

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

\*\*\*\*\*

ANNEE 2012

THESE N°

**PHARMACOGENETIQUE DU TRAITEMENT DES INFECTIONS A  
CYTOMEGALOVIRUS (CMV) PAR GANCICLOVIR : ETUDE  
EXPLORATOIRE EN TRANSPLANTATION RENALE**

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présentée et soutenue publiquement

le 18 septembre 2012

par

**Pierre-André BILLAT**

Né le 7 octobre 1987 à Limoges

DIRECTEUR DE LA THÈSE

M. le Docteur Nicolas PICARD

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Mme le Professeur Nicole OUDART..... Président  
Mme le Professeur Sophie ALAIN ..... Juge  
M. le Docteur Franck SAINT-MARCOUX..... Juge  
Mme le Docteur Annick VARACHAUD..... Membre invité

# LISTE DU CORPS ENSEIGNANT DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE LIMOGES

**DOYEN DE LA FACULTE** Monsieur le Professeur **DUROUX** Jean-Luc

**VICE-DOYEN** Madame **FAGNERE** Catherine, Maître de Conférences

**VICE-DOYEN** Monsieur **BATTU** Serge, Maître de Conférences

## PROFESSEURS

<b>BENEYTOUT</b> Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>BOTINEAU</b> Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
<b>BROSSARD</b> Claude	PHARMACOTECHNIE
<b>BUXERAUD</b> Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
<b>CARDOT</b> Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>CHULIA</b> Albert	PHARMACOGNOSIE
<b>CHULIA</b> Dominique	PHARMACOTECHNIE
<b>DELAGE</b> Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
<b>DESMOULIERE</b> Alexis	PHYSIOLOGIE
<b>DREYFUSS</b> Gilles	MICROBIOLOGIE PARASITOLOGIE MYCOLOGIE
<b>DUROUX</b> Jean-Luc	PHYSIQUE BIOPHYSIQUE INFORMATIQUE
<b>LOUDART</b> Nicole	PHARMACOLOGIE
<b>ROUSSEAU</b> Annick	PHYSIQUE BIOPHYSIQUE INFORMATIQUE

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALERS DES  
DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES**

<b>LACHATRE</b> Gérard	TOXICOLOGIE
<b>MOESCH</b> Christian	HYGIENE – HYDROLOGIE – ENVIRONNEMENT
<b>ROGEZ</b> Sylvie	MICROBIOLOGIE -BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE

**MAITRES DE CONFERENCES**

<b>BASLY</b> Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>BATTU</b> Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>BEAUBRUN GIRY</b> Karine	PHARMACOTECHNIE
<b>BILLET</b> Fabrice	PHYSIOLOGIE
<b>CALLISTE</b> Claude	BIOPHYSIQUE MATHEMATIQUES INFORMATIQUE
<b>CLEDAT</b> Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>COMBY</b> Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>COURTIOUX</b> Bertrand	PHARMACOLOGIE
<b>DELEBASSEE</b> Sylvie	MICROBIOLOGIE BACTERIOLOGIE VIROLOGIE
<b>DEMIOT</b> Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
<b>FAGNERE</b> Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>FROISSARD</b> Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
<b>JAMBUT</b> Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE

<b>LABROUSSE</b> Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
<b>LEGER</b> David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>LIAGRE</b> Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>LOTFI</b> Hayat	TOXICOLOGIE
<b>MARION-THORE</b> Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>MARRE-FOURNIER</b> Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>MILLOT</b> Marion	PHARMACOGNOSIE
<b>MOREAU</b> Jeanne	IMMUNOLOGIE
<b>POUGET</b> Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>SIMON</b> Alain	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
<b>TROUILLAS</b> Patrick	BIOPHYSIQUE MATHEMATIQUES INFORMATIQUE
<b>VIANA</b> Marylène	PHARMACOTECHNIE
<b>VIGNOLES</b> Philippe	BIOPHYSIQUE MATHEMATIQUES INFORMATIQUE

### **PROFESSEUR CERTIFIE**

<b>MARBOUTY</b> Jean-Michel	ANGLAIS
-----------------------------	---------

# REMERCIEMENTS

Madame le Professeur Nicole OUDART, président du jury

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Vous m'avez enseigné et fait partager votre passion pour la Pharmacologie au cours de mes études à la Faculté de Pharmacie de Limoges. Merci pour vos talents de pédagogue et la qualité de vos cours qui me servent toujours de référence. Soyez assurée de mon plus profond respect.

Monsieur le Docteur Nicolas PICARD, directeur de la thèse

Merci Nicolas de m'avoir accordé ta confiance en m'acceptant comme étudiant respectivement de Master, de thèse d'exercice et enfin de thèse de Sciences. J'ai pu apprécier tes précieux conseils, ta gentillesse et ton extrême proximité, j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec toi et j'espère pouvoir longtemps continuer ainsi. Merci pour tout ce temps consacré à la relecture et correction de tous ces documents ainsi que de mes présentations.

Madame le Professeur Sophie ALAIN, membre du jury

Merci Sophie pour votre enseignement des rudiments de la culture virale et pour votre gentillesse. Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de siéger au sein de ce jury.

Monsieur le Docteur Franck SAINT-MARCOUX, membre du jury

Merci Franck pour ton encadrement depuis mon stage d'initiation à la recherche de quatrième année et mes différents stages d'externat jusqu'à aujourd'hui. J'ai pu profiter de ton savoir-faire et ta maîtrise de la pharmacocinétique, de tes

astuces en chimie analytique et de tes nombreux conseils pour mes présentations. Merci pour ta bonne humeur quotidienne et ton humour.

Madame le Docteur Annick VARACHAUD, membre du jury

J'ai été sensible à l'honneur que vous m'avez accordé en acceptant d'être parmi les membres de mon jury de thèse. Vos connaissances en matière de transplantation enrichiront ce travail. Votre intérêt dans ce travail me touche profondément.

Monsieur le Professeur Pierre MARQUET

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire pour effectuer mon stage de Master 2 et ma thèse. J'ai pu apprécier l'habituelle pertinence de vos propos lors de mes présentations au laboratoire. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Monsieur le Professeur Gérard LACHATRE

Je vous remercie de vos précieux conseils concernant mon orientation dans le domaine de la recherche. Votre savoir en toxicologie, votre rigueur, votre sens de la précision, votre capacité d'écoute et vos qualités humaines constituent un exemple pour moi. Soyez assuré de mon plus profond respect.

Un grand merci à mes amis et collègues

Merci à toute l'unité Inserm UMR-S850 de la Faculté

Merci Jean-Baptiste pour tous ces bons moments passés et à venir devant R, pour m'avoir transmis ton savoir, ta passion communicative pour les statistiques ainsi que ta disponibilité et ta bonne humeur. Merci Poupou pour tous ces bons muffins et pour ta sympathie. Merci Sofiane pour m'avoir fait partager tes connaissances, ton expérience de jeune thésard et pour tes cours d'histoire et

culture kabyle. Merci François-Ludovic pour ta rigueur, ta culture et ta maîtrise de la CLHP-MS/MS et de l'orthographe. Merci à Jean-Hervé et Khadija pour m'avoir appris les techniques nécessaires à ce travail toujours avec plaisir et patience. Merci à Annick, Aurélie, Elodie, Jana, Julien, Louis, Lynn, Patricia, Zeinab pour tous ces bons moments passés dans le bureau.

Merci à toute l'équipe du CHU

Merci notamment à Jean-Louis pour m'avoir consacré beaucoup de ton temps pour la mise au point des dosages de la guanosine, à Joël et Éric avec qui j'ai passé de bons moments en salle d'urgences et qui, par leur savoir-faire, m'ont sorti de plus d'une impasse.

Un grand merci à mes amis de plus longue date

A Gabin et Gaëlle pour leur amitié fidèle et sincère depuis des années.  
A Guillaume pour nos parties de pêche et de cartes à Cieux.  
A Romain et Benoît mes amis du lycée que j'espère revoir au plus vite.  
A mes amis du club d'échecs : Brovsky, Guigui, Jéjé, Maxime, Riton, Tché, Youri... pour toutes ces bonnes soirées et nuits passées à jouer.  
A Thomas et Claire et Thibaut pour toutes les aprèms « énigmes », les repas au « RU » et les soirées garderie.

Merci à Mathilde

Pour ta patience et ton amour.

Merci à mes parents, mes grands-parents, mon frère

Pour vos encouragements, votre affection et votre soutien depuis toujours.

# SOMMAIRE

<b>LISTE DU CORPS ENSEIGNANT DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE LIMOGES</b>	<b>2</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>5</b>
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>8</b>
<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>14</b>
<b>LISTE DES TABLEUX .....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>17</b>
<b>PREMIERE PARTIE : LE CYTOMEGALOVIRUS .....</b>	<b>20</b>
I. INTRODUCTION .....	20
II. VIRUS & STRUCTURE.....	21
III. REPLICATION .....	22
IV. ÉPIDEMIOLOGIE.....	25
V. PHYSIOPATHOLOGIE .....	25
1. <i>Introduction.....</i>	<i>25</i>
2. <i>Infection chez l'immunocompétent.....</i>	<i>26</i>
3. <i>Infection congénitale.....</i>	<i>26</i>
4. <i>Patient transplanté et immunodéprimé.....</i>	<i>27</i>
VI. DIAGNOSTIC .....	28
1. <i>Direct.....</i>	<i>28</i>
2. <i>Indirect.....</i>	<i>29</i>
<b>DEUXIEME PARTIE: TRAITEMENTS &amp; PROPHYLAXIE.....</b>	<b>30</b>
I. GANCICLOVIR & VALGANCICLOVIR .....	30
1. <i>Structures .....</i>	<i>30</i>
2. <i>Formes thérapeutiques.....</i>	<i>30</i>
3. <i>Pharmacodynamie.....</i>	<i>32</i>

4. Pharmacocinétique .....	34
5. Contre-Indications .....	36
6. Effets indésirables .....	36
7. Interactions médicamenteuses .....	36
II. AUTRES ANTIVIRAUX .....	37
1. L'aciclovir (spécialité Zovirax®) .....	37
2. Le foscarnet (spécialité Foscavir®) .....	38
3. Le cidofovir (spécialité Vistide®) .....	38
III. PROPHYLAXIE .....	39
IV. RESISTANCES AUX ANTIVIRAUX .....	39
<b>TROISIEME PARTIE : NOTIONS DE PHARMACOGENETIQUE .....</b>	<b>41</b>
I. INTRODUCTION .....	41
II. METHODES D'ANALYSE DU GENOME .....	42
1. Introduction.....	42
2. Le génotypage par technologie Taqman®.....	43
3. Le génotypage par technologie « molecular beacons » .....	48
4. Le séquençage post PCR.....	49
5. Les micropuces (microarrays) .....	52
III. CIBLES DE LA PG DU GCV .....	53
1. Classification des grandes familles de transporteurs.....	53
2. Les transporteurs du GCV.....	57
<b>QUATRIEME PARTIE : PROJET « PHARMACOGENETIQUE ET SUIVI THERAPEUTIQUE PHARMACOLOGIQUE DU GCV EN TRANSPLANTATION ».....</b>	<b>59</b>
I. INTRODUCTION .....	59
II. MATERIEL ET METHODES : .....	62
1. Pharmacogénétique : .....	62
2. Virologie.....	76
3. Mise au point du dosage des dérivés phosphorylés intracellulaire du GCV par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.....	80
III. RESULTATS .....	83
1. Evolution des PNN au cours de l'étude.....	83
2. Analyse génotypique et haplotypique .....	85

3. <i>Analyse multivariée</i> .....	86
4. <i>Culture virologique</i> .....	88
5. <i>Etude analytique</i> .....	88
IV. DISCUSSION ET CONCLUSION : .....	93
<b>PERSPECTIVES</b> .....	<b>97</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>99</b>
<b>SERMENT DE GALIEN</b> .....	<b>108</b>

## ABREVIATIONS

AB = Antibiotiques

ADN = Acide désoxyribonucléique

ARC = Attaché de recherche clinique

ARN = Acide ribonucléique

ASC = Aire sous la courbe

CMV = Cytomégalovirus

CNR = Centre national de référence

CNT = *Concentrative Nucleoside Transporters*

D = Donneur

D- = Donneur séronégatif au CMV

D+ = Donneur séropositif au CMV

ddNTP = Didésoxynucléotides triphosphatés

EBV = Epstein Barr Virus

ECP = Effet CytoPathogène

ENT = *Equilibrative Nucleoside Transporters*

DE genes = *Delay-Early genes* (gènes à transcription précoce)

GCV = Ganciclovir

GCV-MP = Ganciclovir monophosphate

GCV-TP = Ganciclovir triphosphorylé

HHV5 = Herpèsvirus humain 5

HLA = *Human leucocyte antigen*

Indels : Polymorphismes de type insertion ou délétion

IE = *Immediate Early* (gènes à transcription très précoce)

IF = Immunofluorescence

Ig = Immunoglobulines

IRL = *Internal Repeat Long*

IRS = *Internal Repeat Short*

iv = Intra-veineux

LCR = Liquide céphalorachidien

MATE = *Multidrug And Toxic compound Extrusion*

MICI = Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MMF = Mycophénolate mofétil

m-TOR = *Mammalian Target Of Rapamycin*

NK = *Natural Killer*

OAT = Transporteur d'anions organiques (*organic anions transporter*)

OCT = Transporteur de cations organiques (*organic cations transporter*)

pb = Paire de bases

PCR = *Polymerase chain reaction*

PG = Pharmacogénétique

P-gp = P-glycoprotéine

PMEA = 9-(2-phosphonylméthoxyéthyl)adénine

PMEG = 9-(2-phosphonylméthoxyéthyl)guanine

*po* = *Per os*

R = Receveur

R- = Receveur séronégatif au CMV

R+ = Receveur séropositif au CMV

RE = Réticulum endoplasmique

RR = Risque relatif

SLC = Transporteur soluble (*Solute carrier*)

SNC = Système nerveux central

STAT = Signaux des transducteurs du signal et activateurs de la transcription

SVF = Sérum de veau foetal

TRL = *Terminal Repeat Long*

TRS = *Terminal Repeat Short*

VGCV = Valganciclovir

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle réplcatif du cytomégalovirus .....	24
Figure 2 : Formule développée du ganciclovir .....	31
Figure 3 : Formule développée du valganciclovir .....	31
Figure 4 : Formule développée de la désoxyguanosine .....	31
Figure 5 : Pharmacodynamie du valganciclovir.....	34
Figure 6 : Principe de la technologie TaqMan® .....	44
Figure 7 : section du Rotor-Gene Q® (source constructeur) .....	46
Figure 8 : Résultat de génotypage de 96 patients sur ABI Prism 7000® du SNP c.-840G>A au niveau du gène UGT2B7 ( <i>en rouge les patients homozygotes sains, en vert les hétérozygotes et en bleu les patients homozygotes variants, les échantillons blancs sont signalés par des rectangles gris</i> ).....	47
Figure 9 : Sonde type utilisé pour la technologie « molecular beacons ».....	49
Figure 10 : Exemple de résultat de pyroséquençage d'une partie exonique du gène SLC22A1 (séquence de référence).....	53
Figure 11 « Flow Chart » de l'étude .....	65
Figure 12 : Diagramme d'amplification d'ADN pour 35 cycles.....	76
Figure 13 : Diagramme de thermocyclage d'ADN pour 25 cycles .....	77
Figure 14 : Diagramme d'amplification.....	78
Figure 15 : Evolution de la concentration de neutrophiles moyen chez les patients traités par GCV ou VGCV en fonction des visites.....	88
Figure 16 : Evolution de la concentration de neutrophiles chez les patients traités par GCV ou VGCV en fonction des visites par courbe de tendance .....	88
Figure 17 : Gradient des phases mobiles.....	94
Figure 18 : Chromatogramme du mélange des nucléotides GMP [1], GDP [2], GTP [3] et Br-ATP [4] à 2,5mg/L .....	95
Figure 19 : Chromatogrammes des transitions suivies en MRM de GMP avec 1 molécule de DEA [1] de GDP avec 2 molécules de DEA [2] de GTP avec 2 molécules de DEA [3] et de l'étalon interne [4].....	96

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Posologie conseillée des traitements par antiviraux selon l'état rénal..	35
Tableau 2 : Principales familles de gènes des transporteurs d'intérêt .....	58
Tableau 3 : Principaux gènes des transporteurs d'intérêt .....	67
Tableau 4 Polymorphismes candidats sélectionnés, fréquence allélique dans la population caucasienne et conséquences fonctionnelles ou cliniques : .....	69
Tableau 5 : Fréquence et distribution des polymorphismes étudiés chez les transplantés .....	85
Tableau 6 : Analyse univariée de l'association entre les covariables pharmacogénétiques et cliniques avec la concentration de neutrophiles .....	86
Tableau 7 : Modèle final multivarié de l'association entre les covariables pharmacogénétiques avec le taux de neutrophiles .....	87
Tableau 8 : Paramètres spectrométriques des analogues de la guanosine .....	89

« *Sic Itur Ad Astra* »

*Publius Vergilius Maro dit* **V***irgile*

# INTRODUCTION

La découverte du système HLA en 1952 a permis de mieux comprendre le système de reconnaissance du soi et du non-soi et de permettre en 1954 la première greffe rénale réussie entre deux jumeaux. En 1956 on voit apparaître les premiers traitements immunosuppresseurs avec des irradiations totales et les premiers médicaments : corticoïdes, azathioprine, méthotrexate ouvrant la voie à la greffe hépatique (1963), la greffe du pancréas (1966), la greffe du cœur (1967)... En 2011 en France, l'Agence de la Biomédecine estime à 4945 le nombre de greffes effectuées dont 2976 pour le rein. La transplantation favorise l'induction d'une réponse immunitaire pouvant amener à trois types de rejet :

- Le rejet hyper aigu. Il est lié à une immunité acquise vis-à-vis du système HLA du donneur et survient dans les heures suivant la transplantation.

- Le rejet aigu cellulaire. Il correspond à l'immunisation via les lymphocytes T vis-à-vis du greffon et survient dans les mois suivants la greffe.

- Le rejet chronique. Il correspond au vieillissement du greffon et de sa perte de fonctionnalité.

La mise en place de traitements immunosuppresseurs permet de limiter ces risques.

Ce terrain immunodéprimé est toutefois la proie d'infections opportunistes parmi elles, l'infection à cytomégalovirus (CMV) est la principale.

**Le CMV** est un virus à ADN de la famille des herpès virus. C'est un agent ubiquitaire présent chez plus de 75% des adultes occidentaux et dont la

prévalence augmente avec l'âge. Dans le contexte de la transplantation d'organe, l'incidence de l'infection à CMV, en absence de prophylaxie, s'élève à près de 70% dans les sérogroupes à risque (donneur séropositif (D+)/receveur séronégatif (R-) et receveur séropositif (R+))<sup>1</sup>.

Cette infection est responsable d'une diminution de la durée de vie du greffon par augmentation du risque de fibrose, de rejet aigu et de rejet chronique et une augmentation de morbidité et de la mortalité du patient par augmentation du risque de coïnfections opportunistes (notamment au virus d'Epstein-Barr ou EBV), de diabète type 2 post-transplantation et de maladies cardiovasculaires<sup>2</sup>.

Il est donc nécessaire de mettre en place une stratégie thérapeutique non seulement curative mais également prophylactique. Les molécules utilisées en première intention sont le **Ganciclovir (GCV) et sa prodrogue administrée par voie orale : le Valganciclovir (VGCV)**.

Dans l'organisme le VGCV est hydrolysé en GCV. Le GCV est un nucléoside synthétique, analogue de la 2-déoxy-guanosine. Cette molécule est éliminée par voie rénale sous forme non métabolisée. Le GCV est phosphorylé par des enzymes virales. Il inhibe préférentiellement l'ADN-polymérase virale par rapport à celle de l'hôte<sup>3</sup>.

L'intégration de GCV triphosphorylé à l'ADN viral bloque alors sa synthèse, ces molécules sont pour cela appelées « terminateurs de chaîne ».

Les effets indésirables les plus fréquents (retrouvés chez plus d'un patient sur 10) sont : la neutropénie, l'anémie, la dyspnée, la diarrhée, ce qui impose une surveillance importante surtout en début de traitement.

Une neutropénie sévère peut conduire à l'arrêt du traitement ou à la diminution des doses ce qui peut secondairement aboutir à l'émergence d'une résistance virale et à un échec au traitement.

La **pharmacogénétique** décrit l'influence des variations dans la séquence d'ADN génomique de l'individu sur sa réponse vis-à-vis médicaments. Elle est

particulièrement centrée sur l'étude du devenir du médicament dans l'organisme (source de variations d'exposition systémique ou locale et donc d'efficacité ou de toxicité).

**Ce travail de thèse propose de décrire les mécanismes de l'infection par le cytomegalovirus, de comprendre les enjeux des traitements prophylactiques et curatifs du CMV et d'appréhender l'apport fourni par la pharmacogénétique. La quatrième partie est, quant à elle, dédiée à un travail exploratoire mené au sein de l'unité mixte de recherche (UMR) Inserm S850 de « Pharmacologie des immunosuppresseurs et de la transplantation ».**

# PREMIERE PARTIE : LE CYTOMEGALOVIRUS

## I. Introduction

Les CMV sont des virus de type I c'est à dire comportant de l'ADN double brin. Ils appartiennent à la famille des Herpesviridae à l'instar des virus herpès simplex, du virus d'Epstein-Barr et des virus varicelle-zona, ainsi qu'à la sous-famille Betaherpesvirinae. Les Betaherpesvirinae (CMV mais aussi Muromégalo virus et Roséolovirus) ont tous la faculté d'avoir une phase de latence dans les leucocytes, dans les glandes sécrétoires et le rein, une étroite spécificité d'hôte et entraînent également une lyse cellulaire lors de leur réplication.

Les CMV sont largement répartis dans la nature partageant de nombreuses caractéristiques entre eux au niveau de la multiplication et de la phase de latence. Comme pour les autres herpesvirus, l'infection primaire par CMV est fréquemment suivie de réactivations virales. Les cellules possédant d'importantes inclusions, stigmates de l'infection, ont été observées pour la première fois par Ribbert chez un nouveau-né syphilitique en 1881. En 1921, Goodpasture et Talbot évoquèrent que la « cytomégalie » pourrait être liée, du fait de la similitude des lésions, à un agent proche de celui de la varicelle mettant ainsi définitivement fin à l'hypothèse de l'existence d'un protozoaire. Une étude de Cole et Kuttner en 1926 a permis de prouver l'étiologie virale de la maladie chez des cobayes. Weller et al. en 1956 isolèrent le virus et proposèrent en 1960 pour la première fois le nom de cytomégalo virus<sup>4</sup>.

Le CMV humain : hCMV est aussi appelé herpesvirus humain 5 (HHV5) d'après la nomenclature officielle attribuée par l' « International Committee on Taxonomy of Viruses ».

Cette première partie fait appel à une importante quantité de références que l'on peut retrouver dans l'ouvrage Fields' Virology 5<sup>ème</sup> édition volume 2 aux éditions Wolters Kluwer Health.

Le terme CMV, dans la suite de cet ouvrage, fera référence au virus humain.

## II. Virus & structure

Le virion mature du CMV mesure entre 200 et 300nm de diamètre<sup>5</sup>. Il possède un ADN double brin linéaire, séquencé dans le cas de la souche de référence du CMV AD169<sup>6</sup> (ATCC, VR-538™) et disponible dans Genbank sous l'identité X17403. Le CMV possède l'ADN le plus long des herpesvirus avec 196 à 241 kilopaires de bases (kpb) pouvant coder 166 gènes<sup>7</sup>. On retrouve deux segments distincts du génome : un fragment long U<sub>L</sub> (82% du génome) et un fragment court U<sub>S</sub>. Chaque segment est muni à ses extrémités de séquences répétées : Terminal Repeat Long (TRL), de Internal Repeat Long (IRL), de Internal Repeat Short (IRS) et de Terminal Repeat Short (TRS).

Tout ceci est contenu dans une capsule icosaédrique de 125 nm de diamètre. Cette capsid est formée de 162 capsomères et composée de plusieurs protéines : la protéine majeure de la capsid (MCP, produit du gène UL86 extrêmement conservé chez les Herpesviridae), la protéine d'ancrage de l'ADN à la capsid appelée protéine mineure de la capsid (TRI1, produit du gène UL46), des triplexes avec comme sous-unités la protéine mineure de fixation de la capsid (TRI2, produit du gène UL86) dimérisée avec la plus petite protéine de la capsid (SCP, produit du gène UL48.5) et enfin une protéine porte (PORT, produit du gène UL104) nécessaire à l'encapsidation de l'ADN viral<sup>8</sup>.

Ces composés sont incorporés à l'intérieur d'une matrice appelée tégument comportant au moins 27 glycoprotéines pour la plupart phosphorylantes<sup>9</sup> jouant un rôle important dans la régulation des gènes viraux et du métabolisme cellulaire. Parmi elles on trouve la protéine kinase UL97 responsable de la première phosphorylation du GCV et donc de son activation. Ce tégument peut être entouré par du réticulum endoplasmique ou par le compartiment intermédiaire de l'appareil de Golgi de la cellule hôte.

Le CMV peut coder environ 60 glycoprotéines différentes dont les plus connues sont gB, gH, gM/N, gL et gp48<sup>9</sup>. Il peut également posséder des protéines d'enveloppe surnuméraires du fait de la grande variété de produits de gènes viraux. La structure du CMV peut être différenciée des autres herpesvirus par de légères divergences structurales, par exemple le polymorphisme de l'enveloppe

est beaucoup plus important que chez les autres membres de sa famille. A l'instar des herpesvirus, le CMV est dégradé sous l'effet d'un pH bas, des solvants lipidiques, de la chaleur et possède une demi-vie de l'ordre de 60 minutes à 37°C<sup>10</sup>.

### **III. Réplication**

Le CMV ne se réplique que dans les cellules humaines. L'entrée de la particule virale se fait par liaison aux récepteurs de la cellule essentiellement via les récepteurs glycoprotéines gB, gH-gL et éventuellement gO et gM-gN, puis par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire afin de libérer la nucléocapside dans le cytoplasme. Enfin il y a association de cette dernière avec le cytosquelette via des protéines virales à l'instar de UL47 et UL48 et translocation vers le noyau<sup>11</sup>. La nucléocapside interagit avec les pores nucléaires et libère l'ADN viral dans le noyau. Un mécanisme similaire est retrouvé chez tous les herpesvirus.

On distingue ensuite 3 phases d'évènements différentes :

- Une phase dite très précoce pendant laquelle des gènes appelés Immediate Early (IE) sont transcrits. Leurs protéines ont des effets importants comme celui d'activer l'expression génique de la réplication virale, d'induire l'arrêt du cycle et la mort cellulaire<sup>12</sup>, de supprimer les messages des transducteurs du signal et des activateurs de la transcription (STAT) de la cellule<sup>13</sup>... Cet ensemble de mécanismes permet de détourner l'énergie et les moyens de la cellule au profit de la réplication virale et le passage en phase suivante.
- Une phase dite précoce débutant environ 6 heures après l'infection jusqu'à environ 18-24h. Au cours de celle-ci la plupart du génome viral est disponible pour la transcription. Elle implique au minimum 23 gènes dits Early-Delayed (DE genes) jouant un rôle crucial pendant la réplication notamment pour la synthèse de l'ADN<sup>14</sup>. La synthèse d'ADN viral débute dès 14h alors que toute réplication cellulaire a

définitivement cessé. L'ADN viral adopte alors dans un premier temps une forme circulaire.

- Une phase tardive, moins explorée, pendant laquelle les gènes Late (L) sont exprimés. Ceux-ci codent essentiellement pour des protéines structurales : glycoprotéines d'enveloppe et protéines structurales de la capsid. Une fois l'ADN synthétisé il est pris en charge par des protéines d'encapsidation ou terminases favorisant la production de la nucléocapside<sup>15</sup>. Des protéines du tégument en association avec des protéines non structurales permettent la libération du complexe dans le cytoplasme autour de la 48<sup>ème</sup> heure.

Après enveloppage temporaire par de la membrane nucléaire cellulaire, des kinases virales vont permettre l'agrégation de complexes protéiques formant le tégument. L'enveloppe lipidique virale la plus externe provient alors du système de synthèse protéique de la cellule (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi).

Lors de la réplication virale en plus des virions, la cellule peut émettre des particules non infectieuses appelées corps denses en quantité proche des particules infectieuses<sup>16</sup> (Figure 1). Ces corps denses ne contiennent ni capsid ni ADN mais sont composés d'une importante quantité d'une protéine virale pp65<sup>17</sup>. Moins nombreuses mais également présentes, il existe des particules virales non infectieuses ne présentant pas de corps denses.

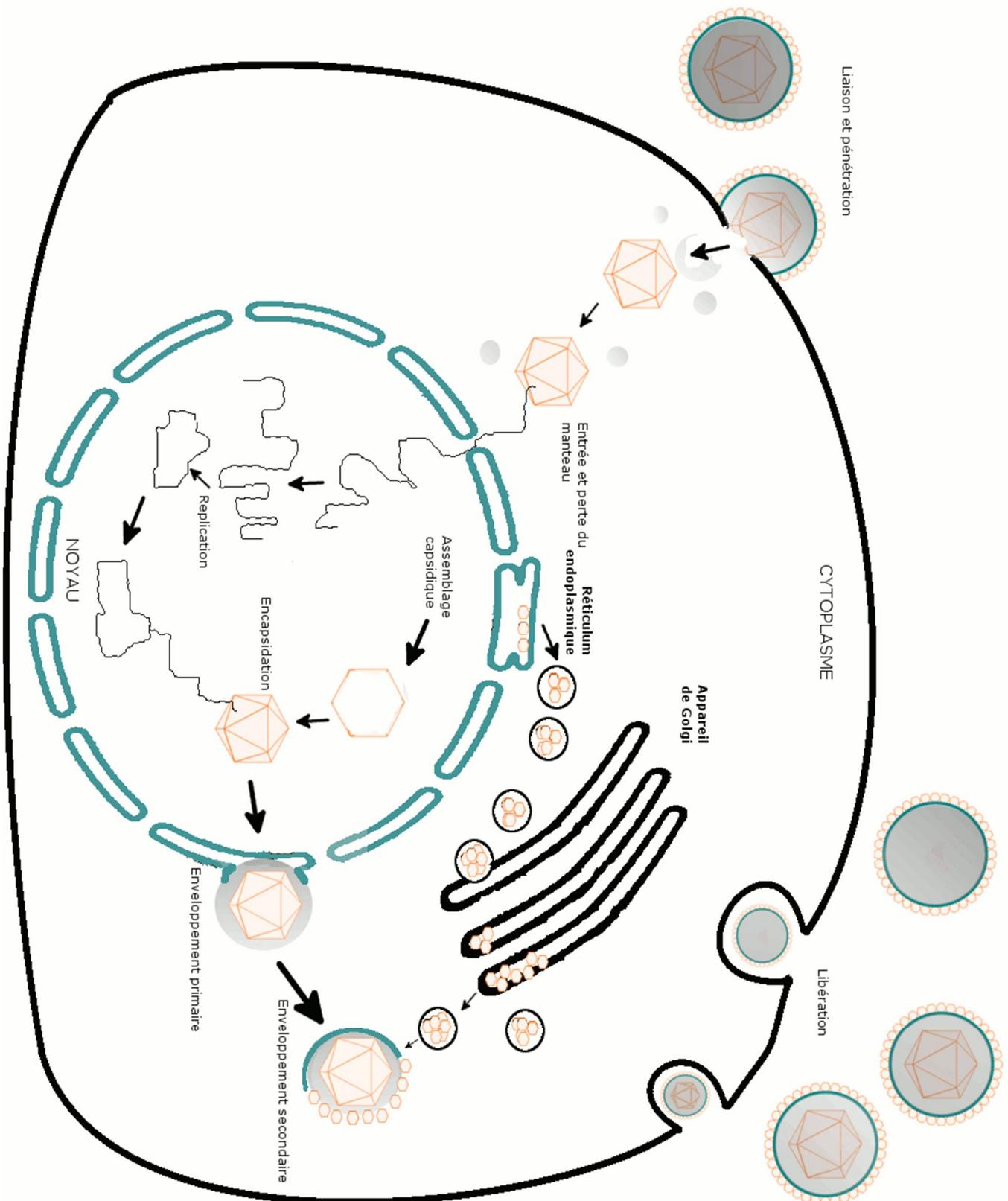


Figure 1 : Cycle répliatif du cytomégalovirus

## **IV. Épidémiologie**

Les humains sont les seuls réservoirs du CMV, la transmission de ce virus se fait, du fait de sa fragilité, par contact direct ou indirect interindividuel. Les principales sources du virus sont les sécrétions oropharyngées, les urines, les sécrétions génitales, le lait maternel, les larmes, les fèces et le sang. La diffusion est facilitée par l'excrétion prolongée des particules infectieuses après l'infection primaire. L'excrétion persiste d'ailleurs d'autant plus après contamination congénitale, périnatale ou post-natale<sup>18</sup> ce qui fait des nourrissons un des plus grands réservoirs de virus contaminant. L'infection est endémique et ancienne dans la population mondiale : Le CMV humain a été ainsi mis en évidence chez les indiens Tiriyo dans des régions reculées du Brésil, où sont absentes d'autres pathologies virales comme la grippe ou la rougeole<sup>19</sup>, et ne suit pas les saisons. On sait également que des indices socioéconomiques faibles prédisposent à un taux d'infection plus important : ainsi la prévalence de l'infection varie de 50% en France à plus de 90% dans les pays en voie de développement, elle est plus importante chez la femme que chez l'homme<sup>20</sup>, l'âge du premier contact dépend également du lieu de vie et des conditions socioéconomiques des parents.

## **V. Physiopathologie**

### 1. Introduction

Au cours de l'infection le CMV exerce une action délétère sur l'expression génique de la cellule ainsi que sur son cycle de développement. Ainsi on distingue différentes étapes au cours de l'infection : tout d'abord la cellule nouvellement infectée commence à sécréter des interférons et perd sa capacité à entrer en apoptose. Puis la cellule sécrète des protéines virales et perd sa structure cytosquelettique subissant un ballonnement observable en microscopie optique (yeux de hiboux), à titre d'exemple, les fibroblastes adoptent une conformation typique en banc de poissons. Suite à la multiplication du virus la cellule hôte finit par mourir par éclatement. L'immunité non spécifique est alors activée via la

synthèse des interférons et met en jeu les lymphocytes Natural Killer (NK) et les macrophages. Dès la 4<sup>ème</sup> semaine la réponse humorale commence à prendre le relai avec la production d'immunoglobulines M (IgM). Le rôle prépondérant des lymphocytes T CD4+ et CD8+ permet d'entrevoir l'importance de cette pathologie chez les patients immunodéprimés et plus spécifiquement les sidéens<sup>21</sup>.

Le CMV a la faculté de rester latent dans l'organisme, mais si sa répartition et sa possibilité d'infecter tous les tissus est effective en revanche sa présence à l'état latent n'a été retrouvée que chez les monocytes et dans les progéniteurs CD34+ de la moelle osseuse<sup>22</sup>. La réactivation virale étant périodique chez l'immunocompétent, elle rend le virus temporairement transmissible via ses sources habituelles.

Le CMV est le seul herpesvirus dont le passage transplacentaire et l'infection a lieu moins fréquemment lors des réactivations que lors de la primo-infection<sup>23</sup>. L'immunité au CMV ne permet pas d'éviter la réinfection mais semble limiter des accès aigus chez les immunocompétents et même chez les immunodéprimés<sup>24</sup>.

## 2. Infection chez l'immunocompétent

Dans la majorité des cas l'infection par le CMV est silencieuse du point de vue clinique. On peut toutefois retrouver des symptômes similaires à ceux de la mononucléose avec un pic fébrile. Des études de cohorte ayant pour but de détecter la primo-infection par CMV chez la femme ont montré que près de 90% des infections sont silencieuses<sup>25</sup>. Plus rarement des manifestations graves telles que des méningites, des encéphalites, des anémies hémolytiques, des thrombopénies, des thromboses, des uvéites et des pneumonies peuvent survenir.

## 3. Infection congénitale

Elle est responsable de malformations et de retard mental chez le nouveau-né. L'infection du placenta a lieu lors d'un pic de virémie chez la mère, le fœtus est alors contaminé 2 à 12 semaines après ce pic soit par contact hématogène soit par ingestion de cellules infectées. Le symptôme le plus redouté est la maladie des inclusions cytomégaliques où l'on retrouve une infection pluriviscérale

notamment au niveau d'organes vitaux, une microcéphalie, une hépatosplénomégalie, des ictères, une thrombopénie, des convulsions... Le décès survient dans 1 cas sur 5 et les survivants ont à 80% des troubles neurosensoriels conséquents avec parfois une apparition retardée.

#### 4. Patient transplanté et immunodéprimé

Le CMV est l'un des agents opportunistes les plus répandus et complexifie grandement la prise en charge du patient transplanté. Il se manifeste par réactivation du virus latent, par réinfection (le plus souvent le virus profite de l'immunodépression pour se réactiver) ou par infection primaire (risque fonction du statut du donneur. La sévérité de l'infection dépend du niveau de l'immunodépression. On peut alors retrouver fièvre et neutropénie mais également des atteintes graves d'organes se traduisant par des hépatites, pneumonies, gastrites et colites, atteintes du système nerveux central (SNC), des néphrites, des rétinites pouvant aller jusqu'à la cécité mais aussi des risques de perte du greffon. Les manifestations cliniques dépendent également de la nature du greffon, si lors d'une transplantation rénale l'incidence de l'infection à CMV est proche du quart des patients elle est doublée lors de double transplantation (*i.e.* rein pancréas)<sup>26</sup>, l'allogreffe de moelle est considérée comme la transplantation la plus à risque avec près de 60% chez le R+. Le risque est le plus important pour les receveurs négatifs d'un organe séropositif (R-/D+). Il est multiplié par 20 par rapport au couple donneur/receveur séronégatif (R-/D-)<sup>27</sup>.

## VI. Diagnostic

### 1. Direct

La découverte du virus dans le sang en quantité élevée est caractéristique d'une infection active à CMV et prédictive d'une maladie à CMV.

On peut isoler le virus par culture classique sur des fibroblastes humains. Les prélèvements peuvent être issus de divers milieux tels que le sang, les urines, une biopsie, le liquide de lavage broncho-alvéolaire, le liquide céphalorachidien (LCR). Ces milieux sont entreposés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les cellules à inoculer sont le plus souvent dans des flasques de culture de  $25\text{cm}^2$  contenant une couche confluente de MRC5 ou de HEp2. Pour les cellules MRC5 la durée d'incubation est d'environ 1 mois avec 3 passages versène-trypsine avec un milieu MEM + antibiotiques (AB) + 10% de sérum de veau fœtal (SVF). L'inoculation est faite par contact, après extraction du virus spécifique de son milieu d'origine, pendant 24 heures. Le titrage se fait sur des dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-4}$  pour un volume minimal de  $500\mu\text{L}$  avec un anticorps monoclonal E-13 en immuno-peroxydase (IP). On peut également compter le nombre de foyers infectieux par microscopie optique.

L'infection des cultures peut être également mise en évidence de façon accélérée, 24 à 48 heures après l'inoculation, bien avant l'apparition de l'ECP, par examen immuno-cytologique sur la culture cellulaire elle-même en immunofluorescence (IF) ou en IP. On utilise pour cela un anticorps monoclonal spécifique des antigènes très précoces, précoces, et retardés. Par exemple on peut utiliser le kit Anti-Human Cytomegalovirus Immediate Early Antigen (I.E.A) de la société Argene<sup>®</sup> (Verniolles, France).

On peut également détecter et quantifier l'antigénémie directement dans le sang par IF dans les noyaux des PNN. Cette méthode est plus rapide que les précédentes et prédictive d'une infection sévère.

L'introduction de la PCR a permis la recherche de séquences spécifiques du virus. Cette technique rapide, très sensible et quantitative, est très utile au diagnostic d'une infection active quand elle porte sur des compartiments clos comme le LCR pour le diagnostic d'encéphalite, l'humeur aqueuse pour le diagnostic de chorioretinite, le liquide amniotique pour le diagnostic d'infection congénitale à CMV. La PCR sur le sang, pour recherche et quantification d'ADN viral, tend à remplacer actuellement la recherche de l'antigénémie.

## 2. Indirect

La recherche d'IgG spécifiques par technique ELISA n'est utile que pour classer donneurs et receveurs d'organe ou de sang en séropositifs ou séronégatifs, et pour dépister les femmes séronégatives avant la grossesse. C'est la mesure de l'avidité des IgG spécifiques qui permet d'éliminer éventuellement une infection récente lorsque élevée.

La technique ELISA permet également de détecter les IgM qui seraient un argument en faveur d'une infection active. Cependant l'imprécision liée à cette méthode empêche sa pratique courante.

# DEUXIEME PARTIE: TRAITEMENT & PROPHYLAXIE DES INFECTIONS A CMV

Les 5 principaux antiviraux utilisés pour le traitement du CMV sont le GCV, le VGCV, l'aciclovir le foscarnet et le cidofovir. Du fait de la guérison souvent spontanée, ces traitements sont rarement mis en place en dehors de situation d'immunodépression particulière. De plus chacun de ces agents possède une toxicité importante.

## I. Ganciclovir & Valganciclovir

D'après les recommandations du relevé des caractéristiques produit 2012.

### 1. Structures

Le GCV est aussi appelé DHPG pour 2-amino-9-[[3-hydroxy-2-(hydroxyméthyl)propoxy]méthyl]-3,9-dihydro-6H-purin-6-one. Sa structure ainsi que celle du VGCV sont données dans les figures 2 et 3, à titre de comparaison la formule de la désoxyguanosine est également donnée (figure 4).

### 2. Formes thérapeutiques

Les spécialités en France du GCV et du VGCV sont le Cymevan<sup>®</sup> et le Rovalcyte<sup>®</sup>, elles sont commercialisées par les laboratoires Roche<sup>®</sup>. Le GCV se présente sous la forme d'un lyophilisat pour usage parentéral à 500mg (soit 546mg sous forme de sel sodique) réservé aux hôpitaux et collectivités (liste I) et le VGCV sous forme de comprimé pelliculé rose ovale et convexe à 450mg soit 496,3 mg sous forme chlorhydrate disponible en ville (liste I) avec une biodisponibilité d'environ 60%, ce qui garantit une observance meilleure que pour les autres traitements.

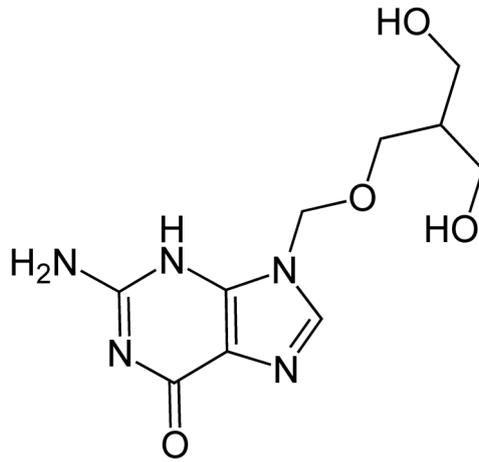


Figure 2 : Formule développée du ganciclovir

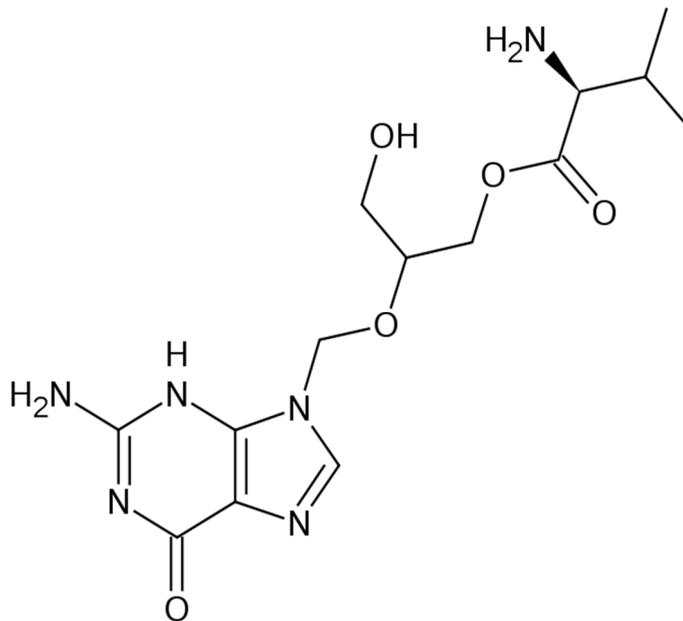


Figure 3 : Formule développée du valganciclovir

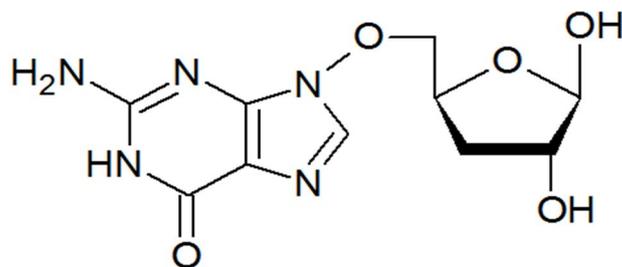


Figure 4 : Formule développée de la désoxyguanosine

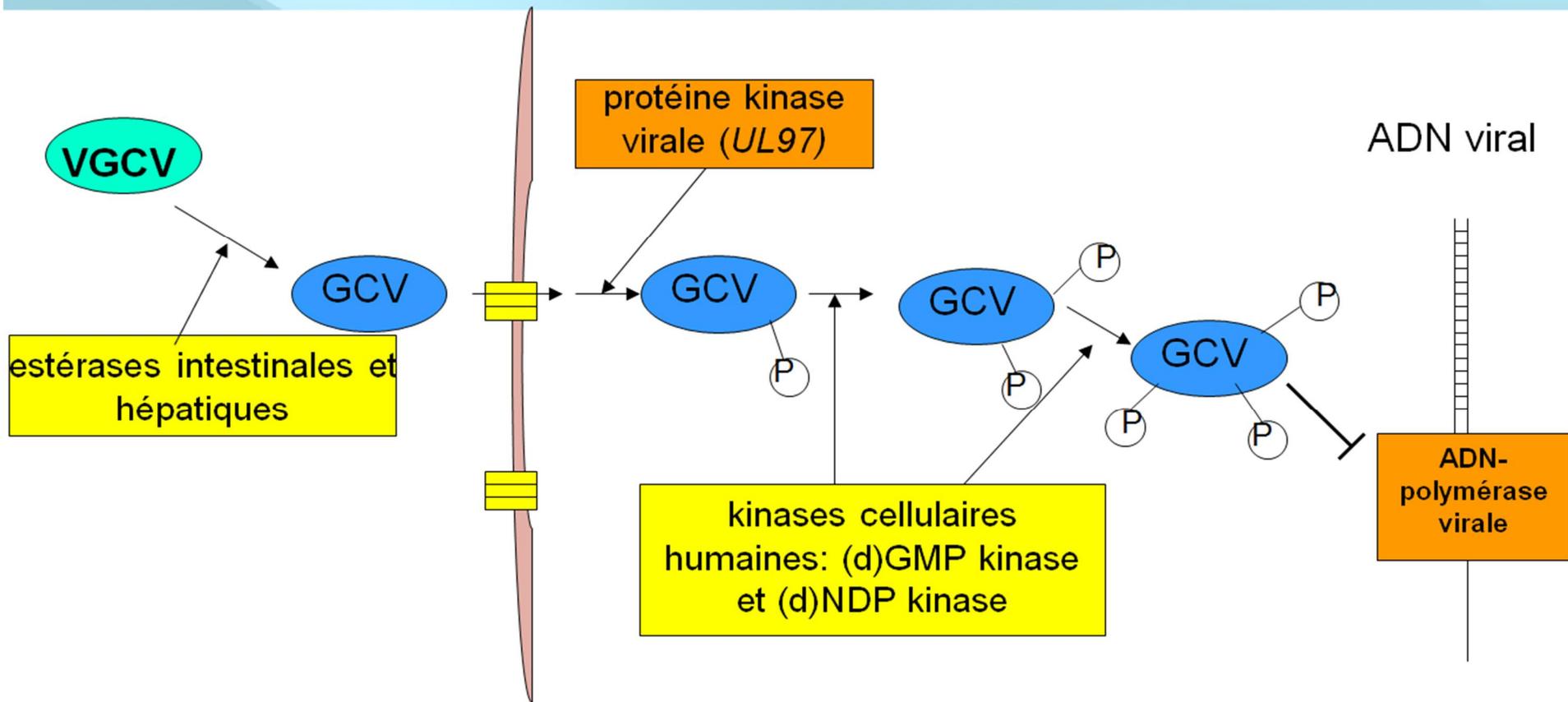
### 3. Pharmacodynamie

Dès l'administration le VGCV est rapidement métabolisé en GCV par les estérases intestinales et hépatiques<sup>28</sup>. Ce sont des analogues de synthèse de la 2'-désoxyguanosine (figure 4). Le GCV est aussi une prodrogue, dans le sens où, elle nécessite d'être triphosphorylée en ganciclovir triphosphate (GCV-TP) pour exercer son action antivirale contre les Herpesviridae. La première phosphorylation est effectuée par une kinase virale pUL97 puis par les kinases cellulaires non spécifiques<sup>29</sup>. Ce métabolisme a été mis en évidence dans des cellules infectées par le CMV, avec des demi-vies de 6 à 24h, après élimination du GCV extracellulaire (figure 5).

Le fait d'être phosphorylé par une enzyme virale permet au GCV de ne cibler que les cellules infectées. Le GCV-TP sera reconnu ensuite, à tort, par la polymérase virale pUL54 comme une base azotée et sera intégré à l'ADN viral<sup>30</sup>. Il agit préférentiellement sur l'ADN-polymérase virale UL54 par rapport à celle de l'hôte par inhibition compétitive<sup>3</sup>. L'intégration de GCV-TP bloque alors sa synthèse provoquant l'arrêt de l'élongation de l'ADN viral, ces molécules sont pour cela appelées « terminateurs de chaîne ».

Ces molécules sont utilisées en première intention autant en prophylaxie qu'en curatif en transplantation.

# Devenir cellulaire du GCV



D'après Clercq E.D., Antivirals and antiviral strategies (Nat Rev Microbiol. 2004)

Figure 5 : Pharmacodynamie du valganciclovir

#### 4. Pharmacocinétique

La liaison du GCV sur les protéines plasmatiques est d'environ 2% aux concentrations thérapeutiques. Le volume de distribution du GCV à l'état d'équilibre est de 0,680L/kg +/- 0,161 (n=114). Chez un sujet à fonction rénale normale CMV+ les paramètres pharmacocinétiques sont les suivants :

- Le GCV à 5mg/kg i.v. donne une aire sous la courbe (ASC) 0-12h de 28,6 +/- 9  $\mu\text{g} \times \text{h/mL}$  et une Cmax de 10,4 +/- 4,9  $\mu\text{g/mL}$ .
- Le VGCV à 900mg p.o. donne des ASC 0-12h de 32,8 +/- 10,1  $\mu\text{g} \times \text{h/mL}$  pour le GCV et de 0,37 +/- 0,22  $\mu\text{g} \times \text{h/mL}$  pour le VGCV et des Cmax de 6,7 +/- 2,1  $\mu\text{g/mL}$  pour le GCV et de 0,18  $\mu\text{g/mL}$  pour le VGCV.

L'activité antivirale mesurée in vitro donne une CI50 comprise entre 0,08 $\mu\text{M}$  et 14 $\mu\text{M}$ .

Le GCV n'est pas métabolisé, il est éliminé par voie rénale, par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire active. La clairance rénale représente ainsi 81,5% +/- 22 (n=70) de la clairance systémique du GCV. La demi-vie du GCV est de 4,1h +/- 0,9 chez les patients CMV +. Les posologies sont à adapter en fonction de l'état rénal du patient ainsi elles sont regroupées dans le tableau 1 suivant :

Tableau 1 : Posologie conseillée des traitements par antiviraux selon l'état rénal

Clairance de la créatinine (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	Dose de GCV (mg/kg)	Intervalle d'administration (heures)	Posologie du VGCV (traitement d'attaque)	Posologie du VGCV (traitement d'entretien ou prophylaxie)
> 50	5	12	900 mg x 2 /j	900 mg /j
40-59	2,5	12	450 mg x 2/j	450 mg /j
25-39	Id.	Id.	450 mg x 1/j	450 mg /2j
10-24	2,5	24	450 mg /2j	450 mg x2 /semaine
<10	1,25	24	Non recommandé	Non recommandé

## 5. Contre-Indications

Leur utilisation est évidemment contre indiquée chez les patients présentant une hypersensibilité au GCV ou VGCV. Des risques d'hypersensibilité croisée avec l'aciclovir peuvent être observés. Du fait de l'absence d'étude spécifique, ces médicaments sont contre-indiqués chez la femme enceinte ou allaitante.

## 6. Effets indésirables

Les effets indésirables les plus fréquents (survenant chez plus d'un patient sur 10) sont : la neutropénie, l'anémie, la dyspnée, la diarrhée, ce qui impose une surveillance importante surtout en début de traitement.

Les effets indésirables fréquents (1/100-1/10 des patients) sont parmi les plus spécifiques: la survenue de candidose buccale, de sepsis, de thrombopénie, leucopénie, anorexie, dépression, confusion, dysgueusie, hypo ou paresthésies, œdème maculaire, décollement de la rétine, douleur auriculaire, dermite, sueurs nocturnes, prurit, myalgies, convulsions, diminution de la clairance de la créatinine, altération de la fonction rénale et d'autres moins spécifiques : céphalée, insomnie, anxiété, toux, nausées, vomissements, douleurs abdominales, dyspepsie, constipation, troubles de la fonction hépatique et augmentation des ASAT, arthralgies, crampes fatigue fièvre, raideurs, douleurs, asthénie, perte de poids.

Un surdosage peut entraîner une myélosuppression sévère jusqu'à l'aplasie médullaire (après plusieurs jours à une dose au moins 10x supérieure à celle recommandée) ainsi qu'une toxicité rénale accrue. On peut limiter cette toxicité par la mise en place rapide d'hémodialyse et d'hydratation.

## 7. Interactions médicamenteuses

Il existe également quelques interactions médicamenteuses connues, avec certains antirétroviraux : avec la zidovudine on observe une

augmentation de l'ASC de celle-ci et une capacité commune à augmenter le risque d'anémie et neutropénie et avec la didanosine une augmentation de ses concentrations plasmatiques et de sa toxicité.

Avec le mycophénolate mofétil (MMF) la compétition au niveau de la sécrétion tubulaire rénale peut conduire à une augmentation des formes glucuroconjuguées de l'acide mycophénolique, sans impact sur la pharmacocinétique de l'acide mycophénolique. Les pouvoirs communs neutropéniant et leucopéniant des deux molécules est en revanche à prendre en compte (interaction pharmacodynamique).

Avec le triméthoprimé aucune interaction pharmacocinétique significative n'a été observée, une augmentation potentielle de la toxicité notamment au niveau des lignées sanguines doit cependant être attendue

## **II. Autres antiviraux**

Ils sont surtout utilisés en second choix.

### **1. L'aciclovir (spécialité Zovirax®)**

C'est un inhibiteur sélectif de l'ADN polymérase virale après activation par une kinase virale actif sur les Herpesviridae. Il est inscrit sur liste I. Il peut être administré *p.o.* sous forme de suspension buvable ou de comprimé. Il est alors donné en première intention pour les infections à Herpès simplex ou pour les complications du zona. Il peut également être administré par perfusion *i.v.* pour des complications telles que les méningo-encéphalites herpétiques, l'herpès néo-natal ou encore des infections sévères chez les immunodéprimés. Pour le CMV il est surtout utilisé en prophylaxie chez les patients immunodéprimés. Son élimination est urinaire (85%) essentiellement sous forme inchangée. Ses effets indésirables sont des céphalées, nausées et vomissements, diarrhées, cristallurie, réactions au point d'injection. Ce traitement nécessite donc

une bonne hydratation du patient et un suivi de sa fonction rénale et hématopoïétique.

## 2. Le foscarnet (spécialité Foscavir®)

C'est un antiviral virustatique par inhibition de l'ADN polymérase virale et de la transcriptase inverse sur les Herpesviridae par analogie avec le pyrophosphate. Il est inscrit sur liste I et son utilisation est réservée aux hôpitaux et collectivités. Son administration se fait par perfusion i.v. en deux étapes : un traitement d'attaque pendant 2 à 3 semaines et un traitement d'entretien avec une posologie adaptée à la fonction rénale. Son élimination est rénale : il est excrété tel quel par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire. Ses effets indésirables sont la toxicité rénale (30%), des troubles électrolytiques avec hypocalcémie, hypokaliémie, hypomagnésémie, hyper- ou hypo-phosphorémie.

## 3. Le cidofovir (spécialité Vistide®)

C'est un antiviral essentiellement utilisé dans les rétinites à CMV. Il est contre-indiqué chez les insuffisants rénaux. Il est inscrit sur liste I et son utilisation est réservée aux hôpitaux et collectivités. Il s'administre par perfusion i.v. une fois par semaine puis toutes les 2 semaines ce qui le rend plus facile à administrer que le GCV ou le foscarnet avec une période d'induction (2 semaines) puis une période d'entretien. Il est éliminé par voie urinaire sous forme inchangée. Ses effets indésirables sont une néphrotoxicité dose-dépendante, parfois irréversible pouvant imposer l'arrêt du traitement, une toxicité oculaire, une neutropénie (20%), asthénie, fièvre... Il est nécessaire d'assurer une bonne hydratation du patient avec un suivi régulier du bilan biologique.

### III. **Prophylaxie**

Elle s'adresse surtout aux patients à risque immunodéprimés du fait de la gravité de l'infection au CMV notamment chez les patients transplantés où une réactivation ou une primo-infection peut entraîner rejet et perte du greffon ainsi que des atteintes pluri viscérales. Il s'agit d'instaurer un traitement à faibles concentrations (Tableau 1) afin d'éviter d'une part la réplication virale et d'autre part de réduire la survenue d'effets indésirables. On utilisera de préférence et en première intention le VGCV. Il faut noter que cet effet protecteur est temporaire et réversible dès l'arrêt du traitement et que dès lors peut survenir la réactivation virale.

Une autre stratégie de prophylaxie a pu être mise en place dans certains centres il s'agit d'un mode d'administration dit « préemptif ». A l'inverse du traitement prophylactique au sens strict, celui-ci est mis en place chez les patients CMV+ mais n'ayant pas encore manifesté de signes cliniques.

### IV. **Résistances aux antiviraux**

L'étude des supports génétiques des résistances du cytomégalovirus aux antiviraux est l'une des nombreuses missions du Centre National de Référence (CNR) du CMV.



Pour la partie nord de la France le centre est situé au laboratoire de Virologie, Hôpital Lariboisière 2, rue Ambroise Paré 75010 PARIS, le responsable est le Dr Marie Christine MAZERON. Pour la partie sud le centre est situé au laboratoire de Virologie à l'hôpital Dupuytren, 2, av. Martin Luther King 87042 LIMOGES Cedex. Le responsable est le Pr Sophie ALAIN.

L'administration chronique des antiviraux chez les patients immunodéprimés favorise l'apparition de mutations génétiques du CMV notamment pour la kinase UL97 et l'ADN polymérase UL54<sup>31</sup>. Ces mutations ont montré une augmentation de la résistance aux traitements à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les virus possédant une mutation au niveau de UL97 seront résistants au GCV et VGCV alors que ceux possédant des mutations au niveau de UL54 également posséderont des résistances aux autres antiviraux ciblant la polymérase virale.

Cette émergence de résistances et la toxicité de ces molécules dose et patient dépendantes justifie la nécessité de mieux comprendre leur fonctionnement et leurs mécanismes de toxicité afin d'adapter au mieux le traitement antiviral à chaque patient.

# **TROISIEME PARTIE : NOTIONS DE PHARMACOGENETIQUE ET GENES CIBLES CONCERNANT LE GANCICLOVIR**

## **I. Introduction**

La réaction vis-à-vis d'un médicament diffère au sein même de l'individu selon l'heure de la prise, la voie d'administration... Lors d'essais cliniques on essaie de standardiser toutes ces facteurs de variabilité cependant des différences de réponse entre les individus demeurent, c'est ce que l'on appelle la variabilité interindividuelle. Certains facteurs sont bien connus ainsi l'âge, l'état de fonction des organes, la présence de pathologies ou traitements parallèles... entraînent des cinétiques différentes et permettent en partie d'expliquer une grande partie de cette variabilité. Cependant certains individus peuvent manifester des signes de toxicité ou d'inefficacité du traitement aux conséquences parfois importantes pouvant aller jusqu'au décès du patient. Il semble clair, à présent, qu'une explication de ces phénomènes se trouverait dans le génome. La recherche des variations génétiques influençant la réponse au médicament définit ce nouveau domaine de recherche qu'est la pharmacogénétique (PG).

Le bénéfice de la PG en routine clinique est maintenant clair. Cette discipline a déjà fait ses preuves pour de nombreuses molécules thérapeutiques. L'une des applications les plus pratiquées en routine est le génotypage de la thiopurine méthyltransférase (TPMT). Cette enzyme transfère un radical méthyl sur la 6-mercaptopurine (métabolite de l'azathioprine), ses métabolites et sur la 6-thioguanine<sup>32</sup>. La présence de certains polymorphismes de ce gène justifie une modification de la posologie de 6-mercaptopurine (Purinethol®) chez les enfants souffrant d'une leucémie aigüe lymphoblastique <sup>33</sup> ainsi que de celle de

l'azathioprine (Imurel®) chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). A noter que cependant la stratégie de prise en charge de ces deux maladies diffère du fait, principalement, des variations de la balance bénéfice-risque.

Les patients souffrant d'un déficit d'activité en TPMT d'origine génétique montrent une hématotoxicité sévère lors de l'exposition à ces substances alors que ceux possédant une hyperactivité de cette enzyme auront besoin de dosages plus élevés. Les polymorphismes entraînant un déficit sévère, comme souvent en pharmacogénétique, sont rares. Environ 10% de la population caucasienne est hétérozygote pour un variant déficitaire<sup>34</sup> et seul un patient sur 300 est porteur homozygote. Cependant, l'importance de la réponse toxique, pouvant aller jusqu'à l'aplasie médullaire, rend ce génotypage fortement recommandé avant la mise en place du traitement. Son bénéfice médico-économique est par ailleurs démontré<sup>35</sup>(dans le contexte des MICI).

## **II. Méthodes d'analyse du génome**

### 1. Introduction

L'augmentation exponentielle de la vitesse du séquençage et la réduction des coûts font que, bientôt, les techniques d'analyse partielle du génome seront remplacées par des techniques de séquençage très étendue, dites de nouvelle génération. La liste des techniques présentées ci-dessous n'est pas exhaustive mais regroupe les principales utilisées en recherche et en clinique dans le cadre de la pharmacogénétique. Elle est principalement issue des protocoles utilisés au laboratoire.

## 2. Le géotypage par PCR en temps réel Taqman®

Le principe général de la PCR dites « en temps réel » est de coupler l'étape d'amplification de l'ADN par PCR à l'analyse du produit de l'amplification. Ainsi aucune manipulation des produits de PCR n'est nécessaire. Ceci a l'avantage de réduire le temps d'analyse et le risque de contamination.

La technologie TaqMan a deux applications principales :

- la quantification de l'expression des ARN messagers (après retrotranscription en ADN complémentaire) qui ne sera pas détaillée ici.
- Le géotypage (ou discrimination allélique).

Elle permet l'amplification d'une région d'ADN génomique courte (<300 pb) comprenant le polymorphisme à rechercher à l'aide d'amorces de 10 à 20 bases. Le polymorphisme est alors détecté simultanément à l'aide de deux sondes (séquence nucléotidiques de 10 à 20 bases) l'une complémentaire de la séquence de référence (dite « sauvage »), l'autre de la séquence variante (dite « mutée »), marquées par des fluorochromes spécifiques).

Les sondes Taqman sont conçues pour avoir la complémentarité optimale avec les séquences cibles (sauvage et mutée). L'enzyme opérant l'amplification PCR (Taq polymérase) a une activité exonucléasique 5'-3' qui lui permet de dégrader la ou les sondes nouvellement hybridées sur l'ADN. La fluorescence qui s'en dégage permet alors de suivre l'amplification du produit au cours des cycles de PCR et en fin de PCR de différencier les ADN homozygote sauvage, hétérozygote et homozygote mutés. La technologie Taqman® est appelée ainsi en raison du mode de fonctionnement de la Taq polymérase rappelant le jeu PacMan® Figure (6).

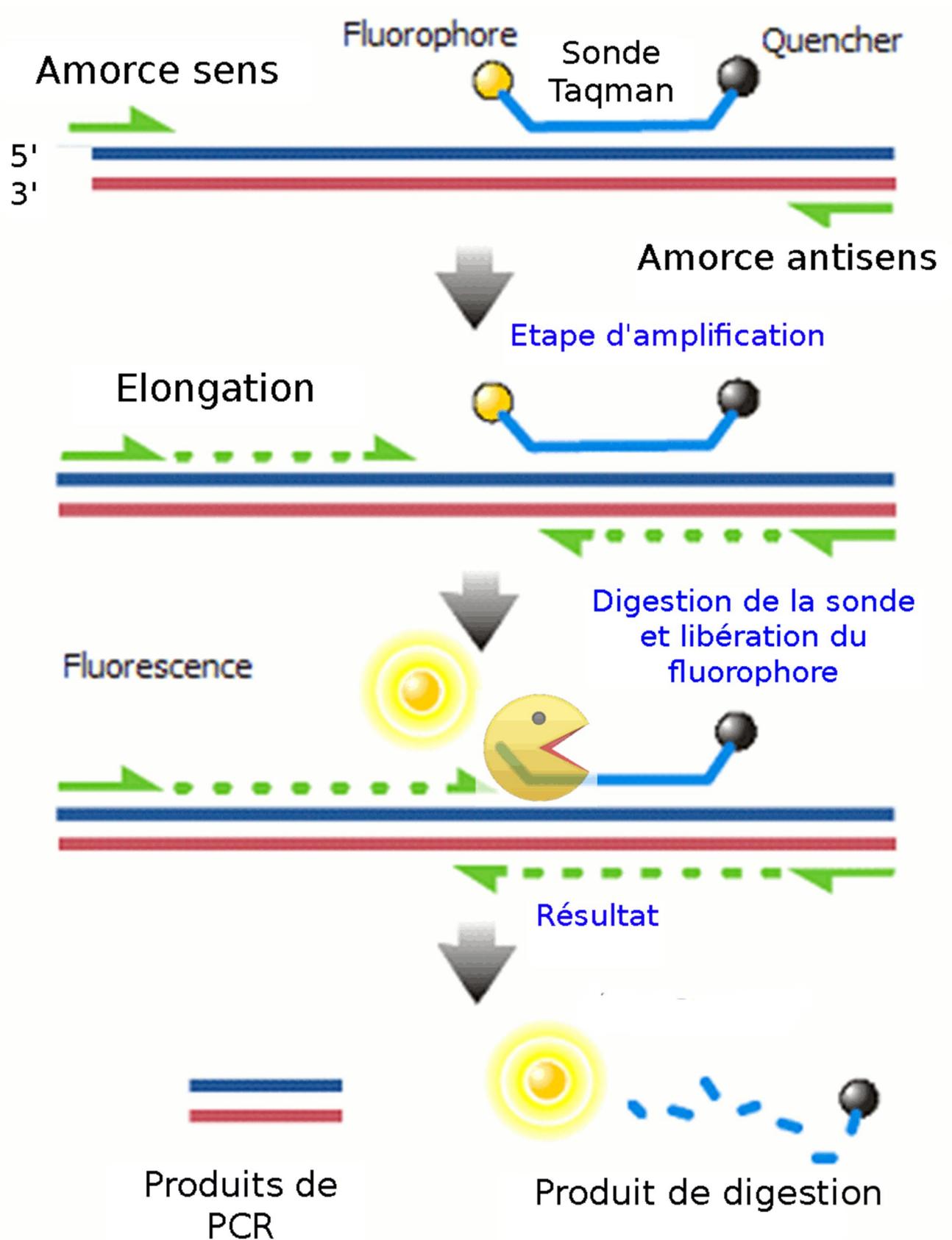


Figure 6 : Principe de la technologie TaqMan®

La sonde Taqman® possède un fluorophore (ou reporter) à l'extrémité 5' dont l'activité est réprimée par la présence d'un quencher à l'extrémité 3'. Il existe différents fluorophores comme la 6-carboxyfluoréscéine (FAM) ou la tétrachlorofluoréscéine (TET) ou VIC (acronyme de composition secrète) et quenchers comme la tétraméthylrhodamine (TAMRA). La fluorescence est réprimée par le quencher par un mécanisme de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (ou transfert d'énergie par résonance de type Förster = FRET), simplement on considère que le spectre d'émission du donneur (fluorophore) est absorbé par celui de l'accepteur (quencher).

En pratique on choisit un fluorophore émettant dans des longueurs distinctes par allèle, par exemple un fluorophore FAM pour l'allèle sauvage et un fluorophore VIC pour l'allèle variant.

Les données sont ensuite analysées par un thermocycleur PCR en temps réel muni de détecteurs optiques permettant de mesurer l'intensité lumineuse à chaque cycle Figure (7).

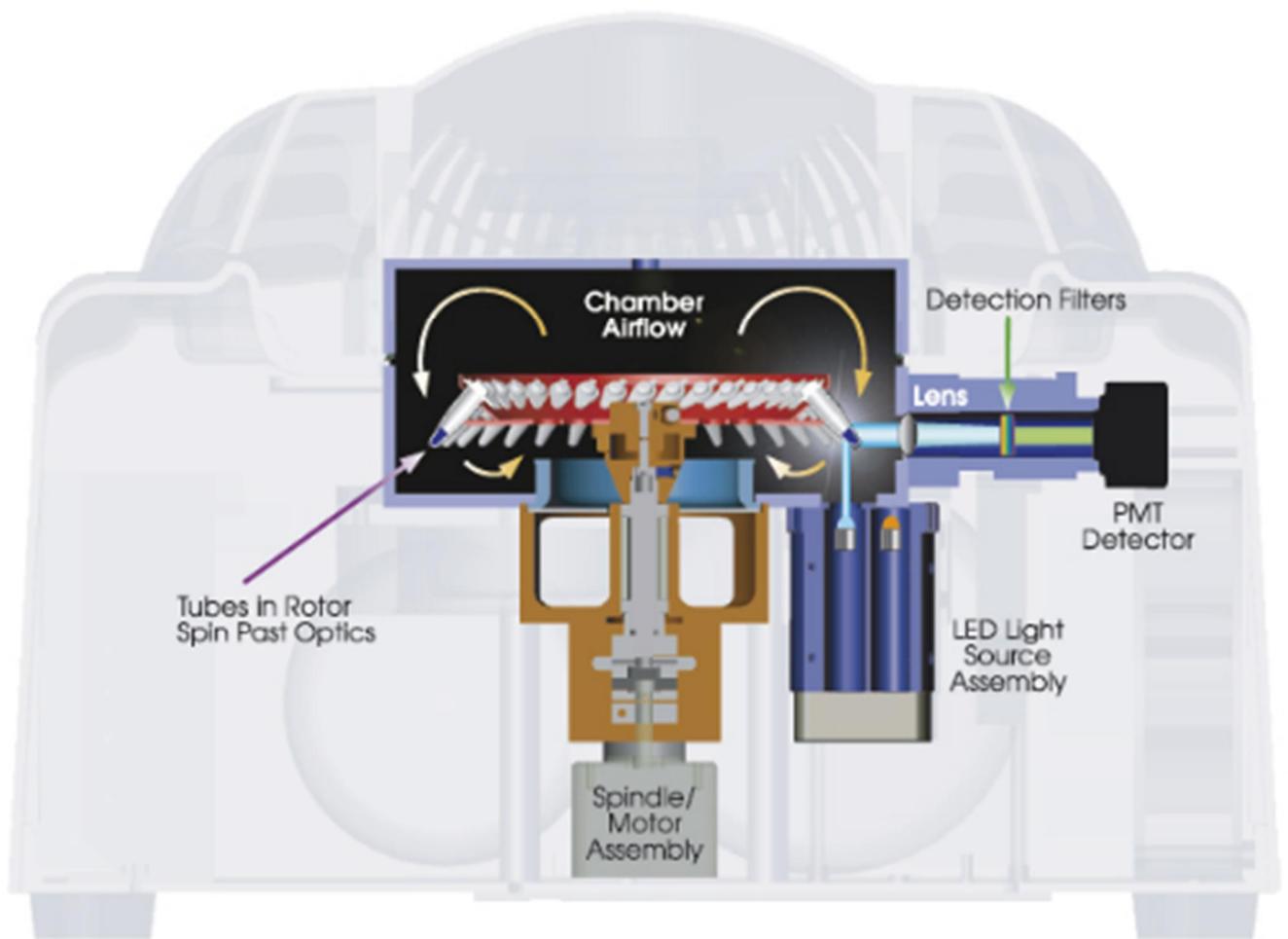


Figure 7 : section du Rotor-Gene Q<sup>®</sup> (source constructeur)

Les résultats sont représentés sur des graphiques de type Scatter (Figure 8).

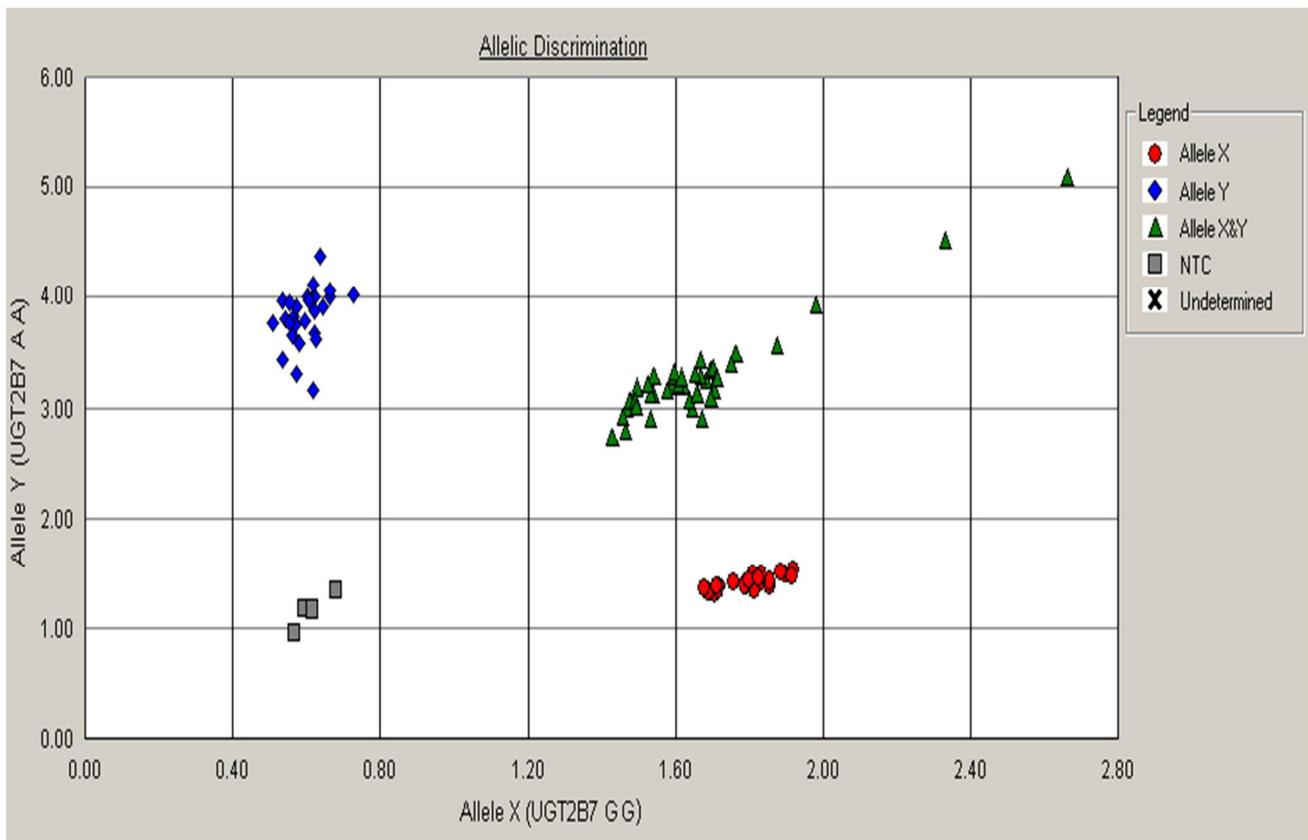


Figure 8 : Résultat de génotypage de 96 patients sur ABI Prism 7000<sup>®</sup> du SNP c.-840G>A au niveau du gène UGT2B7 (en rouge les patients homozygotes sains, en vert les hétérozygotes et en bleu les patients homozygotes variants, les échantillons blancs sont signalés par des rectangles gris).

### 3. Le géotypage par technologie « molecular beacons »

A l'instar des sondes Taqman<sup>®</sup> cette technologie utilise un quencher et un reporter fixés sur une séquence nucléotidique se présentant sous forme d'épingle à cheveux (figure 9). C'est la proximité de ces deux éléments qui les rend optiquement inactifs. Lors de l'hybridation de la sonde ceux-ci s'éloignent permettant l'émission de fluorescence et donc sa mesure. Lors de l'élongation la polymérase déplace alors cette sonde qui se replie et perd sa fluorescence. La conception de cette sonde est particulièrement délicate et onéreuse.

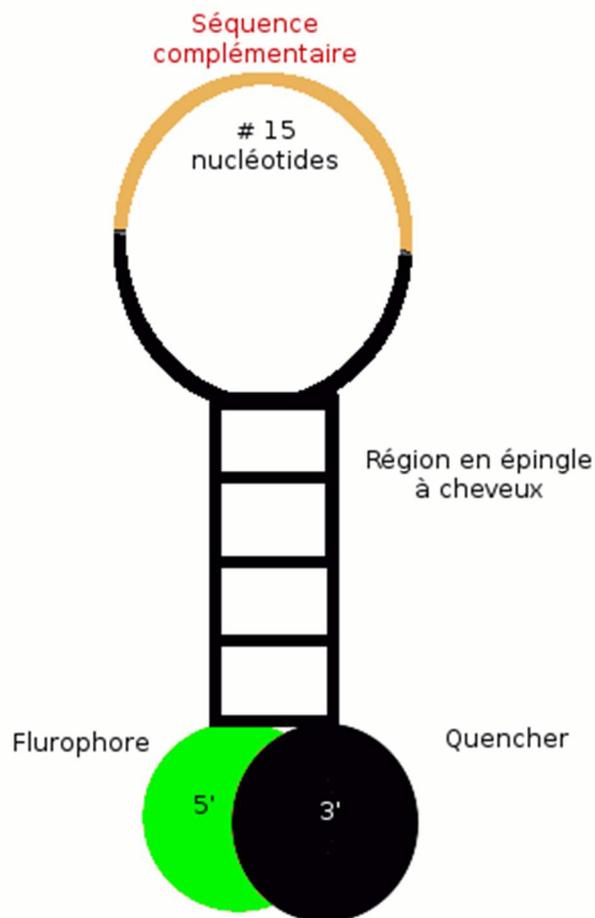


Figure 9 : Sonde type utilisé pour la technologie « molecular beacons »

Il existe une variante de cette méthode appelée « scorpion ». L'ajout d'une molécule d'hexéthylène glycol empêche l'extension de l'ADN par la polymérase et l'amorce intègre alors l'ADN en s'hybridant par un mécanisme rappelant la queue du scorpion.

#### 4. Le séquençage post PCR de type Sanger.

Si les méthodes précédentes permettaient de déterminer un polymorphisme mononucléotidique (Single Nucleotide Polymorphism : SNP), elles ne permettent pas en revanche de déterminer les polymorphismes de type délétion ou insertion (indels).

Le séquençage permet donc, en plus de déterminer les indels, de découvrir éventuellement des polymorphismes non décrits dans la littérature. C'est une technique plus longue à mettre en œuvre et délicate, du fait des nombreuses étapes.

L'ADN à séquencer est dans un premier temps extrait. La séquence d'intérêt est ensuite amplifiée par PCR à l'aide de deux amorces (sens et antisens) en présence d'un tampon contenant du chlorure de Magnésium, des désoxynucléotides (dNTP), et de la Taq polymérase, mélange « pré-mix », préparé dans un poste de sécurité microbiologique. On effectue ensuite l'amplification dans un thermocycleur. Si les amorces n'ont pas été testées au préalable, il est possible de vérifier l'amplification par migration des fragments obtenus sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium (BET).

Les produits d'amplification de PCR sont ensuite purifiés puis soumis à une réaction de séquençage. Le mélange réactionnel contient une amorce sens ou anti-sens, des dNTP et des didésoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP). Chacun des ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) est marqué par un fluorochrome différent dont le spectre d'émission est spécifique. Le mélange de dNTP et de ddNTP est contenu dans un réactif spécifique : le BigDye®.

Les séquences sont ensuite purifiées, dénaturées dans un thermocycleur.

L'électrophorèse de séquençage s'effectue ensuite par le séquenceur sur le principe du séquençage type Sanger : La Taq polymérase incorpore

aléatoirement les ddNTP interrupteurs dans l'ADN. Les produits de cette réaction sont déposés sur un gel de polyacrylamide et soumis à une migration électrophorétique qui les séparera en fonction de leur taille : les plus petits (les plus légers) migreront plus rapidement que les grands. Une résolution optimale permettra de différencier les gels à la paire de base près. L'identification du ddNTP situé en 3' de chaque fragment permettra après regroupement de déterminer la séquence initiale d'ADN.

Les données sont analysées et interprétées à l'aide d'un logiciel. Les résultats sont donnés sous la forme suivante : figure 10.



## 5. Les micropuces (microarrays)

On effectue de micro-dépôts, à l'instar des imprimantes à jet d'encre, de nombreuses séquences d'ADN monobrin qui diffèrent selon les spots sur une lame en semi-conducteur. Elles permettent ainsi l'hybridation de multiples séquences de l'ADN en une étape.

Pour le génotypage on utilise des sondes différentes pour chaque allèle. Les ADN des patients sont munis de fluorochromes. L'ADN monobrin s'hybride sur la puce après amplification et lavage on peut lire et quantifier la fluorescence. Aujourd'hui les biopuces commercialisées permettent de génotyper plus de 1.800.000 SNPs sur une seule plaque (Genome-wide human SNP array 6.0<sup>®</sup>).

### **III. Cibles de la PG du GCV**

Les facteurs génétiques individuels de susceptibilité à la toxicité GCV ne sont pas connus. Il est envisageable que des SNPs entraînant une modification de fonction des protéines cellulaires impliquées dans la pharmacodynamie du GCV soient impliqués. Les principales pistes d'exploration sont :

- Une baisse ou une augmentation de l'efficacité des transporteurs d'influx ou d'efflux du GCV ou de ces métabolites phosphorylés au sein de la cellule pouvant entraîner une accumulation intracellulaire excessive.
- Une altération du fonctionnement des kinases cellulaires prenant en charge le GCV monophosphorylé (GCV-MP) par la kinase virale.

#### 1. Classification des grandes familles de transporteurs

Si la majorité des transporteurs sont impliqués dans le transport de substances endogènes à l'instar des glucides, lipides, protéines et acides aminés d'autres en revanche ont la capacité de transporter des xénobiotiques. En régulant ce transport ils peuvent influencer grandement la réponse aux médicaments en termes d'efficacité ou de toxicité. Ces transporteurs nécessitent pour certains un apport d'énergie sous forme d'ATP (cas de la superfamille ABC : ATP Binding Cassette), ils sont dits transporteurs « actifs » par opposition aux transporteurs passifs. D'autres assure une diffusion « facilitée » (cas de la superfamille SLC : solute carriers). Ces transporteurs permettent aux médicaments d'entrer dans la cellule (transporteur d'influx), de sortir de la cellule (transporteur d'efflux) ou contrôlent ces deux actions.

Les transporteurs d'influx appartiennent à la superfamille SLC (solute carrier). À l'intérieur de celle-ci on retrouve :

Les transporteurs d'anions organiques :

- OAT codés par les gènes *SLC22A* qui sont notamment impliqués dans le transport d'antibiotiques (pénicillines...), d'antiviraux (amantadine, aciclovir), de diurétiques, d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion...<sup>36</sup>,
- et OATP (Organic Anion-Transporting Polypeptides) codés par les gènes *SLC21* (ou *SLCO*) qui transportent un large spectre de molécules amphiphiles comme les acides biliaires, la bilirubine, les hormones thyroïdiennes, les stéroïdes, les statine et le méthotrexate <sup>37</sup>.

Les transporteurs de cations organiques :

- OCT codés par les gènes *SLC22A* impliqués dans le transport d'antinéoplasiques, d'antagonistes histaminiques, de la metformine et d'antiviraux comme l'aciclovir, la lamivudine et le GCV
- et les transporteurs de carnitine OCTN également codés par les gènes *SLC22A* qui transportent la quinidine, la L-carnidine et le vérapamil<sup>38</sup>.

Récemment des transporteurs de bases nucléiques ENT et CNT (*Equilibrative et Concentrative Nucleoside Transporters*) codés respectivement par les gènes *SLC29A* et *SLC28A*. CNT1 transporte les bases pyrimidiques et l'adénosine, CNT2 transporte les bases puriques et l'uridine et CNT3 transporte à la fois les bases puriques et pyrimidiques<sup>39</sup>. Il a été montré également que le transport d'analogues des bases nucléotidiques comme la gemcitabine et la zidovudine pour CNT1 et la ribavirine pour CNT2<sup>40</sup>. Bien que les transporteurs ENT soient le plus souvent considérés comme des transporteurs d'influx ils peuvent fonctionner bidirectionnellement. Leur rôle est de réguler la concentration intracellulaire de nucléosides selon le gradient de concentration.

On retrouve également les transporteurs MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*) codés par les gènes *SLC47* qui sont responsables quant à eux d'un mécanisme d'efflux et d'influx, selon le gradient de protons<sup>41</sup>, de composés tels que la guanidine, thiamine et de médicaments : metformine, cimétidine et aciclovir<sup>42</sup>.

La superfamille *ATP-binding cassette* ABC regroupe la plupart des transporteurs d'efflux utilisant l'ATP comme énergie. À l'intérieur de celle-ci on retrouve les familles *ABCA*, *ABCB*, *ABCC*, *ABCD*, *ABCE*, *ABCDF* et *ABCG*.

La famille *ABCB* comporte 11 membres numérotés de 1 à 11. *ABCB1* codant pour la P-glycoprotéine (P-gp, P pour *permeability*) ou encore appelée MDR1 (pour *multidrug resistance*) est le gène le plus étudié dans les études de PG des transporteurs de par sa large répartition dans les tissus : au niveau des cellules mononuclées sanguines (lymphocytes...), des cellules tubulaires rénales, des entérocytes, des hépatocytes, des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique, du placenta... ainsi que pour sa multiplicité de substrats, généralement des bases amphiphiles ou hydrophobes. La P-gp permet d'effluer une grande partie des xénobiotiques de la cellule par consommation d'ATP et ce, même contre un important gradient de concentration<sup>43</sup>. Egalement exprimé au niveau de nombreuses cellules tumorales, il apparaît comme contribuant à l'échec des chimiothérapies anticancéreuses. Son rôle physiologique n'est pas cependant encore très clair au niveau des lignées blanches.

La famille *ABCC* code pour 13 protéines dont 9 transporteurs MRP (*pour multidrug-resistance-associated protein*). Kock et al. listent leurs principaux substrats, parmi ceux-ci on retiendra parmi les xénobiotiques : pour MRP1 et MRP2 des antirétroviraux inhibiteurs de la protéase, des anticancéreux dont le méthotrexate et des antibiotiques de la classe des fluoroquinolones pour MRP1; pour MRP3 le méthotrexate, l'étoposide et la vincristine, pour MRP4 des antiviraux comme le GCV, la

lamivudine, le 9-(2-phosphonylméthoxyéthyl)adénine ou guanine (PMEA ou PMEG) et des anticancéreux et MRP5 qui transporte la PMEa, PMEG, la stavudine monophosphate ainsi que des anticancéreux analogues des bases nucléotidiques.

Enfin la famille *ABCG* avec son membre le mieux connu à savoir *ABCG2* codant pour la BCRP (pour *breast cancer resistance protein*). Comme son nom le laisse suggérer, ce transporteur prend en charge les anticancéreux comme le méthotrexate ou encore le topotecan et la mitoxantrone, mais également des antirétroviraux (lamivudine, aziothymidine) et des molécules diverses : cimétidine, rosuvastatine...

## 2. Les transporteurs du GCV

Les transporteurs candidats des superfamilles ABC et SLC qui ont été sélectionnés pour le travail présenté en quatrième partie l'ont été sur la base de données bibliographiques en retenant les critères suivants :

- Capacité à transporter les analogues nucléotidiques puriques et idéalement le GCV.
- Expression du transporteur au niveau des lignées sanguines documentée par une étude d'expression en ARNm et/ou protéique.

La liste de ces transporteurs figure dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Principales familles de gènes des transporteurs d'intérêt

Famille de gènes	Exemple de transporteur
<i>ABCB</i>	P-gp (MDR-1) ; MDR-2
<i>ABCC</i>	MRP-1 ; MRP-2 ; MRP-3 ; MRP-4 ; MRP-5
<i>ABCG</i>	BCRP
<i>SLC22</i>	hOCT-1 ; OCT-2 ; OCT-3 ; OCTN-1 ; OCTN-2
<i>SLC28</i>	CNT-1 ; CNT-2 ; CNT-3
<i>SLC29</i>	ENT-1 ; ENT-2 ; ENT-3 ; ENT-4
<i>SLC47</i>	MATE-1 ; MATE-2K

# QUATRIEME PARTIE : PROJET

## « PHARMACOGENETIQUE ET SUIVI THERAPEUTIQUE PHARMACOLOGIQUE DU GCV EN TRANSPLANTATION ».

### I. Introduction

**La transplantation rénale** est indiquée chez les personnes souffrant d'insuffisance rénale terminale. Elle nécessite un traitement immunosuppresseur par des inhibiteurs de la calcineurine ou de la m-TOR (mammalian target of Rapamycin), des anti-métabolites (mycophénolate mofétil ou sodique, ou exceptionnellement azathioprine) et des corticoïdes. Ce terrain est alors favorable au développement d'infections opportunistes telles que les infections à cytomégalovirus (CMV) et justifie la mise en place d'un traitement prophylactique ou curatif par GCV ou VGCV.

La **neutropénie** est l'effet indésirable du GCV le plus fréquent avec une incidence de 5 à 50%<sup>44</sup> suivant le contexte d'utilisation du médicament. Elle survient le plus fréquemment au cours des deux premières semaines de traitement. Une anémie et une thrombocytopénie peuvent être également observées. Cette toxicité hématologique peut conduire à l'arrêt du traitement ou à la diminution des doses ce qui peut aboutir à l'émergence d'une résistance virale et un échec au traitement. L'identification des facteurs de prédisposition à la toxicité du GCV pourrait permettre d'améliorer l'efficacité de ce médicament notamment chez les patients transplantés.

Il a été démontré que le risque de leucopénie augmente avec la dose de GCV utilisée en prophylaxie chez des patients transplantés (Odds Ratio = 3,32 (1,76-6,26) ;  $p=0,0002$  pour une comparaison de 450 mg *versus*

900 mg) sans différence significative d'efficacité<sup>45</sup>. En revanche, aucune association significative n'a été retrouvée entre les concentrations sanguines de GCV et le risque de toxicité hématologique dans le cadre d'un traitement prophylactique<sup>46</sup>. **À notre connaissance, aucune étude clinique n'a exploré l'association entre les concentrations intracellulaires du GCV ou de ses formes phosphorylées et la toxicité hématologique de ce médicament.** Pourtant des éléments expérimentaux suggèrent que ces concentrations intracellulaires pourraient jouer un rôle important. Par exemple, il a été démontré *in vitro* que la protéine d'efflux MRP4 (codée par le gène *ABCC4*) jouait un rôle clé dans l'accumulation intracellulaire et la cytotoxicité des métabolites phosphorylés (actifs) du GCV<sup>47</sup>. L'accumulation intracellulaire des métabolites phosphorylés du GCV était en effet diminuée dans les cellules lymphoïdes T humaines sur-exprimant la protéine d'efflux MRP4 (lignée CEMr1) par rapport aux cellules ne sur-exprimant pas MRP4 (lignée CEMss). Cette étude montrait par ailleurs que les cellules sur-exprimant MRP4 étaient résistantes aux effets cytotoxiques du GCV (l'effet du GCV sur le cycle cellulaire était en revanche identique pour les deux lignées). La surexpression de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (HSV-TK), permettant l'activation intracellulaire du GCV augmentait la sensibilité cellulaire aux effets du GCV mais l'effet sur la viabilité cellulaire restait nettement plus faible pour la lignée sur-exprimant MRP4 (CI<sub>50</sub> 60µM *versus* 12 µM).

**De par son expression importante au niveau des cellules sanguines et des cellules souches hématopoïétiques et ses importantes variabilités génétiques<sup>48</sup>, MRP4 représente donc un candidat valide pour expliquer des prédispositions d'origines génétiques à la toxicité cellulaire du GCV.**

Par ailleurs, il a été démontré que le passage transmembranaire du GCV au niveau érythrocytaire impliquait des transporteurs de bases puriques

(« purine nucleobase carrier ») et, dans une moindre mesure des transporteurs de nucléosides (« nucleoside transporters »)<sup>49</sup>. L'impact des polymorphismes des gènes des transporteurs nucléotidiques des familles SLC28 (codant pour des « concentrative nucleoside transporters » ; CNT) et SCL29 (codant pour des « human equilibrative transporters » : hENT) doit être exploré. Enfin, certains des éléments de la littérature suggèrent que des transporteurs la famille des ATP Binding Cassette (ABCB1 : P-glycoprotéine ; ABCG2 : BCRP) pourraient prendre en charge les bases puriques et le GCV<sup>49</sup>.

**Dans ce contexte, l'équipe Inserm UMR-S850 a élaboré récemment un projet intitulé Pharmacogénétique du traitement prophylactique des infections à cytomégalovirus par valGanciclovir chez les transplantés rénaux (P2G).**

L'objectif de cette étude débutée en 2011 est la mise en place d'un suivi permettant de trouver le meilleur compromis efficacité-toxicité. Ce suivi se basera sur des données PG et pharmacocinétiques afin de rendre plus pertinents les modèles cinétiques existants et de personnaliser ainsi, à terme, les traitements par GCV et VGCV chez les patients transplantés.

Dans l'état actuel on a pu :

- étudier l'association entre les polymorphismes de transporteurs impliqués dans la capture ou l'efflux cellulaire du GCV et la toxicité hématologique de cette molécule ;
- évaluer la faisabilité du dosage intracellulaire des métabolites phosphorylés du GCV à partir d'un modèle expérimental de cellules infectées par le CMV.

Le travail ci-dessous a fait l'objet d'un mémoire de Master II Recherche à la Faculté de Sciences Biologiques et Pharmaceutiques à l'Université de Paris René Descartes.

## II. Matériel et Méthodes :

### 1. Pharmacogénétique :

Ce travail a été effectué :

- Au sein de l'équipe Inserm UMR-S850 intitulée « Pharmacologie des immunosuppresseurs et de la transplantation » (Laboratoire de Pharmacologie médicale, faculté de Médecine de Limoges et service de Toxicologie, Pharmacologie et Pharmacovigilance CHU de Limoges).

#### a) Patients

Cette étude pharmacogénétique était ancillaire à l'étude EPIGREN (Étude épidémiologique de faisabilité d'un observatoire pharmaco-clinique chez les patients greffés rénaux), **cohorte pharmaco-épidémiologique, observationnelle, prospective et multicentrique** (Bordeaux, Limoges, Toulouse), promue par le CHU de Limoges. L'objectif principal d'EPIGREN était d'étudier la faisabilité en termes d'efficacité et d'acceptabilité, incluant la validation d'outils de recueil : instrument de mesure de la qualité de vie chez les transplantés rénaux ReTransQoL<sup>50</sup>, d'un observatoire pharmaco-clinique des transplantés rénaux. Ses objectifs secondaires comportaient l'étude des relations entre observance, effets indésirables et qualité de vie et l'étude des relations entre polymorphismes pharmacogénétiques, exposition aux immunosuppresseurs, efficacité, effets indésirables et observance.

Les critères d'inclusion d'EPIGREN étaient :

- Patients âgés d'au moins 18 ans
- Patients ayant bénéficié d'une greffe rénale entre un jour et 10 ans auparavant
- Patients suivant un traitement immunosuppresseur
- Suivis dans l'un des 3 centres de transplantation rénale investigateurs
- Patients affiliés à un régime de sécurité sociale
- Patients ayant donné leur consentement écrit

Les critères d'exclusion de l'étude étaient :

- Patients ne pouvant pas être suivis dans un des trois centres investigateurs (refus du patient d'un suivi régulier, déménagement...)
- Patients faisant l'objet d'une mesure de sauvegarde de justice
- Patients présentant un trouble psychiatrique ne permettant pas une bonne compréhension du protocole ou une bonne adhésion.

Au final :

- 444 patients inclus dans EPIGREN
  - \* 118 à Limoges
  - \* 200 à Bordeaux
  - \* 126 à Toulouse
  
- Au total 435 patients avec des données disponibles (les autres patients auraient été inclus à tort (greffe depuis plus de 10 ans par exemple) ou sont sortis d'étude avant la première visite)
  - \* 274 hommes (63,0%) et 161 femmes (37,0%)
  - \* 10 patients décédés pendant l'étude

**Notre étude reposait sur l'analyse rétrospective des données collectées dans le cadre de l'étude EPIGREN** sur la base des critères suivants : éligibilité : tous les patients EPIGREN, inclusion : patients ayant reçu un traitement anti-CMV par GCV ou VGCV, patients pour lesquels la date de greffe et le statut sérologique CMV pour le donneur et le receveur sont disponibles et dont le matériel biologique est en collection.

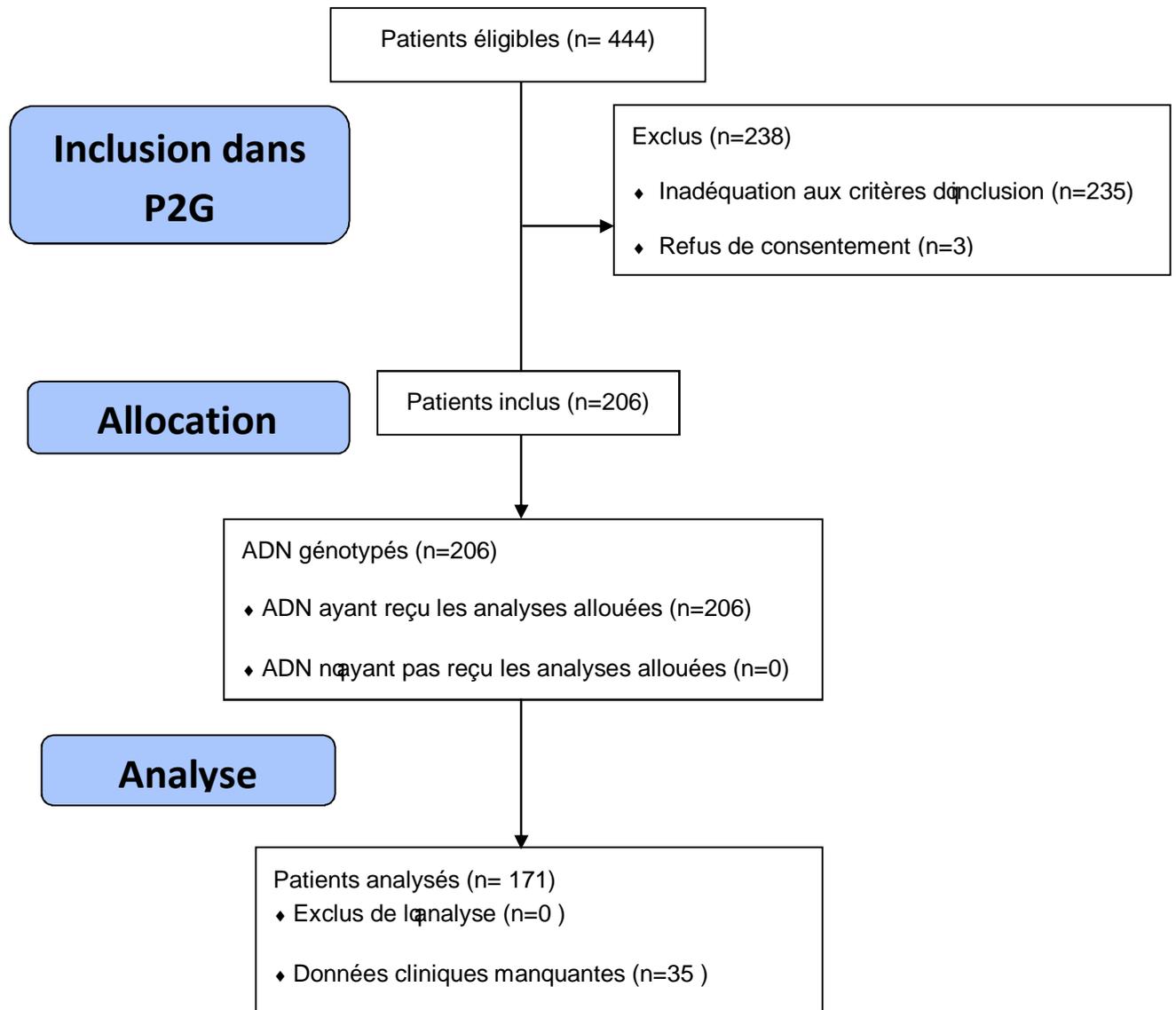


Figure 11 « Flow Chart » de l'étude  
(recommandations CONSORT 2010)<sup>51</sup>

## b) Extraction des ADN

Les ADN génomiques de chaque patient ont été extraits à partir d'un prélèvement de sang total collecté dans des tubes de 5 mL contenant de l'EDTA, réalisé lors de la visite d'inclusion. Les prélèvements avaient été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'extraction. L'extraction d'ADN a été réalisée à l'aide du kit d'extraction QIAamp DNA Blood mini<sup>®</sup> (Qiagen<sup>®</sup>, France) selon le protocole du fournisseur. La pureté et la concentration des ADN ont été mesurées par méthode spectrophotométrique (ND-1000 Nanodrop<sup>®</sup>). Les ADN extraits étaient conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pour les analyse de PCR en temps réel, les ADN extraits ont été dilués à une concentration de  $2\text{ng}/\mu\text{L}$  dans le l'eau pour préparation injectable à l'aide de l'automate QIAgility<sup>®</sup> (Qiagen<sup>®</sup>).

## c) Sélection des gènes et des polymorphismes candidats

Les transporteurs candidats ont été sélectionnés au sein des superfamilles ABC et SLC, sur la base de données bibliographiques en retenant les critères suivants :

1. Capacité à transporter les analogues nucléotidiques puriques et idéalement le GCV.
2. Expression du transporteur au niveau des lignées sanguines documentée par une étude d'expression en ARNm et/ou protéique

Les transporteurs étudiés figurent dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Principaux gènes des transporteurs d'intérêt

Transporteur	Gène	Expression par les lignées sanguines	Transporteur de base purique ou de GCV
P-gp (MDR-1)	<i>ABCB1</i>	Oui (Cascorbi and al. 2011 <sup>52</sup> )	Oui (Park and al.2008 <sup>53</sup> )
MDR-2	<i>ABCB4</i>	Non	-
MRP-1	<i>ABCC1</i>	Oui	Non
MRP-2	<i>ABCC2</i>	-	Non
MRP-3	<i>ABCC3</i>	-	Non
MRP-4	<i>ABCC4</i>	Oui (Oevermann and al. 2009 <sup>54</sup> )	Oui (Adachi and al. 2002 <sup>47</sup> )
MRP-5	<i>ABCC5</i>	Oui (Karla and al.2009 <sup>55</sup> )	Oui (Giraud and al. 2010 <sup>56</sup> )
BCRP	<i>ABCG2</i>	Oui (Wang and al. 2003 <sup>57</sup> )	Oui (Wang and al. 2003 <sup>57</sup> )
hOCT-1	<i>SLC22A1</i>	Oui (Engler and al. 2011 <sup>58</sup> )	Oui (Takeda and al. 2002 <sup>59</sup> )
OCT-2	<i>SLC22A2</i>	Non	-
OCT-3	<i>SLC22A3</i>	Oui	-

OCTN-1	<i>SLC22A4</i>	-	Non
OCTN-2	<i>SLC22A5</i>	-	Non
CNT-1	<i>SLC28A1</i>	-	Non
CNT-2	<i>SLC28A2</i>	Oui (Owen and al.2006 <sup>60</sup> )	Oui (Redell and al. 2007 <sup>61</sup> )
CNT-3	<i>SLC28A3</i>	Oui (Ritzel and al. 2001 <sup>39</sup> )	Oui (Ritzel and al. 2001 <sup>39</sup> )
ENT-1	<i>SLC29A1</i>	Oui (Hyde and al. 2001 <sup>62</sup> )	Oui (Molina-Arcas and al. 2002 <sup>63</sup> )
ENT-2	<i>SLC29A2</i>	Oui (Young and al.2008 <sup>64</sup> )	Oui (Young and al.2008 <sup>64</sup> )
ENT-3	<i>SLC29A3</i>	Oui (Baldwin and al. 2004 <sup>65</sup> )	Oui (Morgan and al.2010 <sup>66</sup> )
ENT-4	<i>SLC29A4</i>	-	Non
MATE-1	<i>SLC47A1</i>	Non	Oui
MATE-2K	<i>SLC47A2</i>	Non	Oui

Les « Single Nucleotide Polymorphism » (SNP) étudiés ont été sélectionnés sur la base des données de la littérature, des données de reséquençage des transporteurs des médicaments (Projet « Polymorphism of Membrane Transporters ; PMT », University of California, San Francisco <http://pharmacogenetics.ucsf.edu/>) et de leur fréquence allélique dans la population Caucasienne (>2,5%).

Les polymorphismes candidats sélectionnés figurent dans le 4.

Tableau 4 Polymorphismes candidats sélectionnés, fréquence allélique dans la population caucasienne et conséquences fonctionnelles ou cliniques :

Gène	Transporteur	Identifiant rs	Substitution nucléotidique	Conséquence sur la séquence en acides aminés	Fréquence de l'allèle variant dans la population Caucasienne	Conséquence fonctionnelle (in vitro)	Conséquence clinique
<i>ABCB1</i>	P-gp (MDR1)	Rs 2229109	c.1199 G>A	p.S400N	2,50 %	L'efflux de vinblastine et vincristine est augmenté chez les 1199A <sup>67</sup>	Augmentation du risque de cancer colorectal <sup>68</sup>
		Rs 1128503	c.1236 C>T	p.G412G	45,90 %		Augmente la réponse à l'imatinib <sup>69</sup>
		Rs 2032582	c.2677 G>T	p.A893T	46,40 %		Diminue la réponse à l'imatinib <sup>69</sup>
		Rs 1045642	c.3435 C>T	p.I1145I	56,10 %	Modifie la spécificité au substrat <sup>70</sup>	Accumulation de lansoprazole. <sup>71</sup>

<i>ABCC4</i>	MRP4	Rs 11568658	c.559 G>T	p.G187W	2,50 %	Augmentation de l'activité de transport pour l'azydothymidine (AZT) et de phosphonylméthoxyethyladénine (PMEA) <sup>48</sup>	
		Rs 2274407	c.912 G>T	p.K304N	8,70 %		Incidence des thrombocytopénies de haut grade augmentée <sup>72</sup>
<i>ABCG2</i>	BCRP	Rs 2231137	c.34 G>A	p.V12M	6,60 %	Diminue le transport de porphyrine <sup>73</sup>	Diminution significative de la réponse à l'imatinib <sup>69</sup>
<i>SLC22A1</i>	OCT1	Rs 12208357	c.181 C>T	p.R61C	7,20 %	Diminution de l'activité du transporteur <sup>74</sup>	Augmentation de l'AUC et de la Cmax de la metformine <sup>75</sup>
		Rs 35167514	c.1258 delA	p.420DEL	18,50 %	Diminution de l'activité du transporteur <sup>74</sup>	Augmentation de l'AUC et de la Cmax de la metformine <sup>75</sup>

		Rs 34305973	c.1259 delT	p.420DEL	18,50 %	Diminution de l'activité du transporteur <sup>74</sup>	Augmentation de l'AUC et de la Cmax de la metformine <sup>75</sup>
		Rs 35191146	c.1260 delG	p.420DEL	18,50 %	Diminution de l'activité du transporteur <sup>74</sup>	Augmentation de l'AUC et de la Cmax de la metformine <sup>75</sup>
		Rs 34059508	c.1393 G>A	p.G465R	4,00 %	Diminution de l'activité du transporteur <sup>74</sup>	Augmentation de l'AUC et de la Cmax de la metformine <sup>75</sup>
<i>SLC28A2</i>	CNT2 (SPNT1)	Rs 2413775	c.-1126 A>T	N/A (Promoteur)	27,50 %	Augmentation de la transcription <sup>76</sup>	
<i>SLC28A3</i>	CNT3	Rs 10868138	c.338 A>G	p.Y113C	8,70 %		Haplotype protecteur de l'anémie induite par ribavirine <sup>77</sup>
<i>SLC29A1</i>	ENT1	Rs 747199	c.-706 G>C	N/A (5'UTR)	21,00 %	Augmentation de l'expression <sup>78</sup>	

N/A : non applicable

#### d) Recherche des polymorphismes

##### - Polymorphismes de délétion du gène *SLC22A1*

Afin d'étudier les polymorphismes de délétion du gène *SLC22A1* codant pour l'OCT1 (rs35167514 ; rs34305973 ; rs35191146), une technique de séquençage a été mise au point.

L'exon 7 du gène a été amplifié par PCR en utilisant la Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase et le PCRx Enhancer System (Invitrogen<sup>®</sup>, Carlsbad, USA). Les amorces sens et antisens ont été désignées en utilisant le logiciel en ligne Primer3+ (<http://frodo.wi.mit.edu/>), puis commandées à la société Eurofins MWG – OPERON<sup>®</sup> (Ebersberg, Allemagne).

Le mélange réactionnel par échantillon était constitué de 5µL de 10x PCR buffer, 1µL de dNTP à 10mM, 1,5 µL MgCl<sub>2</sub> à 50 mM, 0,2µL de Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymérase, de 39,3 µL d'eau pour préparation injectable (EPPI) selon le protocole du fournisseur. 3µL d'amorce sens et anti-sens à 10µM puis 1µL d'ADN ont été ajoutés. L'amplification utilisée est décrite dans la figure 12 :

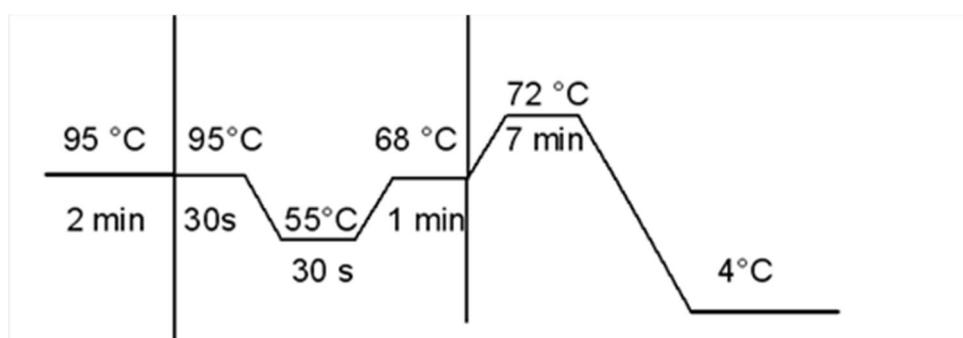
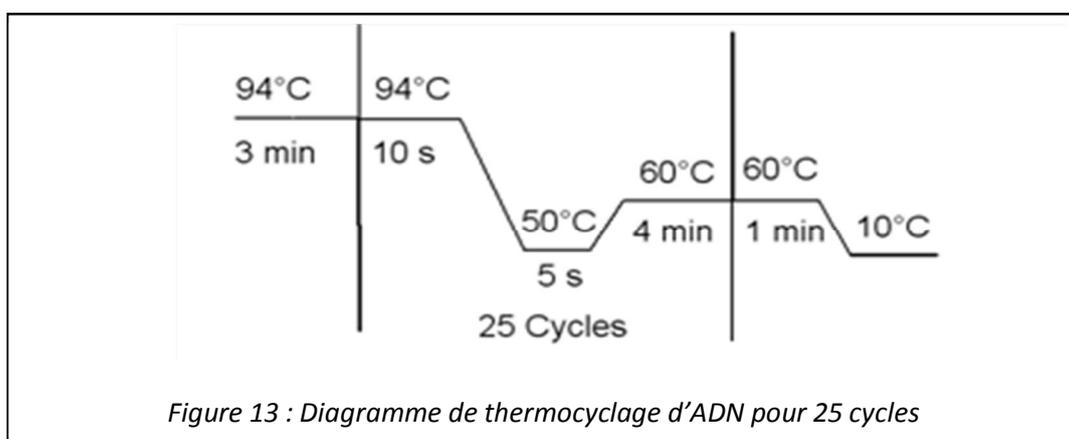


Figure 12 : Diagramme d'amplification d'ADN pour 35 cycles

Le contrôle de la PCR est effectué sur gel d'agarose à 1,5% dans du tampon tris-acétate-EDTA (TAE). Un mélange de 10µL de chaque produit de PCR (échantillons et blanc), de 2µL de bleu de dépôt et 1 µL de solution de Bromure d'éthidium (BET) à 10mg/mL est mis à migrer. Les produits d'amplification de PCR ont été purifiés en utilisant le kit QiAQuick® PCR Purification (Qiagen®, Courtaboeuf, France), selon le protocole du fournisseur, puis soumis à une réaction de séquençage. Celle-ci est réalisée à partir de 4µL de BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit® (Applied Biosystems®, USA), 2µL d'amorce sens ou anti-sens à 2,5µM, de 2µL d'ADN purifié et de 2µL d'EPPI par échantillon. Le thermocyclage utilisé est décrit dans la figure 13.



Après ajout de 10µL d'EPPI, les séquences étaient ensuite purifiées par le kit de purification DyeEx Spin 2.0® (Qiagen®) selon le protocole du fournisseur, dénaturées dans un thermocycleur à 95°C pendant 5 minutes, puis analysées à l'aide d'un séquenceur Hitachi 3130x/Genetic Analyzer (Applied Biosystem®) et interprétées à l'aide du logiciel Sequencher 4.8®.

#### - Autres SNP

Les polymorphismes Rs2229109, Rs1128503, Rs2032582, Rs1045642, Rs11568658, Rs2274407, Rs2231137, Rs12208357, Rs35167514, Rs2413775, Rs10868138, Rs747199 ont été analysés par méthode de

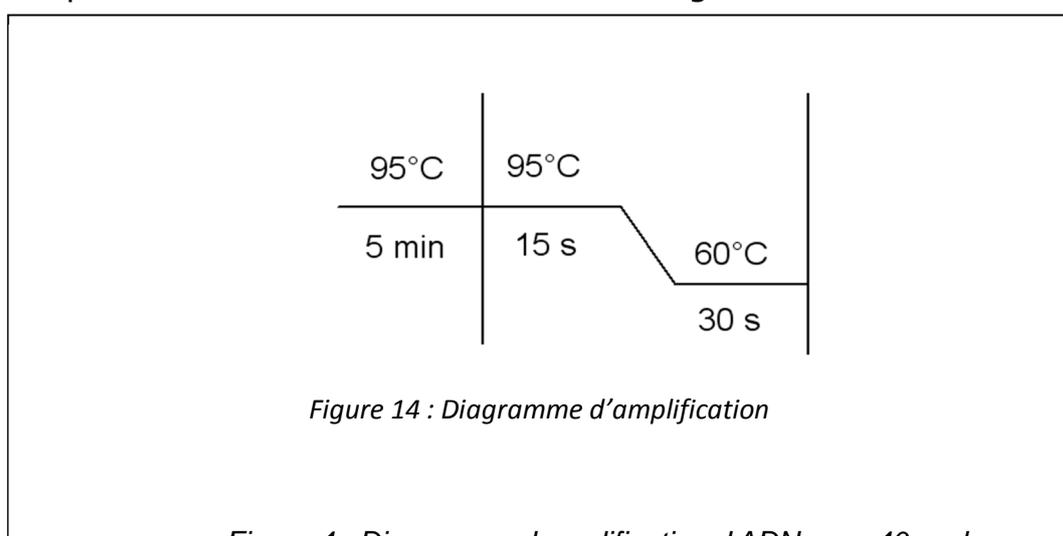
discrimination allélique Taqman<sup>®</sup> à l'aide d'un thermocycleur Rotor-Gene<sup>®</sup> (Qiagen<sup>®</sup>).

Les amorces et sondes Taqman<sup>®</sup> de Rs2229109, Rs1128503 Rs2032582, Rs1045642, Rs2231137, Rs12208357, Rs35167514, Rs2413775, Rs10868138, Rs747199 ont été conçues par la société AppliedBiosystems<sup>®</sup> à partir de séquences préparées dans l'unité (Custom TaqMan Genotyping Assay, AppliedBiosystems<sup>®</sup>). Ces séquences correspondaient à environ 600 bases entourant le polymorphisme d'intérêt et ont été obtenues sur le site « UCSC genome » (<http://genome.ucsc.edu/>). Les bases de ces séquences correspondant à d'autres polymorphismes étaient identifiées à l'aide de l'option GeneView du site du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et masquées, de même que les séquences génomiques répétées à l'aide du logiciel en ligne RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>). Ce travail préparatoire permettait d'éviter la conception d'amorces ou de sondes TaqMan dans ces régions polymorphes ou répétées.

Les amorces de Rs11568658 et Rs2274407 ont été obtenues sous la forme de kits commerciaux (TaqMan SNP genotyping assay) par AppliedBiosystems<sup>®</sup>.

Les mélanges réactionnels (par réaction) ont été les suivants : 3,524µL de Taqman<sup>®</sup> genotyping MasterMix (AppliedBiosystems<sup>®</sup>), 0,176µL du mélange amorces/sondes et 3,3µL d'ADN normalisé à 2ng/µL pour un volume final de 7µL.

L'amplification utilisée est décrite dans la figure 14.



Pour chaque polymorphisme, la distribution observée des génotypes a été comparée à la distribution théorique de Hardy-Weinberg par le test exact de Fischer en utilisant le package « SNPAssoc » dans le logiciel R.

#### e) Analyse statistique

Pour étudier l'effet des variables génétiques et non génétiques sur l'évolution de la numération des neutrophiles, des modèles de régression linéaire à effets mixtes ont été mis au point dans le logiciel R version 2.15.0 (R foundation for statistical computing, <http://www.r-project.org>), package « lme4 ».

Nous avons réalisé une étude longitudinale consistant en des mesures répétées au cours du temps chez un même sujet faisant appel à des modèles à effets mixtes. Ces modèles permettent la prise en compte d'observations répétées pour un même sujet en incluant la variable temps ainsi que des covariables comme effets fixes (pour lesquelles on a quantifié l'effet sur un facteur) et comme effet aléatoire la variable temps (permettant la mesure de la variabilité inter-individuelle). Ce type de modèle inclut une variable réponse (la numération des neutrophiles), une variable temps (les visites du protocole) ainsi que des covariables dépendantes (concentration et dose de GCV, VGCV) et indépendantes du temps (traitement par CELLCEPT<sup>®</sup>, par BACTRIM<sup>®</sup>, SNPs ou haplotypes). Une procédure pas à pas a été utilisée pour la sélection du modèle final : dans un premier temps, l'effet de chaque covariable a été testé comme effet fixe en analyse univariée et celles caractérisées par un  $p < 0,05$  ont été incluses dans un modèle intermédiaire. La significativité des covariables dans le modèle final a été étudiée en retirant chaque variable et en comparant les modèles avec et sans la covariable par le test du rapport des vraisemblances. Pour la persistance des variables dans le modèle final, un  $p < 0,05$  a été choisi. Pour l'analyse des covariables génétiques (SNPs et des haplotypes), l'allèle le plus fréquent a été pris

comme référence. Un modèle génétique dominant a été choisi lorsque la fréquence des homozygotes pour l'allèle minoritaire était inférieure à 5%. Dans les autres cas, un modèle codominant a été choisi. Les graphes ont été réalisés dans le package « GrapheR » du logiciel R.

## 2. Virologie

Les travaux ont été effectués en collaboration avec le service de Bactériologie, Virologie, Hygiène du CHRU de Limoges accueillant le Centre National de Référence (CNR) CMV dirigé par le Pr Sophie Alain.

L'objectif de ces travaux était de disposer de cellules infectées par le CMV. Cette étape était nécessaire avant à la mise au point d'une méthode analytique permettant de déterminer les formes intracellulaires du GCV ; en raison de l'absence de commercialisation des formes phosphorylées du GCV.

### a) Culture cellulaire et activation virale

Matériel utilisé :

- Cellules MRC5

Les cellules MRC5 sont des cellules embryonnaires de poumon de fœtus humain. Elles sont fournies par les laboratoires Biotech; (Besançon ; France); par flacon de 30mL, n°84002. Elles sont cultivées sur milieu « V37 » composé de:

- Milieu MEM : Minimum Essential Media (Eurobio; Courtaboeuf, France).
- Sérum de veau fœtal 10% (LONZA; Verviers, Belgique).
- Tampon Hepes (LONZA; Verviers, Belgique).
- Antibiotiques à ajouter dans le milieu MEM : 5% gentamycine, 1% pénicilline

- 1% L-Glutamine (LONZA; Verviers, Belgique).

- Souche de virus CMV AD169

Cette souche, obtenue auprès de la société ATCC® (référéncée VR-538, Teddington ; UK), est une souche de référence sensible au GCV. Elle a été initialement isolée à partir de biopsies de végétations adénoïdes et d'amygdales d'une jeune fille de 7 ans et est conservée à -180°C dans l'azote.

Afin de constituer un pool de virus AD169 pour l'ensemble des essais de l'étude, le virus a été réactivé par passages sur cellules MRC5.

Les cellules ont été incubées pendant 3 à 5 jours en présence des particules infectieuses puis trypsinées à l'aide d'une solution Versène : EDTA (0,2 g) (SIGMA ALDRICH®, Steinheim, Allemagne), NaCl (8 g), KCl (0,2g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O, et de trypsine aliquotée et conservée à -20°C (Fisher® ; Pittsburgh, Pennsylvanie) (après vérification de la nappe cellulaire au microscope) pour être finalement inoculée dans 2 petites flasques de MRC5. La charge virale infectieuse a été déterminée à partir du surnageant de culture contenant le virus AD169 après 6 passages sur cellules MRC5.

**Cette souche AD169 produite a servi de point de départ à la préparation de virus CMV pour l'ensemble des essais réalisés.**

- Détermination de la charge virale infectieuse de la souche.

Les dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  ont été testées après incubation à 37°C à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 24 heures.

Fixation de l'anticorps primaire : Anticorps monoclonal E13\* anti-HCMV IEA 0,5mL 50x (Argène® réf. 11-003, Verniolle, France).

Fixation de l'anticorps secondaire : AntiMouse IgG + IgM peroxydase 0,5mL 100x (Argène® réf. 50-020 Varilhes, France).

Puis utilisation du kit de coloration Dako® réf. K3468 (Carpinteria, Californie) :

- Fiole « Liquid DAB + substrate buffer » avec solution à base d'imidazole-HCl, de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et un antimicrobien tamponnée à pH=7,5, 100mL
- Fiole « DAB+ chromogen system » avec 1-5% de biphényl-3,3', 4,4'-tétraammoniumtétrachloride et du 3,3'-diaminobenzidine

Le choix des modalités d'incubation avec le GCV a ensuite été fait pour se rapprocher au maximum des conditions rencontrées in vivo tout en respectant les contraintes imposées par le modèle de culture cellulaire.

b) Préparation des échantillons en vue de la mise au point d'une méthode de dosage des formes phosphorylées

Les cellules cultivées en V37 sont inoculées avec la souche AD169 avec une multiplicité d'infection voisine de 1 UFCI par cellule. Après inoculation (3 heures à 37°C), le surnageant de culture est remplacé par du milieu V37 additionné de GCV. La concentration choisie correspond à la CI90 du GCV vis-à-vis du CMV afin d'être comparable en terme de toxicité cellulaire et d'efficacité antivirale à celles utilisées en thérapeutique, soit 8mg/mL concentration finale dans le milieu V37. Le choix de la durée d'incubation de 3 jours a été fait en fonction de la durée nécessaire permettant au virus de réaliser un cycle de réplication

complet et donc de produire la kinase UL97 nécessaire à la phosphorylation du GCV dans les cellules infectées (le GCV pénétrant beaucoup plus rapidement dans les cellules)<sup>79</sup>. En parallèle, le niveau de GCV phosphorylé par les cellules non infectées est mesuré sur un flacon sans virus. Un témoin négatif cellules sans GCV et sans virus est également réalisé. Les concentrations ont été mesurées à la fois dans le culot et dans le surnageant des cellules (de manière à apprécier le passage du GCV à l'intérieur de la cellule).

*Préparation du lysat cellulaire en vue du dosage intracellulaire en dérivés phosphorylés du GCV*

Les premiers essais ont été réalisés en concentrant les lysats cellulaires pour obtenir des aliquots de  $2.10^6$  cellules dans 1mL.

L'extrait cellulaire a dans un premier temps été préparé comme suit :

- Incubation avec du surnageant infecté jusqu'à avoir un ECP > 90%
- Traitement pendant 48 heures des cellules au GCV
- Triple lavage au PBS du culot cellulaire dans la glace
- Reprise par un volume permettant d'obtenir une concentration de  $2.10^6$  cellules dans 1 ml dans la glace
- Congélation à -20 °C jusqu'à l'analyse

### 3. Mise au point du dosage des dérivés phosphorylés intracellulaire du GCV par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

En l'absence de dérivés phosphorylés du GCV disponibles commercialement, nous avons choisi d'optimiser les conditions chromatographiques et spectrométriques sur la base des analogues de la guanosine correspondants.

Les composés ont été infusés dans le système de détection afin de déterminer leur ionisation et fragmentation. Les conditions chromatographiques ont ensuite été déterminées en testant différentes phases stationnaires et mobiles.

#### ○ Molécules et étalons internes

Les molécules suivantes ont été choisies:

- Guanosine 5'-monophosphate disodique (GMP), analogue du GCV-monophosphate
- Guanosine 5'-diphosphate sodique (GDP), analogue du GCV-diphosphate
- Guanosine 5'-triphosphate sodique (GTP) ; analogue du GCV-triphosphate

La 8-Bromoadénosine 5'-triphosphate sodique (Br-ATP) a été choisie comme étalon interne.

Ces molécules ont été obtenues chez Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (St Quentin-Fallavier, France).

Des solutions mères à 1g/L dans l'eau désionisée par système Milli-Q (Millipore Corporation, MA, USA) ont été préparées.

- Solvants et réactifs

L'acétonitrile (ACN) de pureté  $\geq 99,9\%$  et de qualité CLHP, le méthanol (MeOH) de pureté  $\geq 99,9\%$ , l'acide acétique (AcOH) de pureté  $\geq 99,7\%$ , l'ammoniaque (NH<sub>4</sub>OH) de pureté  $\geq 99,99\%$ , l'acétate d'ammonium (NH<sub>4</sub>OAc) de pureté  $\geq 98\%$  et le diéthylamine (DEA) de pureté  $\geq 99,5\%$  provenaient de Sigma-Aldrich®.

- Instrumentation

Tous les essais ont été menés sur un système de chromatographie liquide à haute pression (PE 200 ; Perkin Elmer, France) couplé à un spectromètre de masse en tandem équipé d'une source d'ionisation électrospray (Q-Trap® 2000 ; Applied Biosystems, France).

Les colonnes chromatographiques suivantes ont été testées:

- XTerra® MS C18 2,1x20mm 5µm (Waters® )
- Hypercarb® 100x2,1mm 5µm (Thermo Fisher Scientific®)
- Atlantis® T3 150x2,1mm 3µm (Waters®)

Les colonnes étaient maintenues à 40°C dans une enceinte thermostatée.

La séparation analytique des nucléotides a été effectuée selon une programmation de gradients de deux phases éluantes:

- Phase A : AcOH 0,1% / Eau
- Phase B : ACN 90% / AcOH 0,1% / Eau

Le spectromètre de masse a été utilisé en mode « multiple reaction monitoring » (MRM) avec ionisations négative et positive. Les transitions

MRM de chaque nucléotide ainsi que les paramètres du spectromètre de masse ont été optimisés après infusion des composés préparés à une concentration de 10 mg/L dans des mélanges 80% ACN / 20 % formiate d'ammonium 2mM ou 50% DEA / 50% NH<sub>4</sub>OAc ajusté à pH 10 par l'AcOH.

### **III. Résultats**

#### 1. Evolution des PNN au cours de l'étude

L'évolution des PNN en fonction des visites a été étudiée en traçant la moyenne avec les écart-types des PNN à chaque visite (figure 15) et le nuage de points des valeurs de PNN à chaque visite (figure 16).

**Evolution des PNN en fonction du temps**  
chez les patients traités par GCV ou VGCV

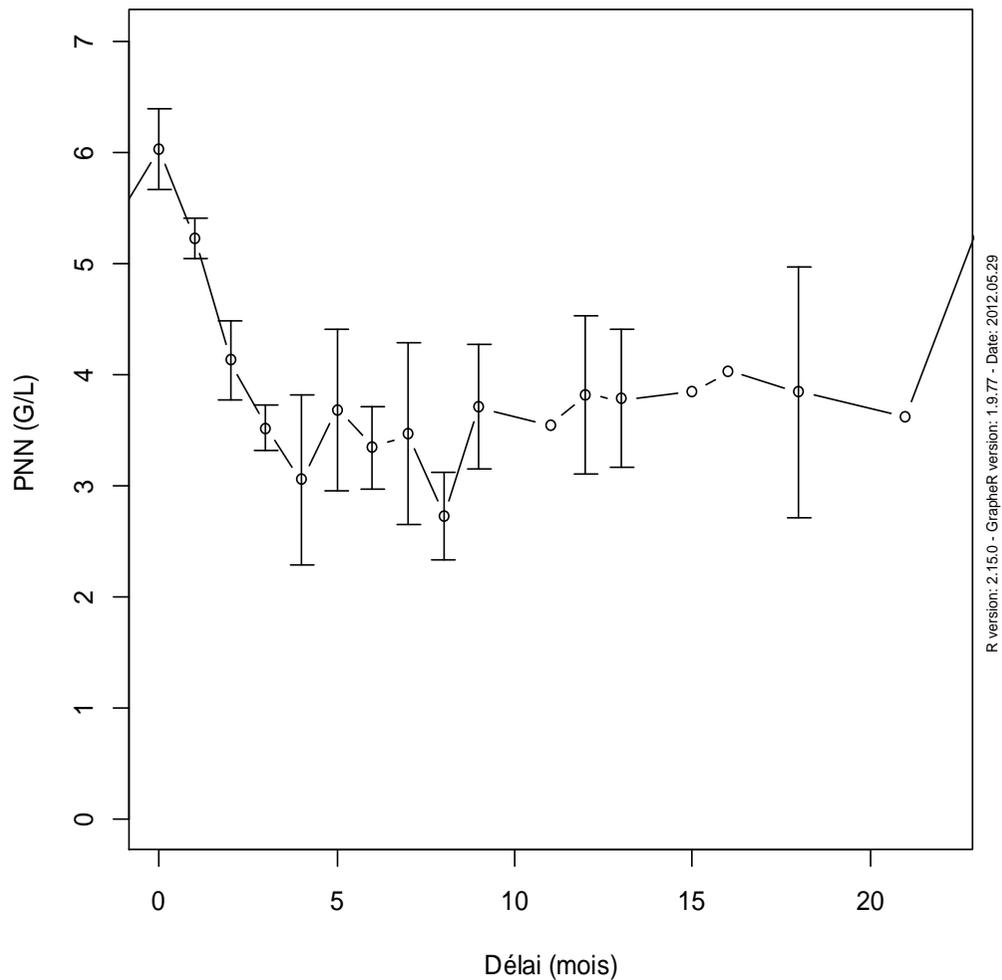


Figure 15 : Evolution de la concentration de neutrophiles moyen chez les patients traités par GCV ou VGCV en fonction des visites

**Evolution des PNN en fonction du temps**  
chez les patients par GCV ou VGCV

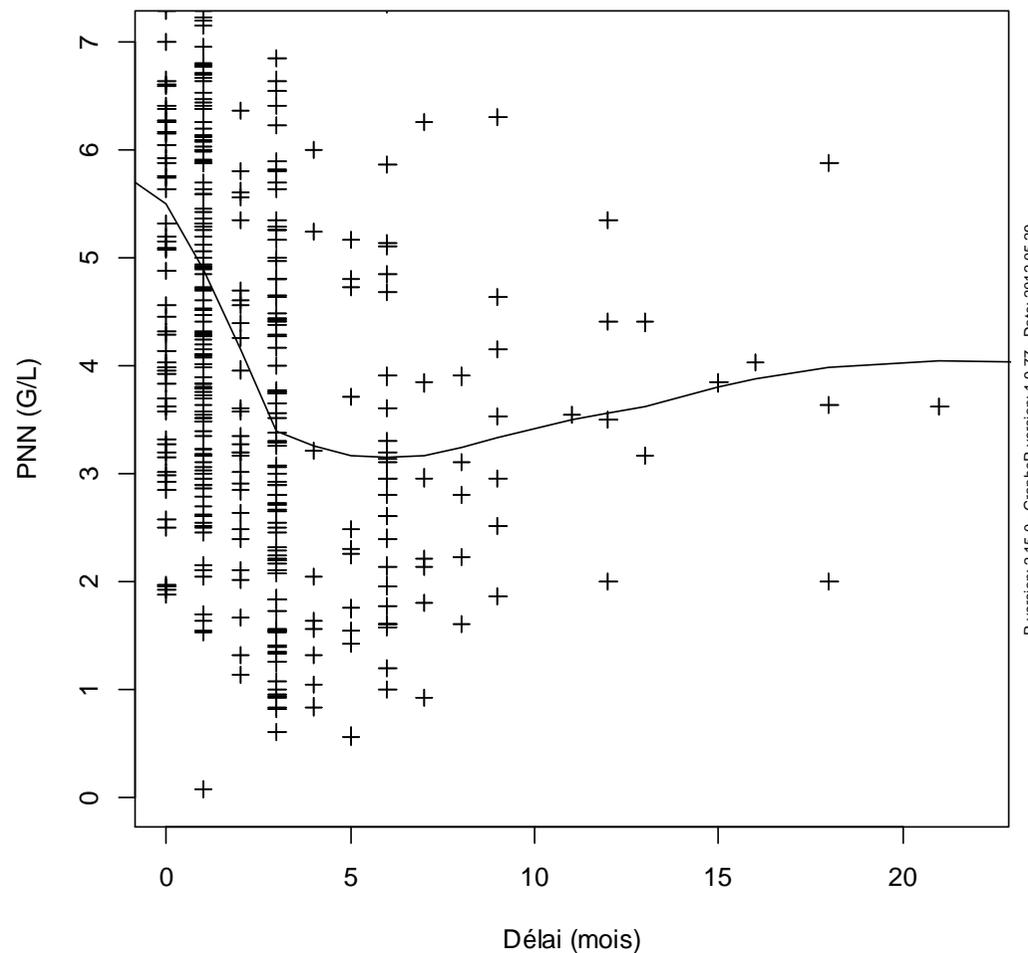


Figure 16 : Evolution de la concentration de neutrophiles chez les patients traités par GCV ou VGCV en fonction des visites par courbe de tendance

## 2. Analyse génotypique et haplotypique

Les génotypages respectaient l'équilibre de Hardy-Weinberg. Les résultats des génotypages sont donnés dans le tableau 5

Tableau 5 : Fréquence et distribution des polymorphismes étudiés chez les transplantés

<b>Distributions génotypiques (n/n total)</b>						
<b>GENE</b>	<b>SNP</b>	wt/wt	wt/vt	mt/vt	<b>Fréquence allélique observée</b>	<b>p* (1ddl)</b>
<b>SLC29A1</b>	rs747199	129/206	68/206	9/206	21%	0,992
<b>SLC28A3</b>	rs10868138	168/206	37/206	1/206	9%	0,492
<b>SLC28A2</b>	rs2413775	101/203	79/203	23/203	31%	0,216
<b>SLC22A1</b>	rs12208357	144/205	51/205	10/205	17%	0,060
	rs34059508	198/206	8/206	0/206	2%	0,776
<b>ABCG2</b>	rs2231137	170/206	35/206	1/206	9%	0,573
<b>ABCC4</b>	rs22274407	176/206	30/206	0/206	7%	0,260
	rs11568658	197/205	8/205	0/205	2%	0,776
<b>ABCB1</b>	rs1045642	63/206	103/206	40/206	44%	0,856
	rs2032582	77/206	92/206	37/206	40%	0,303
	rs1128503	70/206	96/206	40/206	43%	0,493
	rs2229109	188/205	17/205	0/205	4,00%	0,536

wt : allèle sauvage vt : allèle variant

\* La p value correspond au test exact de Fisher comparant la fréquence théorique déterminée par la loi de Hardy Weinberg à la fréquence observée

Comme précédemment décrit dans la littérature<sup>80</sup> un fort déséquilibre de liaison a été observé entre les rs1128503, rs22291091 et 1045642 de *ABCB1* ( $D'_{rs1128503 - rs2229109} = 0,877$  ;  $D'_{rs1128503 - rs1045642} = 0,726$  ;  $D'_{rs2229109 - rs1045642} = 0,755$ )

### 3. Analyse multivariée

L'analyse univariée a montré une association significative entre le Rs2229109 (*ABCB1* ; c.1199 G>A) et une diminution du taux de PNN ( $p=0,030$ ) et entre le Rs11568658 (*ABCC4* ; c.559G>T) et une augmentation du taux de PNN ( $p=0,036$ ) : tableau 6. Ces facteurs influençaient le modèle final multivarié (Rs2229109 G/G vs G/A,  $p= 0,075$  ; Rs11568658 G/T vs T/T,  $p= 0,052$ ), en effet lors de leur retrait du modèle on observait une variation significative de la vraisemblance ( $p<0,001$ ); tableau 7.

Tableau 6 : Analyse univariée de l'association entre les covariables pharmacogénétiques et cliniques avec la concentration de neutrophiles

Covariable	Catégorie	coefficient $\beta$	Ecart-type	p-value
<b>Traitement au GCV ou VGCV</b>	Faible ( $\leq 450$ mg/j VGCV ou $\leq 150$ mg/j GCV)	0,41	0,36	0,255
	Fort ( $>450$ mg/j VGCV ou $>150$ mg/j GCV)	-0,41	0,36	0,255
<b>CELLCEPT®</b>		-0,64	0,47	0,179
<b>BACTRIM®</b>		0,23	0,35	0,519

<b>Rs2229109</b>	G/G	-1,04	0,48	0,030
<b>Rs747199</b>	G/C	0,69	0,68	0,314
	G/G	0,91	0,66	0,170
<b>Rs10868138</b>	A/G	-0,265	0,37	0,473
<b>Rs2413775</b>	A/T	-0,43	0,30	0,152
	T/T	0,21	0,46	0,653
<b>Rs12208357</b>	T/C	0,23	0,32	0,469
	T/T	-0,15	0,59	0,797
<b>Rs34059508</b>	G/G	-0,57	0,83	0,489
<b>Rs2231137</b>	G/A	-1,70	1,98	0,390
	G/G	-1,75	1,96	0,371
<b>Rs22274407</b>	G/T	-0,33	0,40	0,413
<b>Rs11568658</b>	G/T	1,54	0,73	0,036
<b>Rs1045642</b>	T/C	0,53	0,32	0,102
	T/T	0,50	0,41	0,226
<b>Rs2032582</b>	G/T	0,24	0,31	0,435
	T/T	0,50	0,41	0,226
<b>Rs1128503</b>	G/A	0,10	0,38	0,256
	G/G	-0,35	0,40	-0,867

Tableau 7 : Modèle final multivarié de l'association entre les covariables pharmacogénétiques avec le taux de neutrophiles

<b>Covariable</b>	<b>Catégorie</b>	<b>coefficient <math>\beta</math></b>	<b>Ecart-type</b>	<b>p-value</b>
<b>Rs2229109</b>	G/G	-0,87	0,49	0,075
<b>Rs11568658</b>	G/T	1,41	0,72	0,052

#### 4. Culture virologique

Les cellules des plaques destinées au dosage ont été infectées avec la souche virale réactivée après six passages.

Après incubation à 37°C à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 24 heures, on met en évidence les cellules infectées au microscope et on détermine le titre infectieux à  $26.10^3$  UFCI.

Environ  $40.10^6$  cellules infectées et traitées au GCV ont été préparées et stockées à -20°C.

#### 5. Etude analytique

Les paramètres de spectrométrie de masse des analogues de la guanosine sont donnés dans le tableau 8 pour le système de LC-MS/MS.

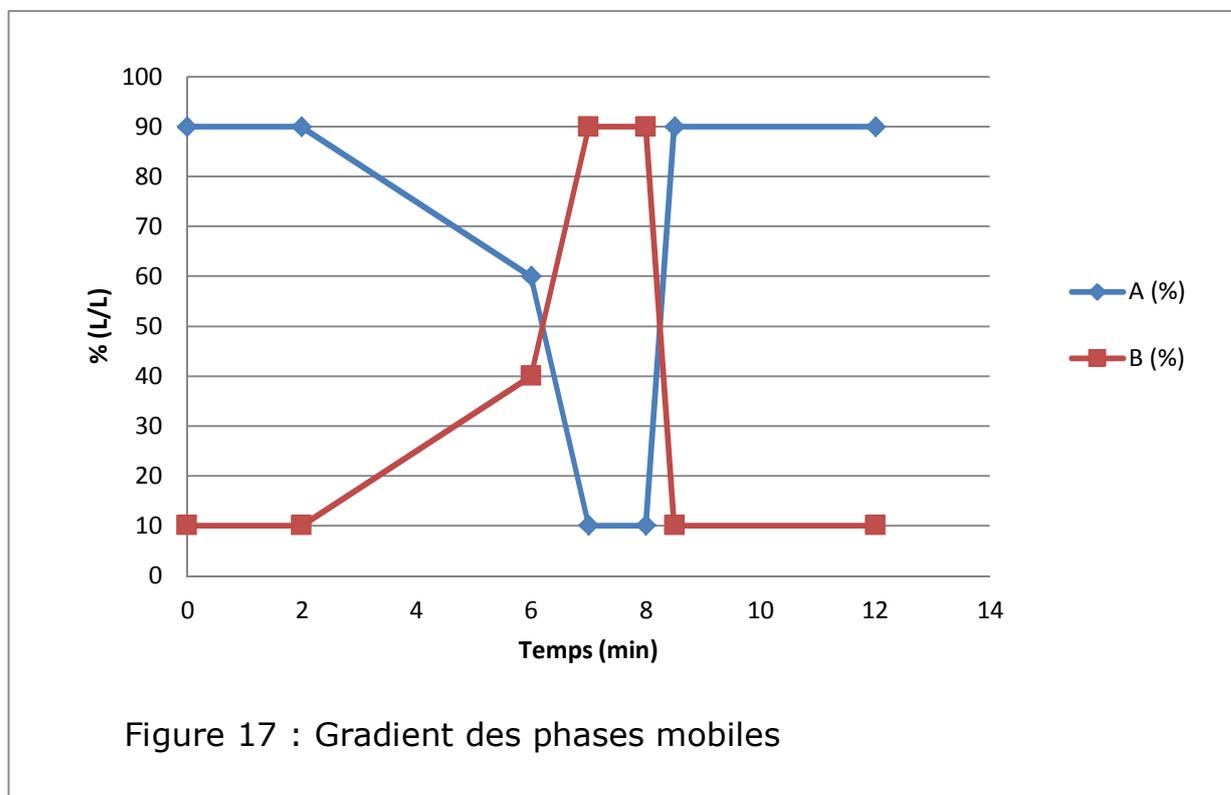
Tableau 8 : Paramètres spectrométriques des analogues de la guanosine.

Analyte	Masse moléculaire (g/mol)	Mode MS utilisé	Masse des ions parents (m/z)	Masse des ions fils (m/z)	Abondance relative (%)	
GMP	363,19	+	437,0*	364,2	62%	
				152,1	100%	
				135,2	31%	
				110,1	14%	
GDP	443,19	+	590,1**	517,1	53%	
				444,0	65%	
				152,2	100%	
				134,8	19%	
GTP	523,19	+	670,1**	597,1	65%	
				524,1	69%	
				152,2	100%	
				74,2	18%	
				743.1***	670,2	49%
				597,0	56%	
				524,1	66%	
152,2	100%					
Br-ATP	586,09	+	731,9**	658,9	80%	
				585,9	66%	
				214,2	100%	
				74,2	21%	
				806,9***	660,8	100%
				587,7	78%	
				215,8	91%	
73,9	19%					

\* : présence d'un adduit de DEA ; \*\* : présence de deux adduits de DEA

\*\*\* : présence de trois adduits de DEA

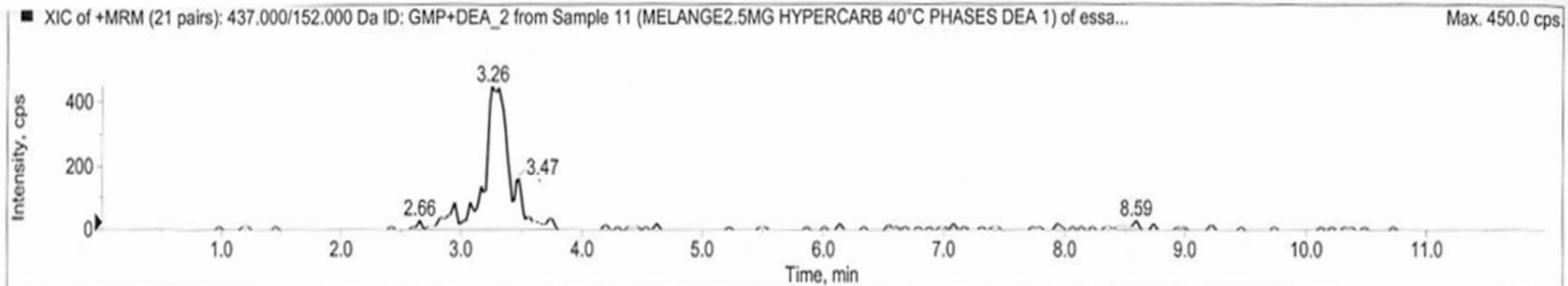
- Les conditions chromatographiques retenues ont été les suivantes :
- Colonne : Hypercarb<sup>®</sup> 100x2,1mm 5µm (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>)
  - Gradient : figure 17



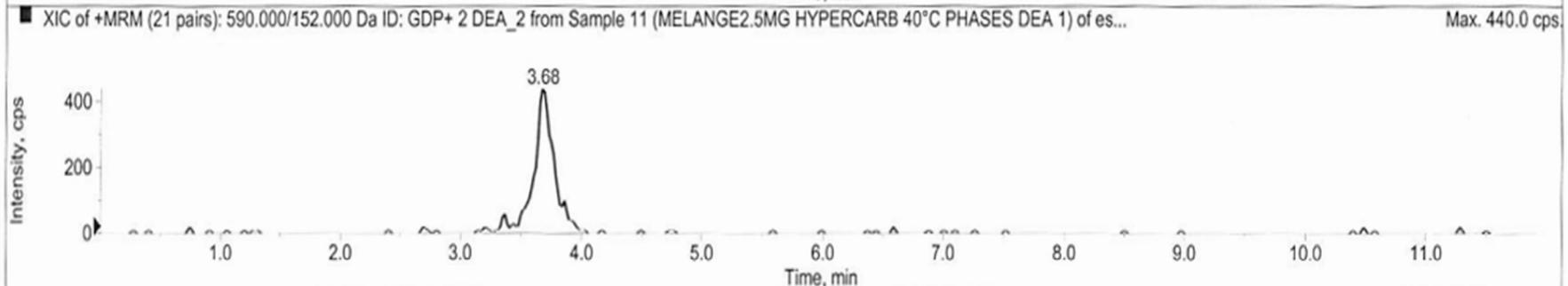
Les figures 18 et 19 représentent les chromatogrammes obtenus après injection d'un mélange de GMP, GDP, GTP et Br-ATP à 2,5mg/L.



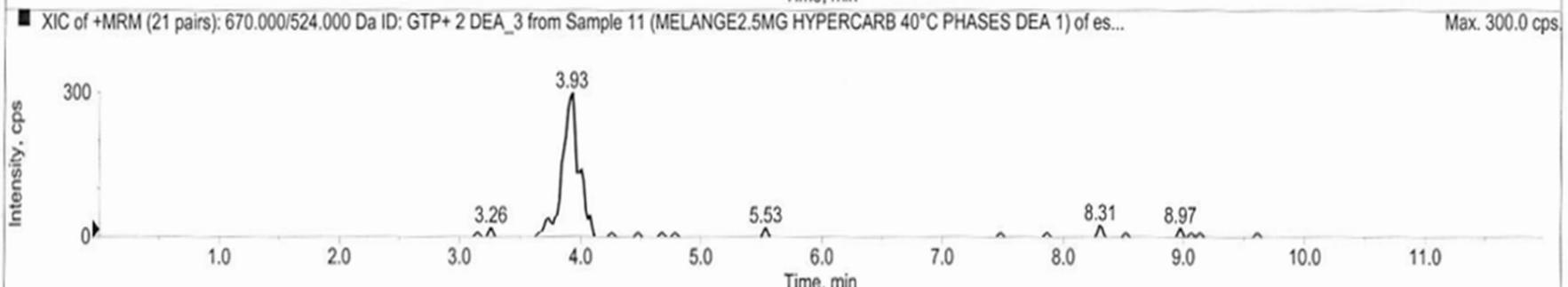
1



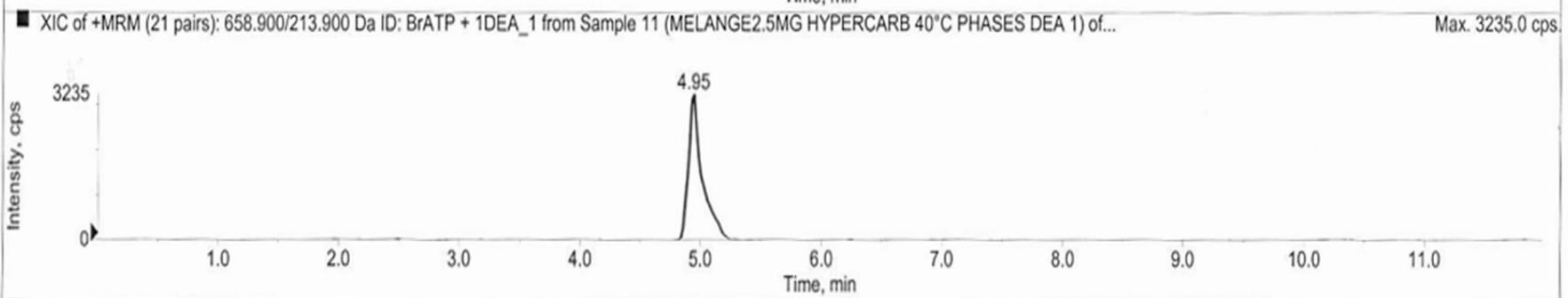
2



3



4



\*Operateur :

\*Retraitement :

\*Valideur :

\*Impression : DL

Figure 19 : Chromatogrammes des transitions suivies en MRM de GMP avec 1 molécule de DEA [1] de GDP avec 2 molécules de DEA [2] de GTP avec 2 molécules de DEA [3] et de l'étalon interne [4]

## **IV. Discussion et conclusion :**

Cette étude gène-candidat visait à rechercher des facteurs pharmacogénétiques pouvant expliquer la neutropénie induite par traitement au GCV ou VGCV chez les patients transplantés rénaux. Parmi les 12 polymorphismes (répartis sur 7 transporteurs) étudiés, seuls 2 : rs2229109 (*ABCB1*) et rs11568658 (*ABCC4*) étaient significativement associés à des variations de la concentration de neutrophiles circulants.

En parallèle de cette étude, nous avons débuté la mise au point d'une méthode de dosage intracellulaire des métabolites phosphorylés du GCV, à partir d'un modèle expérimental de cellules infectées par le CMV, par chromatographie liquide haute performance munie d'un détecteur à spectrométrie de masse en tandem.

La sélection des gènes de transporteurs et de leurs polymorphismes a été établie sur une analyse approfondie de la littérature. Cette liste de gènes incluait des transporteurs des analogues nucléotidiques puriques ou du GCV peu ou pas étudiés jusqu'à présent (ENT, CNT...), des transporteurs dont les polymorphismes sont connus pour contribuer à la variabilité pharmacocinétique ou pharmacodynamique de certains médicaments (P-gp, MRP4...). L'ensemble de ces gènes étaient exprimés au niveau des cellules hématopoïétiques.

Nous avons utilisé une analyse statistique linéaire à effets mixtes particulièrement appropriée pour la modélisation de l'impact de l'exposition au GCV et VGCV en fonction du temps sur la numération des neutrophiles avec des covariables génétiques et médicamenteuses.

A notre connaissance il s'agit de la première étude d'association entre la toxicité du GCV et du VGCV avec des polymorphismes de transporteurs.

**Seules 2 associations ont été observées. Le génotype Rs2229109 (c.1199) [G/G] de ABCB1 était fortement associé à une diminution de la concentration de neutrophiles par rapport au génotype [G/A]. A l'inverse le génotype Rs11568658 (c.559) [G/T] était associé à une augmentation de la concentration de neutrophiles par rapport au génotype [T/T].**

Le résultat concernant le rs2229109 est d'autant plus intéressant qu'il a été observé que l'efflux cellulaire d'au moins 2 molécules (vinblastine et vincristine) est augmenté chez les porteurs de l'allèle 1199A de la P-gp<sup>67</sup>. L'effet protecteur de cet allèle par rapport à l'allèle 1199G vis-à-vis de la toxicité du GCV et du VGCV pourrait donc passer par un efflux augmenté du GCV ou de ces métabolites. Il reste à vérifier s'il existe un impact de ce même polymorphisme sur l'efficacité du traitement.

Ces hypothèses devront être confirmées in vitro par incubation du GCV sur un modèle cellulaire exprimant le transporteur sous sa forme de référence ou sa forme variante.

Concernant MRP4, il a été précédemment démontré, in vitro, que celui-ci permettait d'éviter l'accumulation intracellulaire de GCV<sup>47</sup>. Il a été montré que l'un de ses polymorphismes (Rs11568658) peut augmenter son activité vis à vis d'autres molécules (AZT et PMEPA)<sup>48</sup>. Un second polymorphisme (Rs2274407) de ce gène a été associé à une plus forte incidence de thrombocytopénies de haut grade lors du traitement de leucémies aiguës lymphoblastiques par méthotrexate et 6-mercaptopurine mais aucune donnée de fonctionnalité in vitro n'est disponible à ce jour. Ces deux polymorphismes sont les plus fréquents chez les caucasiens. Seul

le Rs11568658 semble diminuer le risque de neutropénie induite par GCV. Ce résultat nécessite également d'être confirmé par une approche in vitro.

Aucun des 10 autres polymorphismes étudiés ne semble influencer significativement l'évolution de la concentration de neutrophiles à la suite d'un traitement par GCV ou VCGV. Par ailleurs, aucune association n'a pu être mise en évidence entre la prise d'un traitement immunosuppresseur anti-métabolite (CELLCEPT®) ou le traitement antibactérien par BACTRIM® réputés tous deux neutropéniants, et la concentration de neutrophiles.

Nous avons déterminé les conditions chromatographiques et spectrométriques permettant l'analyse des analogues de la guanosine par LC-MS/MS. A ce stade, nous n'avons pas encore optimisé une technique permettant de quantifier les dérivés intracellulaires du GCV dans des cellules infectées par le CMV et mises en contact avec du GCV. Il s'agira de la dernière étape d'un travail qui nécessitera au préalable : (1) une optimisation de l'extraction (vraisemblablement en phase solide) ; (2) une identification des ions des dérivés du GCV ; (3) une validation analytique de la méthode. Toutefois, nous avons d'ores et déjà réalisé des tests préliminaires qui nous ont permis de détecter *a minima* du GCV et du GCV-DP dans un échantillon de cellules infectées. Une fois au point cette méthode sera essentielle pour étudier in vitro et ainsi mieux comprendre les associations pharmacogénétiques observées.

En conclusion, notre étude a mis en évidence des associations entre la pharmacogénétique des transporteurs et la diminution des neutrophiles chez le transplanté rénal traité sous GCV ou VGCV. Des études supplémentaires doivent être menées afin d'explorer d'autres polymorphismes sur la toxicité du GCV et du VGCV ainsi

que sur leur efficacité (étude ORPHAVIC actuellement en cours ; promoteur CHU de Limoges). Enfin, nous avons partiellement développé une technique analytique qui devra permettre à terme de détecter, voire de quantifier les dérivés intracellulaires du GCV et de pouvoir ainsi croiser des informations de pharmacogénétique et de pharmacocinétique.

## **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

Dans le contexte de la transplantation, on comprend l'importance pour la survie du greffon et du patient de la mise en place d'un traitement prophylactique ou curatif des infections par CMV.

L'apparition de résistances virologiques a complexifiée ce traitement même si la connaissance de ces facteurs de résistance a fortement progressée sous l'influence des centres nationaux de référence du CMV.

Il apparaît donc nécessaire de mettre en place un suivi thérapeutique pharmacologique sur ces traitements afin de garantir une efficacité tout au long du traitement et ainsi limiter le risque d'apparition de résistances, tout en limitant le risque toxique de ces médicaments.

Cependant les variabilités interindividuelles et notamment la pharmacogénétique n'a, pour l'instant, pas été explorée (nous présentons probablement la première étude réalisée dans le domaine).

Les résultats obtenus ne peuvent être considérés que comme des résultats préliminaires. Ainsi ces résultats devront être validés à l'aide de modèles in vitro, et idéalement une étude clinique de confirmation doit être envisagée.

Par ailleurs, une étude approfondie des kinases intracellulaires humaines apparaît souhaitable. La variabilité génétique de ces protéines pourrait en effet être des facteurs modifiant l'efficacité ou la toxicité du médicament.

Parmi les kinases potentielles on retient :

La polynucléotide kinase/phosphatase (PNKP). Elle est active au niveau nucléaire et mitochondrial<sup>81</sup>. Elle permet la fixation du groupement phosphate sur une fonction hydroxyle en 5' du ribose d'une base à partir du 3ème phosphate de l'ATP. Elle peut également échanger le dernier groupement phosphate d'un ADN ou d'un ARN sur un ADP. Cette enzyme est commercialisée extraite d'E.coli infecté par un virus T4, elle permet de radiomarquer les acides nucléiques par du Phosphate 32.

La guanylate kinase qui catalyse la réaction ((d)GMPK) :

$ATP + GMP \rightarrow ADP + GDP$  pour le GMP et le désoxyGMP.

La nucléotide diphosphate kinase (NDPK), qui comme son nom le laisse suggérer, a pour fonction de phosphoryler les bases nucléotidiques diphosphatées à partir d'ATP. Elle peut ainsi catalyser la réaction :

$ATP + GDP \rightarrow ADP + GTP$

On estime à 6 le nombre d'isoformes de cette protéine.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Weclawiak H, Mengelle C, Ould Mohamed A, et al: [Cytomegalovirus effects in solid organ transplantation and the role of antiviral prophylaxis]. *Nephrol Ther* 6:505-12, 2010
2. Bataille S, Moal V, Gaudart J, et al: Cytomegalovirus risk factors in renal transplantation with modern immunosuppression. *Transpl Infect Dis* 12:480-8, 2010
3. Clercq ED: Antivirals and antiviral strategies. *Nat Rev Micro* 2:704-720, 2004
4. Riley HD, Jr.: History of the Cytomegalovirus. *Southern Medical Journal* 90:184-190, 1997
5. Wright HT, Jr., Goodheart CR, Lielausis A: Human Cytomegalovirus. Morphology by Negative Staining. *Virology* 23:419-24, 1964
6. Chee MS, Bankier AT, Beck S, et al: Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* 154:125-69, 1990
7. Dolan A, Cunningham C, Hector RD, et al: Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 85:1301-12, 2004
8. Britt WJ, Boppana S: Human cytomegalovirus virion proteins. *Hum Immunol* 65:395-402, 2004
9. Mocarski ES ST, Pass R: Cytomegaloviruses. *Fields' Virology* 2:2705-2710, 2007
10. Vonka V, Benyeshmelnick M: Thermoinactivation of human cytomegalovirus. *J Bacteriol* 91:221-6, 1966
11. Dohner K, Sodeik B: The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 285:67-108, 2005
12. Wiebusch L, Asmar J, Uecker R, et al: Human cytomegalovirus immediate-early protein 2 (IE2)-mediated activation of cyclin E is cell-

cycle-independent and forces S-phase entry in IE2-arrested cells. *J Gen Virol* 84:51-60, 2003

13. Paulus C, Krauss S, Nevels M: A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3840-5, 2006

14. Yu X, Trang P, Shah S, et al: Dissecting human cytomegalovirus gene function and capsid maturation by ribozyme targeting and electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7103-8, 2005

15. Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H: Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res* 143:222-34, 2009

16. Cranage MP, Smith GL, Bell SE, et al: Identification and expression of a human cytomegalovirus glycoprotein with homology to the Epstein-Barr virus BXLF2 product, varicella-zoster virus gpIII, and herpes simplex virus type 1 glycoprotein H. *J Virol* 62:1416-22, 1988

17. Irmiere A, Gibson W: Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* 130:118-33, 1983

18. Kumar ML, Nankervis GA, Gold E: Inapparent congenital cytomegalovirus infection. A follow-up study. *N Engl J Med* 288:1370-2, 1973

19. Gold E, Nankervis GA: Cytomegalovirus, in Press P (ed): *Viral infections of humans: epidemiology and control*. New York, 1976, pp 143-161

20. Hecker M, Qiu D, Marquardt K, et al: Continuous cytomegalovirus seroconversion in a large group of healthy blood donors. *Vox Sang* 86:41-4, 2004

21. Sinclair E, Tan QX, Sharp M, et al: Protective immunity to cytomegalovirus (CMV) retinitis in AIDS is associated with CMV-specific T cells that express interferon- gamma and interleukin-2 and have a CD8+ cell early maturational phenotype. *J Infect Dis* 194:1537-46, 2006

22. Sweet C: The pathogenicity of cytomegalovirus. *FEMS Microbiol Rev* 23:457-82, 1999

23. McDonagh S, Maidji E, Chang HT, et al: Patterns of human cytomegalovirus infection in term placentas: a preliminary analysis. *J Clin Virol* 35:210-5, 2006
24. Tu W, Potena L, Stepick-Biek P, et al: T-cell immunity to subclinical cytomegalovirus infection reduces cardiac allograft disease. *Circulation* 114:1608-15, 2006
25. Stagno S, Pass RF, Cloud G, et al: Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *Jama* 256:1904-8, 1986
26. Rowshani AT, Bemelman FJ, van Leeuwen EM, et al: Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 79:381-6, 2005
27. Fishman JA, Emery V, Freeman R, et al: Cytomegalovirus in transplantation - challenging the status quo. *Clin Transplant* 21:149-58, 2007
28. Noble S, Faulds D: Ganciclovir. An update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drugs* 56:115-46, 1998
29. Zimmermann A, Michel D, Pavic I, et al: Phosphorylation of aciclovir, ganciclovir, penciclovir and S2242 by the cytomegalovirus UL97 protein: a quantitative analysis using recombinant vaccinia viruses. *Antiviral Res* 36:35-42, 1997
30. Brestrich G, Zwinger S, Fischer A, et al: Adoptive T-cell therapy of a lung transplanted patient with severe CMV disease and resistance to antiviral therapy. *Am J Transplant* 9:1679-84, 2009
31. Hantz S, Garnier-Geoffroy F, Mazon MC, et al: Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J Antimicrob Chemother* 65:2628-40
32. Loit E, Tricco AC, Tsouros S, et al: Pre-analytic and analytic sources of variations in thiopurine methyltransferase activity measurement in patients prescribed thiopurine-based drugs: A systematic review. *Clin Biochem* 44:751-7

33. Krynetski EY, Evans WE: Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: molecular mechanisms and clinical importance. *Pharmacology* 61:136-46, 2000
34. Chrzanowska M, Kuehn M, Januszkiewicz-Lewandowska D, et al: Thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in children with acute lymphoblastic leukemia. *Acta Pol Pharm* 69:405-10
35. Dubinsky MC, Reyes E, Ofman J, et al: A cost-effectiveness analysis of alternative disease management strategies in patients with Crohn's disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. *Am J Gastroenterol* 100:2239-47, 2005
36. Sekine T, Cha SH, Endou H: The multispecific organic anion transporter (OAT) family. *Pflugers Arch* 440:337-50, 2000
37. Hagenbuch B, Gui C: Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica* 38:778-801, 2008
38. Koepsell H, Lips K, Volk C: Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res* 24:1227-51, 2007
39. Ritzel MW, Ng AM, Yao SY, et al: Recent molecular advances in studies of the concentrative Na<sup>+</sup>-dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *Mol Membr Biol* 18:65-72, 2001
40. Cano-Soldado P, Llorayoz IM, Molina-Arcas M, et al: Interaction of nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase with the concentrative nucleoside transporter-1 (SLC28A1). *Antivir Ther* 9:993-1002, 2004
41. Otsuka M, Matsumoto T, Morimoto R, et al: A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17923-8, 2005
42. Nies AT, Koepsell H, Damme K, et al: Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. *Handb Exp Pharmacol*:105-67

43. Roepe PD: The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? *J Membr Biol* 166:71-3, 1998
44. Danziger-Isakov L, Mark Baillie G: Hematologic complications of anti-CMV therapy in solid organ transplant recipients. *Clin Transplant* 23:295-304, 2009
45. Kalil AC, Mindru C, Florescu DF: Effectiveness of valganciclovir 900 mg versus 450 mg for cytomegalovirus prophylaxis in transplantation: direct and indirect treatment comparison meta-analysis. *Clin Infect Dis* 52:313-21, 2011
46. Wiltshire H, Paya CV, Pescovitz MD, et al: Pharmacodynamics of oral ganciclovir and valganciclovir in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 79:1477-83, 2005
47. Adachi M, Sampath J, Lan LB, et al: Expression of MRP4 confers resistance to ganciclovir and compromises bystander cell killing. *J Biol Chem* 277:38998-9004, 2002
48. Abla N, Chinn LW, Nakamura T, et al: The human multidrug resistance protein 4 (MRP4, ABCC4): functional analysis of a highly polymorphic gene. *J Pharmacol Exp Ther* 325:859-68, 2008
49. Mahony WB, Domin BA, Zimmerman TP: Ganciclovir permeation of the human erythrocyte membrane. *Biochem Pharmacol* 41:263-71, 1991
50. Gentile S, Jouve E, Dussol B, et al: Development and validation of a French patient-based health-related quality of life instrument in kidney transplant: the ReTransQoL. *Health Qual Life Outcomes* 6:78, 2008
51. Moher D, Hopewell S, Schulz KF, et al: CONSORT 2010 Explanation and Elaboration: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *J Clin Epidemiol* 63:e1-37, 2010
52. Cascorbi I: P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. *Handb Exp Pharmacol*:261-83, 2011

53. Park SY, Lee W, Lee J, et al: Combination gene therapy using multidrug resistance (MDR1) gene shRNA and herpes simplex virus-thymidine kinase. *Cancer Lett* 261:205-14, 2008
54. Oevermann L, Scheitz J, Starke K, et al: Hematopoietic stem cell differentiation affects expression and function of MRP4 (ABCC4), a transport protein for signaling molecules and drugs. *Int J Cancer* 124:2303-11, 2009
55. Karla PK, Quinn TL, Herndon BL, et al: Expression of multidrug resistance associated protein 5 (MRP5) on cornea and its role in drug efflux. *J Ocul Pharmacol Ther* 25:121-32, 2009
56. Giraud C, Manceau S, Decleves X, et al: Influence of development, HIV infection, and antiretroviral therapies on the gene expression profiles of ABC transporters in human lymphocytes. *J Clin Pharmacol* 50:226-30, 2010
57. Wang X, Furukawa T, Nitanda T, et al: Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Mol Pharmacol* 63:65-72, 2003
58. Engler JR, Zannettino AC, Bailey CG, et al: OCT-1 function varies with cell lineage but is not influenced by BCR-ABL. *Haematologica* 96:213-20, 2011
59. Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, et al: Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport. *J Pharmacol Exp Ther* 300:918-24, 2002
60. Owen RP, Badagnani I, Giacomini KM: Molecular determinants of specificity for synthetic nucleoside analogs in the concentrative nucleoside transporter, CNT2. *J Biol Chem* 281:26675-82, 2006
61. Redell MS, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, et al: Conditional overexpression of Stat3alpha in differentiating myeloid cells results in neutrophil expansion and induces a distinct, antiapoptotic and pro-oncogenic gene expression pattern. *J Leukoc Biol* 82:975-85, 2007
62. Hyde RJ, Cass CE, Young JD, et al: The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the

investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. *Mol Membr Biol* 18:53-63, 2001

63. Molina-Arcas M, Bellosillo B, Casado FJ, et al: Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 101:2328-34, 2003

64. Young JD, Yao SY, Sun L, et al: Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins. *Xenobiotica* 38:995-1021, 2008

65. Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, et al: The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch* 447:735-43, 2004

66. Morgan NV, Morris MR, Cangul H, et al: Mutations in SLC29A3, encoding an equilibrative nucleoside transporter ENT3, cause a familial histiocytosis syndrome (Faisalabad histiocytosis) and familial Rosai-Dorfman disease. *PLoS Genet* 6:e1000833, 2010

67. Woodahl EL, Crouthamel MH, Bui T, et al: MDR1 (ABCB1) G1199A (Ser400Asn) polymorphism alters transepithelial permeability and sensitivity to anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 64:183-8, 2009

68. Sainz J, Rudolph A, Hein R, et al: Association of genetic polymorphisms in ESR2, HSD17B1, ABCB1, and SHBG genes with colorectal cancer risk. *Endocr Relat Cancer* 18:265-76, 2011

69. Eechoute K, Sparreboom A, Burger H, et al: Drug transporters and imatinib treatment: implications for clinical practice. *Clin Cancer Res* 17:406-15, 2011

70. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, et al: A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315:525-8, 2007

71. Miura M, Satoh S, Tada H, et al: Influence of ABCB1 C3435T polymorphism on the pharmacokinetics of lansoprazole and gastroesophageal symptoms in Japanese renal transplant recipients classified as CYP2C19 extensive metabolizers and treated with tacrolimus. *Int J Clin Pharmacol Ther* 44:605-13, 2006

72. Ansari M, Sauty G, Labuda M, et al: Polymorphisms in multidrug resistance-associated protein gene 4 is associated with outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 114:1383-6, 2009
73. Tamura A, Watanabe M, Saito H, et al: Functional validation of the genetic polymorphisms of human ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2: identification of alleles that are defective in porphyrin transport. *Mol Pharmacol* 70:287-96, 2006
74. Ahlin G, Chen L, Lazorova L, et al: Genotype-dependent effects of inhibitors of the organic cation transporter, OCT1: predictions of metformin interactions. *Pharmacogenomics J* 11:400-11, 2011
75. Shu Y, Brown C, Castro RA, et al: Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1, OCT1, on metformin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 83:273-80, 2008
76. Yee SW, Shima JE, Hesselson S, et al: Identification and characterization of proximal promoter polymorphisms in the human concentrative nucleoside transporter 2 (SLC28A2). *J Pharmacol Exp Ther* 328:699-707, 2009
77. Doehring A, Hofmann WP, Schlecker C, et al: Role of nucleoside transporters SLC28A2/3 and SLC29A1/2 genetics in ribavirin therapy: protection against anemia in patients with chronic hepatitis C. *Pharmacogenet Genomics* 21:289-96, 2011
78. Myers SN, Goyal RK, Roy JD, et al: Functional single nucleotide polymorphism haplotypes in the human equilibrative nucleoside transporter 1. *Pharmacogenet Genomics* 16:315-20, 2006
79. Janoly-Dumenil A, Rouvet I, Bleyzac N, et al: Effect of duration and intensity of ganciclovir exposure on lymphoblastoid cell toxicity. *Antivir Chem Chemother* 19:257-62, 2009
80. Kotrych K, Sulikowski T, Domanski L, et al: Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in renal transplant patients treated with cyclosporin A in a Polish population. *Pharmacol Rep* 59:199-205, 2007

81. Tahbaz N, Subedi S, Weinfeld M: Role of polynucleotide kinase/phosphatase in mitochondrial DNA repair. *Nucleic Acids Res* 40:3484-95

# SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté 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, 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 les actes criminels.

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

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

**Résumé :** La transplantation rénale est indiquée chez les personnes souffrant d'insuffisance rénale terminale. Elle nécessite un traitement immunosuppresseur favorable au développement d'infections opportunistes telles que les infections à cytomégalovirus. Cette infection est responsable d'une diminution de la durée de vie du greffon par augmentation du risque de fibrose, de rejet aigu et de rejet chronique. Les molécules utilisées en première intention en prévention ou en curatif sont le Ganciclovir et sa prodrogue administrée par voie orale : le Valganciclovir.

La neutropénie est l'effet indésirable du GCV le plus fréquent. Elle survient le plus fréquemment au cours des deux premières semaines de traitement. Cette toxicité hématologique peut conduire à l'arrêt du traitement ou à la diminution des doses ce qui peut aboutir à l'émergence d'une résistance virale et un échec au traitement. L'identification des facteurs de prédisposition à la toxicité du GCV pourrait permettre d'améliorer l'efficacité de ce médicament notamment chez les patients transplantés.

La pharmacogénétique décrit l'influence des variations dans la séquence d'ADN sur la réponse individuelle aux médicaments. Elle est particulièrement centrée sur l'étude du devenir du médicament dans l'organisme par l'étude des transporteurs ou des enzymes impliquées dans le métabolisme du médicament.

Dans ce contexte, l'équipe Inserm UMR-S850 a élaboré récemment un projet intitulé Pharmacogénétique du traitement prophylactique des infections à cytomégalovirus par valGanciclovir chez les transplantés rénaux (P2G).

**Mots-Clefs :** Cytomégalovirus, Ganciclovir, Valganciclovir, Pharmacogénétique, Transporteurs ABC, Transporteurs SLC