transplantation. *Blood* **99**, 1085–1088 (2002).
94. Mishra, L. DIVISION OF ANTIVIRAL PRODUCTS (HFD-530) VIROLOGY REVIEW. 55.
95. Masson, E. Suivi thérapeutique pharmacologique des antiviraux aciclovir et ganciclovir. *EM-Consulte* <https://www.em-consulte.com/article/1249421/suivi-therapeutique-pharmacologique-des-antiviraux>.
96. Sun, S.-Z. *et al.* Aciclovir CSF concentration in children with viral encephalitis: is it adequate? *J Antimicrob Chemother* **73**, 2582–2583 (2018).
97. *Kucers' The Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs, Seventh Edition - Three Volume Set.* (CRC Press, 2017).
98. Maillot, F. Interaction pharmacocinétique du probénécide et de la cimétidine avec le valaciclovir et son métabolite, l'aciclovir. 96 (1994).
99. Bradshaw, M. J. & Venkatesan, A. Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Neurotherapeutics* **13**, 493–508 (2016).
100. Stránská, R., van Loon, A. M., Polman, M. & Schuurman, R. Application of real-time PCR for determination of antiviral drug susceptibility of herpes simplex virus. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 2943–2947 (2002).
101. Morfin, F. *et al.* HSV excretion after bone marrow transplantation: a 4-year survey. *Journal of Clinical Virology* **30**, 341–345 (2004).
102. Renier, G. Immunologie de l'œil. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* **48**, 303–313 (2008).
103. McKnight, S. L. The nucleotide sequence and transcript map of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Nucleic Acids Res* **8**, 5949–5964 (1980).
104. Balasubramaniam, N. K., Veerisetty, V. & Gentry, G. A. Herpesviral deoxythymidine kinases contain a site analogous to the phosphoryl-binding arginine-rich region of porcine adenylate kinase; comparison of secondary structure predictions and conservation. *J Gen Virol* **71 (Pt 12)**, 2979–2987 (1990).
105. Evans, J. S. *et al.* Herpesviral thymidine kinases: laxity and resistance by design. *J Gen Virol* **79 (Pt 9)**, 2083–2092 (1998).
106. Lee, N. Y. *et al.* Role of genotypic analysis of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus for determination of neurovirulence and resistance to acyclovir. *J Clin Microbiol* **37**,

- 3171–3174 (1999).
107. Morfin, F., Thouvenot, D., Aymard, M. & Souillet, G. Reactivation of acyclovir-resistant thymidine kinase-deficient herpes simplex virus harbouring single base insertion within a 7 Gs homopolymer repeat of the thymidine kinase gene. *J Med Virol* **62**, 247–250 (2000).
 108. McLaren, C., Chen, M. S., Ghazzouli, I., Saral, R. & Burns, W. H. Drug resistance patterns of herpes simplex virus isolates from patients treated with acyclovir. *Antimicrob Agents Chemother* **28**, 740–744 (1985).
 109. Larder, B. A. & Darby, G. Selection and characterisation of acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 mutants inducing altered DNA polymerase activities. *Virology* **146**, 262–271 (1985).
 110. Dambrosi, S. *et al.* Neurovirulence and latency of drug-resistant clinical herpes simplex viruses in animal models. *J Med Virol* **82**, 1000–1006 (2010).
 111. Pelosi, E., Rozenberg, F., Coen, D. M. & Tyler, K. L. A herpes simplex virus DNA polymerase mutation that specifically attenuates neurovirulence in mice. *Virology* **252**, 364–372 (1998).
 112. Arnulf, B. *et al.* Multiple herpes simplex virus infections with various resistance patterns in a matched unrelated donor transplant recipient. *Bone Marrow Transplant* **28**, 799–801 (2001).
 113. Kost, R. G., Hill, E. L., Tigges, M. & Straus, S. E. Brief report: recurrent acyclovir-resistant genital herpes in an immunocompetent patient. *N Engl J Med* **329**, 1777–1782 (1993).
 114. Mouly, F. *et al.* Chronic recurrent acyclovir-resistant genital herpes in an immunocompetent patient. *Dermatology* **190**, 177 (1995).
 115. Swetter, S. M. *et al.* Chronic vulvar ulceration in an immunocompetent woman due to acyclovir-resistant, thymidine kinase-deficient herpes simplex virus. *J Infect Dis* **177**, 543–550 (1998).
 116. Swierkosz, E. M., Scholl, D. R., Brown, J. L., Jollick, J. D. & Gleaves, C. A. Improved DNA hybridization method for detection of acyclovir-resistant herpes simplex virus. *Antimicrob Agents Chemother* **31**, 1465–1469 (1987).
 117. Pavić, I. *et al.* Flow cytometric analysis of herpes simplex virus type 1 susceptibility to acyclovir, ganciclovir, and foscarnet. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 2686–2692 (1997).
 118. van der Beek, M. T. *et al.* Rapid susceptibility testing for herpes simplex virus type 1 using real-time PCR. *J Clin Virol* **56**, 19–24 (2013).
 119. Strachan, T., Read, A., Mowszowicz, I. & Wright, F. *Génétique moléculaire humaine*.

(Médecine Sciences Publications, 2012).

120. Thi, T. N. *et al.* Rapid determination of antiviral drug susceptibility of herpes simplex virus types 1 and 2 by real-time PCR. *Antiviral Research* **69**, 152–157 (2006).
121. Comparative evaluation of microplate enzyme-linked immunosorbent assay versus plaque reduction assay for antiviral susceptibility testing of herpes simplex virus isolates - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8849218/>.
122. Martin, J. L. *et al.* Plaque autoradiography assay for the detection and quantitation of thymidine kinase-deficient and thymidine kinase-altered mutants of herpes simplex virus in clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **28**, 181–187 (1985).
123. Fujii, H. *et al.* Application of next-generation sequencing to detect acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 variants at low frequency in thymidine kinase gene of the isolates recovered from patients with hematopoietic stem cell transplantation. *J Virol Methods* **251**, 123–128 (2018).
124. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463–5467 (1977).
125. Slatko, B. E., Gardner, A. F. & Ausubel, F. M. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol* **122**, e59 (2018).
126. Snoeck, R. *et al.* Successful treatment of progressive mucocutaneous infection due to acyclovir- and foscarnet-resistant herpes simplex virus with (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine (HPMPC). *Clin Infect Dis* **18**, 570–578 (1994).
127. Schmidt-Chanasit, J. *et al.* A 10-year molecular survey of herpes simplex virus type 1 in Germany demonstrates a stable and high prevalence of genotypes A and B. *J Clin Virol* **44**, 235–237 (2009).
128. Sauerbrei, A., Pfaff, F., Zell, R. & Wutzler, P. Prevalence of herpes simplex virus type 1 glycoprotein G (gG) and gI genotypes in patients with different herpetic diseases during the last four decades. *J Med Virol* **84**, 651–656 (2012).
129. Dai, S. & Long, Y. Genotyping analysis using an RFLP assay. *Methods Mol Biol* **1245**, 91–99 (2015).
130. Benson, D. A. *et al.* GenBank. *Nucleic Acids Res* **46**, D41–D47 (2018).
131. Katoh, K., Rozewicki, J. & Yamada, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* **20**, 1160–1166 (2019).
132. Nakamura, T., Yamada, K. D., Tomii, K. & Katoh, K. Parallelization of MAFFT for large-scale multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **34**, 2490–2492 (2018).
133. MAFFT-DASH: integrated protein sequence and structural alignment | Nucleic Acids

134. Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* **33**, 1870–1874 (2016).
135. Sequencher DNA Sequence Analysis Software from Gene Codes Corporation. <http://www.genecodes.com/>.
136. Green, M. R. & Sambrook, J. The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc* **2018**, (2018).
137. Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. & Johne, R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* **113**, 1014–1026 (2012).
138. Green, M. R. & Sambrook, J. Touchdown Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc* **2018**, (2018).
139. Green, M. R. & Sambrook, J. Hot Start Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc* **2018**, (2018).
140. Bioinformatics Software and Services | QIAGEN Digital Insights. <https://digitalinsights.qiagen.com/>.
141. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403–410 (1990).
142. Camacho, C. *et al.* BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**, 421 (2009).
143. Sanabria-Solano, C. *et al.* Regulation of viral gene expression by the herpes simplex virus 1UL24 protein (HSV-1UL24 inhibits accumulation of viral transcripts). *Virology* **495**, 148–160 (2016).
144. UL22 - Envelope glycoprotein H - Human herpesvirus 1 (HHV-1) - UL22 gene & protein. <https://www.uniprot.org/uniprot/G8H907>.
145. UL22 type 1 membrane protein; contains a signal peptide; possible membrane fusogen; complexed with envelope glycoprotein L [Human herpesvirus 1 (Herpes simplex virus type 1)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2703373>.
146. Preston, V. G., Murray, J., Preston, C. M., McDougall, I. M. & Stow, N. D. The UL25 Gene Product of Herpes Simplex Virus Type 1 Is Involved in Uncoating of the Viral Genome. *Journal of Virology* **82**, 6654–6666 (2008).
147. Preston, V. G., al-Kobaisi, M. F., McDougall, I. M. & Rixon, F. J. The herpes simplex virus gene UL26 proteinase in the presence of the UL26.5 gene product promotes the formation of scaffold-like structures. *J Gen Virol* **75 (Pt 9)**, 2355–2366 (1994).

148. Desai, P., Homa, F. L., Person, S. & Glorioso, J. C. A genetic selection method for the transfer of HSV-1 glycoprotein B mutations from plasmid to the viral genome: preliminary characterization of transdominance and entry kinetics of mutant viruses. *Virology* **204**, 312–322 (1994).
149. Wang, S., Wang, K., Li, J. & Zheng, C. Herpes Simplex Virus 1 Ubiquitin-Specific Protease UL36 Inhibits Beta Interferon Production by Deubiquitinating TRAF3. *J Virol* **87**, 11851–11860 (2013).
150. Database on natural polymorphisms and resistance-related non-synonymous mutations in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus types 1 and 2 | Journal of Antimicrobial Chemotherapy | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/jac/article/71/1/6/2363653>.

ANNEXES

Annexe 1 : Polymorphisme naturel du gène UL23 de la thymidine kinase de l'HSV 1¹⁵⁰

Amino acid change	Nucleotide change	Domain	Antivirals tested	Test methods for phenotype
C6G	A16G	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, plating efficiency assay, DNA reduction assay, dye uptake assay, yield reduction assay (enzyme linked virus inhibitory reporter assay - ELVIRA)
H7P	A20C	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A12P	G34C	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
A12T	G34A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
D14V	A41T	non-conserved region	ACV, Brivudin (BVDU), PCV, CDV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
D14Y	G40T	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV, CDV, FOS	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test, dye uptake assay
Q15L	A44T	non-conserved region	ACV	plaque reduction assay
A17V	C30T	non-conserved region	ACV	dye uptake assay
R18C	C52T	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
S19P	T55C	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV, CDV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
R20H	G59A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
R20S	C58T/ G59C	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
N23S	A68G	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, DNA reduction assay, dye uptake assay, plating efficiency assay, TK functional assay
R26H	G77A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A28V	C83T	non-conserved region	ACV	plaque reduction assay
L29V	T85G	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
R30C	C88T	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay

R32C	C94T	non-conserved region	ACV, FOS	dye uptake assay
Q35deletion	deletion (CAA) nt 103-105	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
K36D	A106G/A108T/C	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
K36deletion	deletion (AAA) nt 106-108	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
K36E	A106G	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, DNA reduction assay, dye uptake assay, plating efficiency assay, yield reduction assay (ELVIRA)
R41H	G122A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, TK functional assay
L42P	T125C	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, yield reduction assay (ELVIRA), dye uptake assay, cell growth assay
Q44H	G132C	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test, DNA reduction assay, TK functional assay
G61A	G182C	ATP-binding site	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
Q67R	A200G	non-conserved region	ACV	plaque reduction assay
L72V	C214T	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
R75C	C223T	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
D76N	G226A	non-conserved region	ACV, FOS	dye uptake assay
D77N	G229A	non-conserved region	ACV	dye uptake assay
I78F	A232T	non-conserved region	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
R89Q	G266A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, yield reduction assay (ELVIRA), dye uptake assay, plating efficiency assay, DNA reduction assay, cell growth assay, TK functional assay
A98T	G292A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
I100T	T299C	non-conserved region	ACV, FOS	dye uptake assay
E111K	G331A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
A118V	C353T	non-conserved region	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test

A137T	G409A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
V138F	G412T	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
V138I	G412A	non-conserved region	ACV	plaque reduction assay, DNA reduction assay, plating efficiency assay, TK functional assay
A140V	C419T	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
H142Y	C424T	non-conserved region	ACV, FOS	dye uptake assay
E146G	A437G	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
H151Y	C451T	non-conserved region	ACV, FOS	dye uptake assay
A156P	G466C	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A156V	C467T	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
F161L	C481T	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
V191A	T572C	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
A192V	C575T	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, plating efficiency assay, yield reduction assay (ELVIRA), dye uptake assay, cell growth assay, DNA reduction assay, TK functional assay
I214T	T641C	non-conserved region	ACV, FOS	yield reduction assay (ELVIRA)
D215A	A644C	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
D215H	G643C	non-conserved region	ACV, FOS	dye uptake assay
D215N	G643A	non-conserved region	ACV	plaque reduction assay
K219T	A656C	conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A233S	G697T	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
G240E	G719A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, dye uptake assay, plating efficiency assay, DNA reduction assay, cell growth assay, TK functional assay
A243S	G727T	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, dye uptake assay
G251C	G751T	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, plating efficiency assay, yield reduction assay (ELVIRA), dye uptake assay, cell growth assay,

				DNA reduction assay, TK functional assay
W259R	T775A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A265T	G793A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, plating efficiency assay, TK functional assay
V267L	G799T	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, plating efficiency assay, yield reduction assay (ELVIRA), DNA reduction assay, dye uptake assay, cell growth assay, TK functional assay
P268L	C803T	non-conserved region	ACV, FOS	dye uptake assay
P268M	C802A/C803T	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
P268T	C802A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, plating efficiency assay, yield reduction assay (ELVIRA), dye uptake assay, DNA reduction assay, cell growth assay, TK functional assay
G271D	G812A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A272T	G814A	non-conserved region	ACV, FOS	dye uptake assay
E273K	G817A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
E273Q	G817C	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
P274T	C820A	non-conserved region	ACV, FOS	dye uptake assay
Q275P	A824C	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test
S276G	A826G	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
S276R	C828A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
N277K	C831A/G	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
N277S	A830G	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
R281Q	G842A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, dye uptake assay, plating efficiency assay, DNA reduction assay
D286E	C858A	conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, plating efficiency assay, yield reduction assay (ELVIRA), dye uptake assay, cell growth assay, TK functional assay

R293W	C877T	non-conserved region	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
A294V	C881T	non-conserved region	ACV, FOS	dye uptake assay
P295T	C883A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
P299S	G895A/ C896G	non-conserved region	ACV, FOS	dye uptake assay
G302S	C958A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
D303N	G907A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
A309V	C926T	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A316V	C947T	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
H323Y	C967T	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
L327M	C980A	non-conserved region	ACV, FOS	dye uptake assay
D328E	T984G/A	non-conserved region	ACV, FOS	dye uptake assay
S332L	T994C/ C995T	non-conserved region	ACV	DNA reduction assay, plating efficiency assay
S332P	T994C	non-conserved region	ACV, FOS	dye uptake assay
A334T	G1000A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
G335D	G1004A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
L341R	C1021A/ T1022C	non-conserved region	ACV, FOS	dye uptake assay
S345P	T1033C	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test, DNA reduction assay, TK functional assay
G346W	G1036T	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
V348I	G1042A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, plating efficiency assay, yield reduction assay (ELVIRA), DNA reduction assay, TK functional assay
T350I	C1049T	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
T350S	A1048T	non-conserved region	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
C352I	G1054A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
S357C	C1070G	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
I358V	A1072G	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay

D363N	G1087A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
L364P	T1091C	non-conserved region	ACV	dye uptake assay, TK functional assay
M367T	T1100C	non-conserved region	ACV	dye uptake assay
G373E	G1118A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
E374A	A1124C	non-conserved region	ACV	dye uptake assay
A375P	A1123C	non-conserved region	ACV	plaque reduction assay
N376H	A1126C	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, plating efficiency assay, yield reduction assay (ELVIRA), dye uptake assay, cell growth assay, TK functional assay
N376P	A1126C/ A1123C	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, cell growth assay
N376T	A1127C	non-conserved region	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test

Annexe 2 : Mutations de résistances du gène UL23 de la thymidine kinase de l'HSV1¹⁵⁰

Les acides aminés sans astérisque ont été détectés dans des souches cliniques d'HSV1, ceux avec un astérisque ont été détectés seulement in vitro et ceux ayant deux astérisques ont été retrouvés in vitro et dans des souches cliniques

AA change	Nucleotide change	Domain	Antivirals tested		Drug susceptibility (EC ₅₀ ratio of resistant to sensitive viral isolate or EC ₅₀ value)					Test methods for phenotype	
			R	S	ACV	BVDU	PCV	FOS	CDV		
N23stop	insertion (C) nt 12-15	non-conserved region	ACV	-	EC ₅₀ 12.5 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, crystal structure modeling
R41H	G122A	non-conserved region	ACV	-	not given	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	DNA reduction assay, TK functional assay
R51W	C151T	ATP-binding site	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	984.0 x	500.0 x	450.0 x	1.1x	1.4x		plaque reduction assay, DNA reduction assay, dye uptake assay, plating efficiency assay
Y53C	A158G	ATP-binding site	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ 7.9 μM	EC ₅₀ 11.2 μM	EC ₅₀ 94.7 μM	EC ₅₀ 0.7 μM		modified dye uptake assay including formazan test, TK functional assay
Y53D	T157G	ATP-binding site	ACV	FOS	EC ₅₀ 35.0 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ <66.0 μM	not tested		plaque reduction assay, TK functional assay
Y53H	T157C	ATP-binding site	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ 9.2 μM	EC ₅₀ 44.2 μM	EC ₅₀ 0.4 μM		modified dye uptake assay including formazan test, TK functional assay
Y53stop	T159A	ATP-binding site	ACV	FOS	EC ₉₀ 443.8 μM	not tested	not tested	EC ₉₀ <660.0 μM	not tested		plaque reduction assay
D55N	G163A	ATP-binding site	ACV	CDV	EC ₅₀ 310.8 μM	not tested	not tested	not tested	EC ₅₀ 0.5 μM		plaque reduction assay, cell growth assay, TK functional assay
G56S	G166T/G177C	ATP-binding site	ACV	-	EC ₅₀ 1.9 μM	not tested	not tested	not tested	not tested		DNA reduction assay, plating efficiency assay
P57H	C170A	AT-binding site	ACV	-	EC ₅₀ 204.2 μM	not tested	not tested	not tested	not tested		DNA hybridization assay, dye uptake assay
H58N	C172A	ATP-binding site	ACV, PCV, BVDU	FOS, CDV	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ 1.4 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 135.1 μM	EC ₅₀ 3.5 μM		modified dye uptake assay including formazan test

H58R	A173G	ATP-binding site	ACV	FOS	EC ₅₀ 85.3 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 66.3 μM	not tested	yield reduction assay (enzyme linked virus inhibitory reporter assay - ELVIRA)
G59R	G175C	ATP-binding site	ACV	-	not given	not tested	not tested	not tested	not tested	DNA reduction assay, plating efficiency assay
G59W*	G175T	ATP-binding site	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	605.0 x	>255 0.0x	73.0x	0.6x	2.0x	plaque reduction assay, TK functional assay
K62N**	A186C	ATP-binding site	ACV	-	42.0x	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, DNA hybridization assay, dye uptake assay, cell growth assay
T63A**	A187G	ATP-binding site	ACV	-	not given	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, TK functional assay, crystal structure analysis
T63I	C188T	ATP-binding site	ACV	-	EC ₅₀ 53.3 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	dye uptake assay, DNA hybridization assay
T65N	C194A	non-conserved region	ACV	CDV	EC ₅₀ 21.3 μM	not tested	not tested	not tested	EC ₅₀ 2.0 μM	plaque reduction assay, TK functional assay
Q67stop	C199T	non-conserved region	ACV	-	not given	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay
S74stop	C221G/C222A	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 55.1 μM	EC ₅₀ 2.6 μM	modified dye uptake assay including formazan test, TK functional assay
Y80N	T238A	non-conserved region	ACV	-	EC ₅₀ 5.3 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	DNA reduction assay, plating efficiency assay
E83K	G247T	conserved region	ACV, PCV	FOS	EC ₅₀ 197.1 μM	not tested	EC ₅₀ 400.0 μM	EC ₅₀ 177.0 μM	not tested	plaque reduction assay, dye uptake assay, DNA reduction assay, plating efficiency assay, TK functional assay
P84L	C252T	conserved region	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 152.1 μM	EC ₅₀ 3.7 μM	modified dye uptake assay including formazan test, TK functional assay

P84S	C250T	conserved region	ACV	CDV	EC ₅₀ 71.0 μM	not tested	not tested	not tested	EC ₅₀ 1.6 μM	plaque reduction assay, TK functional assay
M85stop	deletion (A) nt 184-187	ATP-binding site	ACV	-	EC ₅₀ 26.6 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, dye uptake assay, DNA hybridization assay
M85stop	deletion (G) nt 180-183	ATP-binding site	ACV	FOS	EC ₅₀ 148.7 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 45.5 μM	not tested	plaque reduction assay, yield reduction assay (ELVIRA), DNA reduction assay
Y87H	T259C	conserved region	ACV	-	EC ₅₀ 1.1 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	DNA reduction assay, plating efficiency assay
W88R	T262C	conserved region	ACV, BVDU	-	>256.0x	>255.0x	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay
R89W	C265T	non-conserved region	ACV	-	not given	not tested	not tested	not tested	not tested	DNA reduction assay, plating efficiency assay
E95stop	G283A	non-conserved region	ACV	-	EC ₅₀ > 444.0 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay
T103P	A307C	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 50.2 μM	EC ₅₀ 3.7 μM	modified dye uptake assay including formazan test, TK functional assay
T103stop	C310T	non-conserved region	ACV	FOS, CDV	EC ₅₀ > 443.8 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 33.0 μM	EC ₅₀ 0.5 μM	plaque reduction assay, TK functional assay
Q104H	A312T	non-conserved region	ACV	-	EC ₅₀ > 22.2 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	dye uptake assay, DNA hybridization assay
Q104stop	C310T	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 125.7 μM	EC ₅₀ 8.1 μM	plaque reduction assay, dye uptake assay, DNA reduction assay, TK functional assay
H105P	A314C	non-conserved region	ACV	FOS	EC ₅₀ 46.8 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 51.2 μM	not tested	plaque reduction assay, DNA reduction assay, TK functional assay
E111stop	insertion (G) nt 182-185	ATP-binding site	ACV	-	EC ₅₀ 10.0 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, crystal structure modeling

E111stop	insertion (G) nt 273-277	non-conserved region	ACV	FOS	EC ₅₀ 53.0 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 142.0 μM	not tested	dye uptake assay
D116N*	G346A	non-conserved region	ACV, PCV	-	EC ₅₀ 225.1 μM	not tested	EC ₅₀ 369.6 μM	not tested	not tested	plaque reduction assay
V120stop	deletion (G) nt 277	non-conserved region	ACV	-	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	not phenotypically tested
M121R	T362G	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 48.5 μM	EC ₅₀ 1.9 μM	modified dye uptake assay including formazan test, TK functional assay
S123R	C369G/A	non-conserved region	ACV	-	not given	not tested	not tested	not tested	not tested	DNA reduction assay, plating efficiency assay
Q125H	G375C	non-conserved region	ACV	PCV, BVDU	not given	not given	not given	not tested	not tested	plaque reduction assay with recombinant virus
M128L	A382C	non-conserved region	ACV	-	EC ₅₀ 5.3 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	DNA reduction assay, plating efficiency assay
G129D	G386A	non-conserved region	ACV	FOS	EC ₅₀ 196.3 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 82.2 μM	not tested	yield reduction assay (ELVIRA)
P131S*	C391T	non-conserved region	ACV	-	EC ₅₀ > 44.4 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, TK functional assay
I143V	A427G	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 108.0 μM	EC ₅₀ 3.7 μM	modified dye uptake assay including formazan test, TK functional assay
D162A	A485C	conserved region	ACV	FOS	EC ₉₀ 443.8 μM	not tested	not tested	EC ₉₀ <660.0 μM	not tested	plaque reduction assay, TK functional assay
D162H	G484C	non-conserved region	ACV	-	>3.5x	not tested	not tested	not tested	not tested	yield reduction assay (ELVIRA)
D162N	G484A	non-conserved region	ACV	FOS	EC ₅₀ 11.0 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 89.4 μM	not tested	plaque reduction assay, DNA reduction assay, TK functional assay
R163H*	G488A	conserved region	ACV	FOS	EC ₅₀ 27.3 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 71.3 μM	not tested	plaque reduction assay, yield reduction assay (ELVIRA), DNA reduction assay, TK functional assay

A167V*	G500T	non-conserved region	ACV	-	EC ₅₀ > 44.3 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, TK functional assay
A168T	G502A	nucleoside-binding site	BVDU	ACV, PCV, FOS, CDV	1.0x	>2260.0x	0.7x	1.2x	0.8x	plaque reduction assay, TK functional assay, crystal structure analysis
L170P	T509C	nucleoside-binding site	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 24.0 μM	EC ₅₀ > 31.6 μM	EC ₅₀ 52.7 μM	EC ₅₀ 3.7 μM	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test, TK functional assay
Y172C	A515G	nucleoside-binding site	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 30.7 μM	EC ₅₀ 0.4 μM	modified dye uptake assay including formazan test, TK functional assay
P173L* *	C518T	nucleoside-binding site	ACV	-	not given	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, DNA reduction assay, TK functional assay
P173R	C518G	nucleoside-binding site	ACV	CDV	EC ₅₀ > 443.8 μM	not tested	not tested	not tested	EC ₅₀ 0.2 μM	plaque reduction assay, TK functional assay
A174P	G520C	nucleoside-binding site	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 137.9 μM	EC ₅₀ 9.3 μM	modified dye uptake assay including formazan test, TK functional assay
A175V	C524T	nucleoside-binding site	ACV	FOS	EC ₅₀ 42.0 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 167.0 μM	not tested	dye uptake assay, TK functional assay
R176Q	G527A	nucleoside-binding site	ACV	FOS	EC ₉₀ 443.8 μM	not tested	not tested	EC ₉₀ <660.0 μM	not tested	plaque reduction assay, DNA hybridization assay, cell growth assay, dye uptake assay, TK functional assay, crystal structure analysis
R176stop	C526T	nucleoside-binding site	ACV	-	not given	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested
R176W	C526T/A528G	nucleoside-binding site	ACV	-	EC ₅₀ > 50.0 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, TK functional assay
L178R	T533G	non-conserved region	ACV	-	EC ₅₀ 2.6 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	DNA reduction assay, plating efficiency assay

S181N	G542A	non-conserved region	ACV, FOS	-	EC ₅₀ 21.5 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 46.0 μM	not tested	plaque reduction assay
M182stop	deletion (C) nt 455-458	non-conserved region	ACV	FOS	EC ₅₀ 154.5 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 57.1 μM	not tested	yield reduction assay (ELVIRA)
M182stop	deletion (C) nt 460-464	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 75.6 μM	EC ₅₀ 1.1 μM	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test, DNA reduction assay, dye uptake assay, DNA hybridization assay, yield reduction assay (ELVIRA), TK functional assay
M182stop	deletion (G) nt 430-436	non-conserved region	ACV	FOS	EC ₉₀ <887.5 μM	not tested	not tested	EC ₉₀ <660.0 μM	not tested	plaque reduction assay, plating efficiency assay, dye uptake assay, DNA hybridization assay, yield reduction assay (ELVIRA), DNA reduction assay, TK functional assay
T183stop	insertion (GG) nt 430-437	non-conserved region	ACV	-	EC ₅₀ 126.1 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, DNA hybridization assay
Q185R*	C553A/A554G	non-conserved region	ACV, PCV	-	EC ₅₀ 135.9 μM	not tested	EC ₅₀ 392.8 μM	not tested	not tested	plaque reduction assay, TK functional assay
V187M	G559A	non-conserved region	ACV	-	EC ₅₀ > 40.0 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, in vivo test in mice
A189V	C566T	non-conserved region	ACV, PCV	FOS	EC ₅₀ 255.3 μM	not tested	EC ₅₀ 38.0 μM	EC ₅₀ 74.9 μM	not tested	plaque reduction assay, plating efficiency assay, yield reduction assay (ELVIRA), DNA reduction assay, TK functional assay
I194 deletion	deletion (CCC) nt 582-584	non-conserved region	ACV	-	EC ₅₀ 6.9 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	DNA reduction assay, plating efficiency assay

G200C	G598T	non-conserved region	ACV	CDV	EC ₅₀ 44.4 μM	not tested	not tested	not tested	EC ₅₀ 4.8 μM	plaque reduction assay, yield reduction assay (ELVIRA), TK functional assay
G200D	G599A	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 49.8 μM	EC ₅₀ 2.8 μM	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test, DNA reduction assay, plating efficiency assay,
G200S	G598T/ G599C	non-conserved region	ACV	-	EC ₅₀ 35.0 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 334.0 μM (intermediate resistance level)	not tested	dye uptake assay, TK functional assay
T201P	A601C	non-conserved region	ACV	-	EC ₅₀ 106.6 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	dye uptake assay, DNA hybridization assay
V204G	T611G	non-conserved region	ACV	FOS	EC ₅₀ 25.0 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 220.0 μM	not tested	plaque reduction assay, TK functional assay
G206R*	G616A	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	>979.0x	>3230x	>769.0x	1.2x	1.1x	plaque reduction assay
A207P	G619C	non-conserved region	ACV	FOS	EC ₅₀ > 50.0 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ <66.0 μM	not tested	plaque reduction assay, TK functional assay
L208F	C622T	non-conserved region	ACV	-	EC ₅₀ 12.5 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, crystal structure modeling
L208H	T623A	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ 7.9 μM	EC ₅₀ 11.2 μM	EC ₅₀ 296.0 μM	EC ₅₀ 1.9 μM	modified dye uptake assay including formazan test, TK functional assay
R216C	C646T	conserved region	ACV, PCV	-	EC ₅₀ 197.1 μM	not tested	EC ₅₀ 116.8 μM	not tested	not tested	plaque reduction assay, DNA hybridization assay, dye uptake assay, TK functional assay
R216H	G647A	conserved region	ACV	FOS	EC ₅₀ 116.8 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 74.6 μM	not tested	yield reduction assay (ELVIRA), DNA reduction assay, TK functional assay

R216S*	C646T/ G647C	conserved region	ACV	CDV	EC ₅₀ > 88.8 μM	not tested	not tested	not tested	EC ₅₀ > 0.04 μM	plaque reduction assay, TK functional assay
R220C	C658T	conserved region	ACV	FOS	EC ₉₀ 887.5 μM	not tested	not tested	EC ₉₀ < 660.0 μM	not tested	plaque reduction assay, yield reduction assay (ELVIRA)
R220H* *	G659A	conserved region	ACV, PCV, BVDU	CDV, FOS	147.0 x	> 3230.0x	5.4x	0.7x	0.7x	plaque reduction assay, plating efficiency assay, DNA reduction assay, TK functional assay
R222C	C664T	conserved region	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	EC ₅₀ 23.7 μM	EC ₅₀ 20.6 μM	EC ₅₀ 8.2 μM	EC ₅₀ 44.3 μM	EC ₅₀ 1.0 μM	modified dye uptake assay including formazan test, DNA hybridization assay, dye uptake assay, cell growth assay
R222H	G665A	conserved region	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 24.0 μM	EC ₅₀ > 31.6 μM	EC ₅₀ 36.7 μM	EC ₅₀ 1.6 μM	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test, DNA reduction assay, plating efficiency assay, cell growth assay
G224 frameshift	deletion (C) nt 666-669	conserved region	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 82.8 μM	EC ₅₀ 4.4 μM	modified dye uptake assay including formazan test, dye uptake assay, DNA hybridization assay, TK functional assay
L227F	C679T	non-conserved region	ACV	FOS	EC ₉₀ 887.5 μM	not tested	not tested	EC ₉₀ < 660.0 μM	not tested	plaque reduction assay, TK functional assay
D228stop*	insertion (T) nt 364	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	EC ₅₀ > 444.0 μM	EC ₅₀ 123.2 μM	EC ₅₀ > 400.0 μM	EC ₅₀ 83.2 μM	EC ₅₀ 1.9 μM	plaque reduction assay, TK functional assay
D228stop**	insertion (G) nt 430-436	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 136.3 μM	EC ₅₀ 7.0 μM	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test, DNA reduction assay, dye uptake assay, yield reduction

										assay (ELVIRA), plating efficiency assay, cell growth assay, TK functional assay
D228st op	insertion (C) nt 460- 464	non- conserve d region	ACV	FOS	EC ₅₀ 31.0 μM	not teste d	not teste d	EC ₅₀ <66.0 μM	not tested	plaque reduction assay
D228st op	insertion (C) nt 548- 553	non- conserve d region	ACV, BVDU , PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ 222.0 μM	not teste d	not teste d	EC ₅₀ 27.4 μM	not tested	plaque reduction assay, plating efficiency assay, yield reduction assay (ELVIRA), dye uptake assay, DNA reduction assay, TK functional assay
D228st op	insertion (T) nt 651	conserve d region	ACV, BVDU , PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 104.0 μM	EC ₅₀ 4.4 μM	modified dye uptake assay including formazan test, TK functional assay
Y239S*	A716C	non- conserve d region	ACV, BVDU , PCV	FOS, CDV	186.5 x	79.5x	22.0x	1.1x	0.9x	plaque reduction assay
T245M	C245T	non- conserve d region	ACV, BVDU , PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 104.0 μM	EC ₅₀ 4.4 μM	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test, TK functional assay
T245P	A733C	non- conserve d region	ACV	-	EC ₅₀ 5.4 μM	not teste d	not teste d	not teste d	not tested	DNA reduction assay, plating efficiency assay
L249P	T746C	non- conserve d region	ACV	-	EC ₅₀ 53.0 μM	not teste d	not teste d	not teste d	not tested	dye uptake assay
Q250st op	C748T	non- conserve d region	ACV, BVDU , PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 77.9 μM	EC ₅₀ 0.4 μM	modified dye uptake assay including formazan test, TK functional assay
R256W	C766T	non- conserve d region	ACV, BVDU , PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 107.9 μM	EC ₅₀ 3.7 μM	modified dye uptake assay including formazan test, TK functional assay
E257K	G769A	non- conserve d region	ACV	FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	not teste d	not teste d	not given	not tested	modified dye uptake assay including formazan test

Q261R	A782G	non-conserved region	ACV	FOS	EC ₅₀ 106.6 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 306.9 μM	not tested	plaque reduction assay, plating efficiency assay, TK functional assay
Q261stop*	A782T	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	468.0 x	>323 0.0x	>769.0x	1.5x	1.8x	plaque reduction assay, DNA reduction assay, plating efficiency assay
S263stop	deletion (CAGCTT TCGGGG G) nt 781-793	non-conserved region	ACV	FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	not tested	not tested	not given	not tested	modified dye uptake assay including formazan test
V267 frameshift	deletion (C) nt 548-553	non-conserved region	ACV	CDV	EC ₅₀ >444.0 μM	not tested	not tested	not tested	EC ₅₀ 0.5 μM	plaque reduction assay, plating efficiency assay, dye uptake assay, DNA reduction assay, TK functional assay
R281stop*	C841T	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	316.0 x	>177 0.0x	>438.0x	1.1x	0.9x	plaque reduction assay, plating efficiency assay, yield reduction assay, DNA reduction assay, in vivo test in mice, TK functional assay
D286 frameshift	deletion (G) nt 853-856	conserved region	ACV	FOS	EC ₅₀ 16.0 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ <66.0 μM	not tested	plaque reduction assay
T287M	C860T	conserved region	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	>105 0.0x	>323 0.0x	>769.0x	1.0x	1.3x	plaque reduction assay, plating efficiency assay, DNA hybridization assay, dye uptake assay, DNA reduction assay, TK functional assay
L288stop	T862A	conserved region	ACV	-	EC ₅₀ 16.0 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, crystal structure modeling
L291R	T872G	non-conserved region	ACV	-	EC ₅₀ 1.0 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	DNA reduction assay, plating efficiency assay

A294 frameshift	deletion (G) nt 878-880	non-conserved region	ACV	FOS	EC ₉₀ 443.8 μM	not tested	not tested	EC ₉₀ <660.0 μM	not tested	plaque reduction assay
L297S	T890C	non-conserved region	ACV	-	EC ₅₀ > 22.2	not tested	not tested	not tested	not tested	dye uptake assay, DNA hybridization assay
N301 frameshift	deletion (C) nt 896-900	non-conserved region	ACV	FOS	EC ₉₀ 443.8 μM	not tested	not tested	EC ₉₀ <660.0 μM	not tested	plaque reduction assay
A301 insertion*	insertion (GCC) nt 896	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₉₀ 233.1 μM	EC ₉₀ > 44.0 μM	EC ₉₀ >400.0 μM	EC ₉₀ 48.8 μM	EC ₉₀ 1.5 μM	plaque reduction assay, TK functional assay
N306stop*	insertion (C) nt 698-699	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	EC ₅₀ >444.0 μM	EC ₅₀ 146.1 μM	EC ₅₀ >400.0 μM	EC ₅₀ 38.3 μM	EC ₅₀ 1.9 μM	plaque reduction assay, TK functional assay
N306stop**	insertion (C) nt 883-887	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	EC ₅₀ 233.1 μM	EC ₅₀ > 44.0 μM	EC ₅₀ 151.2 μM	EC ₅₀ 22.8 μM	EC ₅₀ 2.2 μM	plaque reduction assay, crystal structure modeling, TK functional assay
N306stop*	insertion (A) nt 901-902	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	EC ₅₀ 233.1 μM	EC ₅₀ > 44.0 μM	EC ₅₀ > 44.0 μM	EC ₅₀ 22.8 μM	EC ₅₀ 2.2 μM	plaque reduction assay, TK functional assay
N306stop*	insertion (G) nt 904-905	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	EC ₅₀ 233.1 μM	EC ₅₀ > 44.0 μM	EC ₅₀ > 44.0 μM	EC ₅₀ 22.8 μM	EC ₅₀ 2.2 μM	plaque reduction assay
V307 frameshift*	deletion (G) nt 919	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	EC ₅₀ >444.0 μM	EC ₅₀ 55.4 μM	EC ₅₀ > 40.0 μM	EC ₅₀ 104.9 μM	EC ₅₀ 2.2 μM	plaque reduction assay
L315S	T944C	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 50.5 μM	EC ₅₀ 6.7 μM	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test, TK functional assay
M322K*	T965A	non-conserved region	ACV, PCV	-	EC ₅₀ 197.1 μM	not tested	EC ₅₀ >400.0 μM	not tested	not tested	plaque reduction assay
P334 frameshift	deletion (G) nt 996	non-conserved region	ACV	FOS	EC ₅₀ 20.0 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 96.0 μM	not tested	plaque reduction assay
C336Y	G1007A	conserved region	ACV	-	EC ₅₀ 55.5 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, DNA reduction assay, cell growth assay, dye uptake assay, DNA hybridization assay, TK functional assay,

										crystal structure analysis
Q342stop	C1024T/A1025G	non-conserved region	ACV	FOS	EC ₉₀ 443.8 μM	not tested	not tested	EC ₉₀ <660.0 μM	not tested	plaque reduction assay, plating efficiency assay DNA reduction assay
T354P	A1060C	non-conserved region	ACV	-	EC ₅₀ 1.5 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	DNA reduction assay, plating efficiency assay
P355 frameshift	deletion (C) nt 1061-1065	non-conserved region	ACV	CDV	EC ₅₀ >443.8 μM	not tested	not tested	not tested	EC ₅₀ 0.03 μM	plaque reduction assay, TK functional assay
G356 frameshift	deletion (A) nt 1065	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ > 32.0 μM	EC ₅₀ 120.1 μM	EC ₅₀ 1.9 μM	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test, cell growth assay, TK functional assay
A365T	G1039A	non-conserved region	ACV	-	112.8 x	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, modified Vero-ICP10-Luciferase assay
E374 frameshift	deletion (G) nt 1117-1121	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ > 35.5 μM	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ 5.2 μM	EC ₅₀ 200.3 μM	EC ₅₀ 0.4 μM	modified dye uptake assay including formazan test, TK functional assay
N376stop	deletion (969 nt) nt 363	non-conserved region	ACV	FOS	EC ₉₀ >887.5 μM	not tested	not tested	EC ₉₀ <660.0 μM	not tested	plaque reduction assay
N376stop	insertion (C) nt 666-669	conserved region	ACV	-	EC ₅₀ 12.5 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, crystal structure modeling
N376stop*	insertion (G) nt 919	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	EC ₅₀ 233.1 μM	EC ₅₀ > 44.0 μM	EC ₅₀ 151.2 μM	EC ₅₀ 22.8 μM	EC ₅₀ 2.2 μM	plaque reduction assay, TK functional assay
N376stop*	insertion (T) nt 929	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	EC ₅₀ > 443.8 μM	EC ₅₀ 112.2 μM	EC ₅₀ > 400.0 μM	EC ₅₀ 171.9 μM	EC ₅₀ 0.3 μM	plaque reduction assay, TK functional assay
N376stop	insertion (C) nt 1061-1065	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	EC ₅₀ > 35.2 μM	EC ₅₀ 16.8 μM	EC ₅₀ > 31.6 μM	EC ₅₀ 84.0 μM	EC ₅₀ 0.9 μM	modified dye uptake assay including formazan test

Annexe 3 : Polymorphisme naturel du gène UL30 de l'ADN polymérase virale de l'HSV 1¹⁵⁰

Amino acid change	Nucleotide change	Domain	Antivirals tested	Test methods for phenotype
S3A	T7G	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
G12E	C35A	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
S15A	T43G	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A17T	G49A	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
A17V	C50T	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A20V	C59T	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
F23I	T67A	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
A25V	C74T	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A27T	G79A	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
P29H	C86A	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
R30C	C88T	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A32I	G94A/ C95T	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
S33G	A97G	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay, plating efficiency assay, DNA pol functional assay
S33R	C99G/A	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
Q42K	C124A	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
K57N	G171C/T	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
P61S	C181T	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
E70D	A210T	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
D72N	G214A	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
A78D	C233A	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
A78V	C233T	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test

R80L	G239T	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
K90R	A269G	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
H98N	C292A	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A102T	G304A	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
K104Q	A310C	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
G108R	G322A	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
E111K	G331A	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
R112H	G335A	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
R116H	G347A	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
S127L	C380T	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
G132C	G394T	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
P137G	C409G/C410G	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
P137Q	C410A	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
A138V	C413T	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
V144I	G430A	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
T145A	A433G	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
V146I	G436A	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
N155T	A464C	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A159V	C476T	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A164T	G490A	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
F167L	T499C	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
F171S	T511A/ T512G	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
M207I	G621A/C/T	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
K209T	A626C	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
V212A	G635C	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
R219S	C655A	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test

A220T	G658A	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A229T	G685A	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
A230V	C689T	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
I243T	T728C	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
F248L	T742C	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
R264H	G791A	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
L267M	C799A	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test
S280A	T838G	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
C287Y	G860A	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A289D	A866A	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
V297A	T890C	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
F303L	C909A/G	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
P320S	C958T	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
R322Q	G965A	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A330R	G988C/ C989G	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay, plating efficiency assay, DNA pol functional assay
I352V	A1054G	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test
G354V	G1061T	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
M356I	G1068A	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test
E376D	G1128C/T	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
E376G	A1127G	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
V383L	G1147T	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
H386Y	C1156T	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
E421D	A1263T	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay

N425T	A1274C	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay modified dye uptake assay including formazan test
A428V	C1283T	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A429T	G1285A	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
R430K	G1289A	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
T434M	C1301T	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
G458S	G1372A	conserved region IV (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
L479M	C1435A	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
T480M	C1439T	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
G495V	G1484T	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
V498G	T1493G	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
V498M	G1492A	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
G505D	G1514A	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
S507R	A1519C	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
V521M	G1561A	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, BVDU, PCV, FOS, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
N522S	A1565G	non-conserved region (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
A562T	G1684A	conserved region delta-region C (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test, DNA reduction assay
A566T	G1696A	conserved region delta-region C (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test
K591R	A1772G	conserved region VI (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
D630A	A1889C	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
G633D	G1898A	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
T639I	C1916T	non-conserved region (NH ₂ -terminal domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test
A646T	G1936A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, yield reduction assay (enzyme linked virus

				inhibitory reporter assay - ELVIRA)
E649D	G1947T	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, DNA reduction assay
E659D	G1977C/T	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
D660E	C1980G/A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
E661K	G1981A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
E662D	G1986C/T	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
P664T	C1990A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
E667deletion	deletion (GAG) nt 1999-2001	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
G668deletion	deletion (GGG) nt 2002-2004	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
G668E	G2003A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
E669D	G2007C/T	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
E669G	A2006G	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
E671K	G2011A	non-conserved region	ACV	dye uptake assay
D672N	G2014A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
E673K	G2017A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
R674H	G2021A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
E675A	A2024C	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
E675K	G2023A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
E684A	A2051C	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
E684D	G2052T/C	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
E688K	G2062A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
D703N	G2107A	conserved region II (palm domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
N711K	C2133G/A	conserved region II (palm domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
R739S	G2217C/T	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A740S	G2218A/ C2219G	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
V743M	G2227A	non-conserved region (palm domain)	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
E747K	G2239A	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
G749D	G2246A	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test

L753M	C2257A	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
Q794H	G2382C/T	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A857V	C2570T	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
E860K	G2578A	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
Q861R	A2582G	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
L862F	C2584T	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
E868G	A2603G	non-conserved region (fingers domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
A870G	G2609C	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS, CDV	plaque reduction assay, DNA pol functional assay
A870V	C2609A	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
D871N	G2611A	non-conserved region (palm domain)	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
R873C	C2617T	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A874T	G2620A	non-conserved region (palm domain)	ACV	dye uptake assay
P875S	C2623T	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test
V905M	G2713A	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay, dye uptake assay, structural analysis of protein, plating efficiency assay, DNA pol functional assay
K908R	A2723G	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
A910V*	C2729T	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS, CDV	plaque reduction assay
A916T	G2746A	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
P920F	C2758T/ C2759T	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
P920S	C2758T	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS, CDV	plaque reduction assay, dye uptake assay, DNA pol functional assay
I922T	T2765C	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS, PCV, CDV	plaque reduction assay
E927D	A2781T/C	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
T931A	A2971G	non-conserved region (palm domain)	ACV	dye uptake assay
T931I	C2792T	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
I942L	A2824C	conserved region VII (palm domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay

Y946F	A2837T	conserved region VII (palm domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
G948C	G2842T	non-conserved region (palm domain)	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
K949T	A2846C	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
R993L	G2978T	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
A995T	G2983A	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
E1005K	G3013A	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test, yield reduction assay (ELVIRA)
A1012V	C3035T	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
R1019G	C3055G	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
R1020C	C3058T	non-conserved region (thumb domain)	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
R1020H	G3059A	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
T1022A	A3064G	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
V1077L	G3229C	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test
Q1079K	C3235A	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
E1082K	G3244A	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
E1084A	A3251C	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
E1084K	G3250A	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
E1085D	G3255C/T	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
E1085K	G3253A	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
T1086M	C3257T	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A1099T	G3295A	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
A1100T	G3298A	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
D1103H	G3307C	non-conserved region (thumb domain)	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
E1104D	G3312T	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test

E1104K	G3310A	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A1109T	G3325A	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
P1112L	C3335T	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
S1113C	C3338G	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
P1114A	C3340G	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
P1114L	C3341T	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
R1117I	C3349A/ G3350T	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
R1117L	G3350T	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
R1117S	C3349A	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
T1121M	C3362T	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
S1123A	T3367G	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
S1123L	C3368T	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test
P1124H	C3371A	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay, structural analysis of protein
P1128L	C3383T	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
G1129R	G3385A	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
G1129V	G3386T	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
A1147T	G3439A	non-conserved region (thumb domain)	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
A1147V	C3440T	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
H1152N	C3454A	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
D1159A	A3476C	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
L1166W	T3497G	non-conserved region (thumb domain)	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
A1168V	C3503T	non-conserved region (thumb domain)	ACV, BVDU, FOS, PCV, CDV	modified dye uptake assay including formazan test
A1175D	C3524A	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A1181T	C3541A	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test

E1194D	A3582C/T	non-conserved region (thumb domain)	ACV, FOS	plaque reduction assay
P1199L	C3596T	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, plating efficiency assay, DNA pol functional assay
P1199Q	C3596A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test
V1202M	G3604A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
A1203T	G3607A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
A1204T	G3610A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test
T1208A	G3622G	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, structural analysis of protein, DNA pol functional assay
A1209T	G3625A	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
A1218S	G3652T	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
T1219M	C3656T	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay
A1220V	C3659T	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
M1226I	G3678A/C/T	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
R1229I	G3686T	non-conserved region	ACV, FOS	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test
L1234I	C3700A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test
A1235T	G3703A	non-conserved region	ACV, FOS	modified dye uptake assay including formazan test

Annexe 4 : Mutations de résistance du gène UL30 de l'ADN polymérase virale de l'HSV 1¹⁵⁰

Les acides aminés sans astérisques ont été détectés dans des souches cliniques d'HSV1, ceux avec un astérisque ont été détectés seulement *in vitro* et ceux ayant deux astérisques ont été retrouvés *in vitro* et dans des souches cliniques

AA change	Nucleotide change	Domain	Antivirals tested		Drug susceptibility (EC ₅₀ ratio of resistant to sensitive viral isolate or EC ₅₀ value)					Test methods for phenotype
			R	S	ACV	BVDU	PCV	FOS	CDV	
L187s top	deletion (C) nt 301	non-conserved region (pre NH ₂ -terminal domain)	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ >35.5 μM	EC ₅₀ >35.2 μM	EC ₅₀ >32.0 μM	EC ₅₀ 104.0 μM	EC ₅₀ 4.4 μM	modified dye uptake assay including formazan test
D368 A*	A1103C	conserved region Exo I (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, FOS	-	not tested	not tested	not tested	not tested	not tested	DNA pol functional assay
I529 M	A1587G	conserved region delta-region C (3'-5'-exonuclease domain)	ACV	BVDU	10.0x	1.3x	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay
K532 T	A1595C	conserved region delta-region C (3'-5'-exonuclease domain)	ACV	FOS	EC ₉₀ 887.5 μM	not tested	not tested	EC ₉₀ <660.0 μM	not tested	plaque reduction assay
E545 D	A1635T/C	conserved region delta-region C (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, BVDU	-	10.0x	1.3x	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay
Y557S *	T1669A/A1670G	conserved region delta-region C (3'-5'-exonuclease domain)	ACV, phosphonoacetic acid (PAA)	-	not given	not tested	not tested	not given	not tested	plaque reduction assay, DNA pol functional assay, mice <i>in vivo</i> assay
Q570 R	C1708A/A1709G	conserved region delta-region C (3'-5'-exonuclease domain)	ACV	FOS	EC ₅₀ 7.1 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 28.2 μM	not tested	yield reduction assay (enzyme linked virus inhibitory reporter assay - ELVIRA)

V573 M*	G1717A	conserved region Exo III (3'-5'-exonuclease domain)	CDV	ACV, FOS	EC ₅₀ 0.1 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 6.9 μM	EC ₅₀ 8.5 μM	plaque reduction assay, mice <i>in vivo</i> assay
D581 A**	A1742C	conserved region Exo III (3'-5'-exonuclease domain)	phosphonoacetic acid (PAA)	-	not tested	not tested	not tested	EC ₅₀ 330.0 μM	not tested	plaque reduction assay, DNA pol functional assay
L583 V	C1747G	conserved region Exo III (3'-5'-exonuclease domain)	ACV	FOS	EC ₉₀ 887.5 μM	not tested	not tested	EC ₉₀ <660.0 μM	not tested	plaque reduction assay, DNA pol functional assay
E597 D*	G1790T	conserved region delta-region C	ACV, PAA	-	10.0x	not tested	not tested	8.0x	not tested	plaque reduction assay
A605 V*	C1814T	conserved region delta-region C	ACV, FOS	PCV, CDV	EC ₅₀ 35.0 μM	not tested	EC ₅₀ 12.4 μM	EC ₅₀ >660.0 μM	EC ₅₀ 2.6 μM	plaque reduction assay
Y608s top	insertion (G) nt 1788	conserved region delta-region C	ACV	-	EC ₅₀ >25.0 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, crystal structure modeling
Q618 H*	G1854T/C	conserved region delta-region C	ACV	BVDU, FOS, CDV	EC ₅₀ 0.6 μM	EC ₅₀ 0.004 μM	not tested	EC ₅₀ 121.4 μM	EC ₅₀ 0.4 μM	plaque reduction assay
V621 S	G1861A/T1862G	conserved region delta-region C	ACV	-	EC ₅₀ 25.0 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, crystal structure modeling
A657 T	G1969A	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV	CDV, FOS	EC ₅₀ >35.5 μM	EC ₅₀ 9.7 μM	EC ₅₀ >32.0 μM	EC ₅₀ 61.1 μM	EC ₅₀ 1.5 μM	modified dye uptake assay including formazan test
D672 N	G2014A	non-conserved region	ACV, BVDU, PCV, FOS	CDV	EC ₅₀ >35.5 μM	EC ₅₀ >3 5.2 μM	EC ₅₀ >3 2.0 μM	EC ₅₀ >422.4 μM	EC ₅₀ 3.7 μM	plaque reduction assay, modified dye uptake assay including formazan test
R700 G*	A2098G	conserved region II	ACV, FOS	PCV	2.0x	not tested	not given	6.0x	not tested	plaque reduction assay, DNA pol functional assay

R700 M**	G2099T	conserved region II	CDV	ACV, FOS	EC ₅₀ 0.06 μM	0.4x	not tested	EC ₅₀ 27.4 μM	EC ₅₀ 7.8 μM	plaque reduction assay, DNA pol functional assay
L702 H	T2105A	conserved region II (palm domain)	ACV, FOS, PCV	CDV	EC ₅₀ 35.5 μM	not tested	EC ₅₀ 194.7 μM	EC ₅₀ 6.0 μM	EC ₅₀ 0.3 μM	plaque reduction assay
L702P	T2105C	conserved region II (palm domain)	ACV, BVDU	-	128.0x	>257.0 x	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay
V714 M*	T2140A	conserved region II (palm domain)	ACV, FOS	BVDU, CDV	EC ₅₀ 0.2 μM	EC ₅₀ 0.01 μM	not tested	EC ₅₀ 214.5 μM	EC ₅₀ 0.5 μM	plaque reduction assay
V715 G	T2144G	conserved region II (palm domain)	ACV, FOS, PCV	CDV	EC ₅₀ >443.8 μM	not tested	EC ₅₀ 176.0 μM	EC ₅₀ >330.0 μM	EC ₅₀ 0.04 μM	plaque reduction assay
V715 M	G2143A	conserved region II (palm domain)	ACV	FOS, CDV	EC ₅₀ 12.7 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ 42.7 μM	EC ₅₀ 0.02 μM	plaque reduction assay
F716L	C2148A/G	conserved region II (palm domain)	ACV, FOS	CDV	1.8x	not tested	not tested	2.9x	2.9x	plaque reduction assay
A719 T	G2155A	conserved region II (palm domain)	ACV, FOS	CDV	5.9x	not tested	not tested	2.2x	1.9x	plaque reduction assay
A719 V	C2156T	conserved region II (palm domain)	ACV, BVDU, PCV	FOS, CDV	EC ₅₀ >3 5.5 μM	EC ₅₀ >35.2 μM	EC ₅₀ 32.0 μM	EC ₅₀ 120.1 μM	EC ₅₀ 1.9 μM	plaque reduction assay, plaque reduction assay including formazan test, dye uptake assay, DNA reduction assay
S724 N	G2171A	conserved region II (palm domain)	PCV, FOS	BVDU	contradictory results	EC ₅₀ 0.4 μM	EC ₅₀ 9.6 μM	EC ₅₀ >422.4 μM	contradictory results	plaque reduction assay including formazan test, yield reduction assay (ELVIRA) DNA reduction assay

S725 G	A2173G	conserved region II (palm domain)	FOS	-	not tested	not tested	not tested	EC ₉₀ >660.0 μM	not tested	plaque reduction assay
F733 C	T2198G	conserved region II (palm domain)	ACV	FOS	EC ₅₀ >10.0 μM	not tested	EC ₅₀ 107.3 μM	not tested	not tested	plaque reduction assay
E771 Q	G2311C	non-conserved region (fingers domain)	ACV	FOS	EC ₉₀ >443.8 μM	not tested	not tested	EC ₉₀ <660.0 μM	not tested	plaque reduction assay
L774F *	C2320T	conserved region VI (fingers domain)	ACV, FOS	-	3.7x	not tested	not tested	3.2x	not tested	plaque reduction assay, DNA reduction assay, denaturing gradient gel electrophoresis, DNA pol functional assay
S775 N	G2324A	conserved region VI (fingers domain)	ACV	FOS	EC ₅₀ >10.0 μM	not tested	EC ₅₀ 27.0 μM	not tested	not tested	plaque reduction assay
L778 M	C2332A	conserved region VI (fingers domain)	ACV, FOS, CDV	-	5.5x	not tested	not tested	2.0x	2.0x	plaque reduction assay
D780 N	G2338A	conserved region VI (fingers domain)	ACV, FOS	CDV	6.1x	not tested	not tested	2.2x	1.2x	plaque reduction assay
W781 V*	T2341G G2342T	conserved region VI (fingers domain)	ACV, FOS	-	14.0x	not tested	not tested	3.0x	not tested	plaque reduction assay
L782I	C2344A	conserved region VI (fingers domain)	ACV, FOS	CDV	6.4x	not tested	not tested	2.3x	1.8x	plaque reduction assay
P797 T*	C2389A	non-conserved region (fingers domain)	ACV, PAA	-	not given	not tested	not tested	not given	not tested	plaque reduction assay
E798 K	G2392A	non-conserved region (fingers domain)	ACV, PCV, FOS	BVDU, CDV	EC ₅₀ 177.2 μM	EC ₅₀ 228.8 μM	EC ₅₀ 132.4 μM	EC ₅₀ 496.0 μM	EC ₅₀ 3.0 μM	plaque reduction assay

L802F*	C2404T	non-conserved region (fingers domain)	ACV, FOS, CDV	BVDU	EC ₅₀ 0.6 μM	EC ₅₀ 0.02 μM	not tested	EC ₅₀ 166.0 μM	EC ₅₀ 0.6 μM	plaque reduction assay
V813 M*	G2437A	conserved region III (fingers domain)	ACV, PCV, FOS	-	5.0x	not tested	3.0x	4.0x	not tested	plaque reduction assay
N815 S**	A2444G	conserved region III (fingers domain)	ACV, PCV	BVDU, FOS, CDV	EC ₅₀ 16.2 μM	EC ₅₀ <0.2 μM	EC ₅₀ >31.6 μM	EC ₅₀ 24.8 μM	EC ₅₀ 1.9 μM	plaque reduction assay
Y818 C*	A2453G	conserved region III (fingers domain)	ACV, PCV, FOS, CDV	BVDU	EC ₅₀ 31.1 μM	EC ₅₀ 0.2 μM	EC ₅₀ 6.0 μM	EC ₅₀ >330.0 μM	EC ₅₀ 2.1 μM	plaque reduction assay
T821 M	C2462T	conserved region III (fingers domain)	ACV, CDV	BVDU	6.3x	0.2x	not tested	contradictory results	2.1x	plaque reduction assay, DNA pol functional assay
G841 C*	G2521T	conserved region III (palm domain)	ACV, PCV, FOS, CDV	-	EC ₅₀ 177.5 μM	not tested	EC ₅₀ 20.0 μM	EC ₅₀ >1320.0 μM	EC ₅₀ 7.4 μM	plaque reduction assay
G841 S	G2521A	conserved region III (fingers domain)	ACV	PAA	29.0x	not tested	not tested	2.6x	not tested	plaque reduction assay
R842 S*	C2524A	conserved region III (fingers domain)	ACV, PCV	-	150x	not tested	4x	not tested	not tested	plaque reduction assay
M880 T	T2639C	conserved region I (palm domain)	ACV	BVDU	10.0x	1.3x	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay
S889 A*	T2665G	conserved region I (palm domain)	ACV, PAA	-	10.0x	not tested	not tested	225.0x	not tested	plaque reduction assay, DNA pol functional assay
F891 C**	T2672G	conserved region I (palm domain)	ACV, PCV, FOS	CDV	10.0x	not tested	2.0x	10.0x	1.7x	plaque reduction assay, DNA pol functional assay
F891Y*	T2672A	conserved region I (palm domain)	ACV, PAA	-	EC ₅₀ 10.0 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ >330.0 μM	not tested	plaque reduction assay

V892 M*	G2674A	conserved region I (palm domain)	ACV, PAA	-	EC ₅₀ 10.0 μM	not tested	not tested	EC ₅₀ >330.0 μM	not tested	plaque reduction assay
G901 V	G2702T	conserved region I (palm domain)	ACV	FOS	EC ₅₀ 15.0 μM	not tested	not tested	not given	not tested	modified dye uptake assay including formazan test
D907 V	A2720T	non-conserved region (palm domain)	ACV, FOS	CDV	3.8x	not tested	not tested	2.3x	1.6x	plaque reduction assay, cell growth assay
I922N *	T2765A	non-conserved region (palm domain)	FOS	CDV	not tested	not tested	not tested	EC ₅₀ 627.0 μM	EC ₅₀ 0.74 μM	plaque reduction assay
Y941 H	T2821C	conserved region VII (palm domain)	ACV, CDV	-	9.4x	not tested	not tested	contradictory results	0.4x	plaque reduction assay, DNA pol functional assay
V958 L*	G2872C	conserved region V (thumb domain)	ACV, FOS, PCV	CDV	EC ₅₀ >27.5 μM	not tested	EC ₅₀ 17.2 μM	EC ₅₀ >660.0 μM	EC ₅₀ 4.1 μM	plaque reduction assay
R959 H*	G2876A	conserved region V (thumb domain)	ACV, FOS, CDV	BVDU	EC ₅₀ 0.3 μM	EC ₅₀ 0.21 μM	not tested	EC ₅₀ 230.0 μM	EC ₅₀ 0.5 μM	plaque reduction assay
K960 R*	A2879G	conserved region V (thumb domain)	CDV	ACV, BVDU, FOS	EC ₅₀ 0.2 μM	EC ₅₀ 0.08 μM	not tested	EC ₅₀ 22.9 μM	EC ₅₀ 2.3 μM	plaque reduction assay
N961 K**	C2883G/A	conserved region V (thumb domain)	ACV	PCV, FOS, CDV	5.3x	not tested	not given	0.8x	1.4x	plaque reduction assay, DNA pol functional assay
W998 L*	G2993T	non-conserved region (thumb domain)	ACV, CDV	BVDU, FOS	EC ₅₀ 0.1 μM	EC ₅₀ 0.01 μM	not tested	EC ₅₀ 35.0 μM	EC ₅₀ 1.6 μM	plaque reduction assay
I1028 T	T3083C	non-conserved region (thumb domain)	CDV	BVDU	contradictory results	EC ₅₀ 0.03 μM	not tested	contradictory results	EC ₅₀ 1.9 μM	plaque reduction assay, DNA pol functional assay
D107 ON*	G3208A	non-conserved region	ACV, FOS	BVDU, CDV	61.0x	0.1x	not tested	2.7x	contradictory	plaque reduction assay,

		(thumb domain)							results	<i>mice in vivo assay</i>
H1228D	C3682G	non-conserved region (thumb domain)	ACV	-	EC ₅₀ >25.0 μM	not tested	not tested	not tested	not tested	plaque reduction assay, crystal structure modeling

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.

L'*Herpes Simplex Virus 1* est un virus ubiquitaire dont les formes cliniques, observées au cours de la primo-infection ou de réactivations ont une sévérité variable allant de formes asymptomatiques à sévères.

Des résistances aux molécules antivirales pouvant avoir des conséquences cliniques chez l'immunodéprimé ont été décrites et sont dues à des mutations dans les gènes UL23 et UL30 codant respectivement la thymidine kinase et l'ADN polymérase virales. Documenter ces résistances permet souvent d'améliorer la prise en charge thérapeutique.

Le génotypage des souches circulantes permet de documenter dans certains cas le mode de transmission du virus et de différencier une réinfection d'une réactivation.

Combiner le génotypage et la recherche des mutations de résistance donne la possibilité d'établir des associations entre le génotypage et le phénotype de résistance, de détecter des mutations de résistances sans conséquences cliniques.

L'objectif de ce travail a été de développer un système de PCR multiplex permettant d'amplifier des zones hypervariables du génome de l'HSV 1 et les gènes UL23 et UL30. Le choix des régions à séquencer et le design des amorces ont été des points clés. Le séquençage par NGS en Ion torrent a permis d'obtenir une séquence consensus nécessaire au génotypage et à la recherche des mutations de résistance mais également d'identifier ces mutations dans des sous populations virales.

La sensibilité de la technique doit être encore améliorée. Il est également nécessaire de mettre en place prospectivement une banque de séquences afin de préciser le génotypage et d'établir un outil bio-informatique permettant l'analyse des mutations de résistance.