



Thèse pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Limoges  
Discipline / Spécialité : Sciences du médicament

Présentée et soutenue par  
**Pierre-André BILLAT**

Le 2 octobre 2015

**Relations exposition-toxicité et pharmacogénétique du ganciclovir chez le patient transplanté rénal**

Thèse codirigée par Nicolas PICARD et Franck SAINT-MARCOUX

JURY :

**Président du jury**

M. [Prénom Nom, grade, laboratoire, établissement de rattachement]

**Rapporteurs**

Mme. Christine FERNANDEZ, PU-PH (Université Paris Sud)

M. Vincent HAUFROID, PU-PH (Université catholique de Louvain)

**Examineur**

Mme. Sophie ALAIN, PU-PH (Université de Limoges)

**Directeurs de Thèse**

M. Nicolas PICARD, PU-PH (Université de Limoges)

M. Franck SAINT-MARCOUX, PU-PH (Université de Limoges)



## Remerciements

---

### **A Madame le Professeur Christine FERNANDEZ**

Je suis très honoré que vous ayez accepté de juger ce travail de doctorat. Vos travaux sur la pharmacocinétique intracellulaire des immunosuppresseurs et vos connaissances en pharmacologie et sciences du médicament en général enrichiront sans nul doute ce manuscrit. Votre intérêt dans ce travail me touche profondément.

### **A Monsieur le Professeur Vincent HAUFROID**

Je suis très touché de l'honneur que tu me fais en acceptant de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Je garde un excellent souvenir de notre rencontre dans des conditions privilégiées au congrès de l'IATDMCT à Salt Lake City. Je te remercie pour ta présence dans ce jury. Sois assuré de tout mon respect et de toute mon estime.

### **A Madame le Professeur Sophie ALAIN**

Merci Sophie pour m'avoir enseigné les rudiments de la culture virale et pour votre gentillesse. J'espère sincèrement pouvoir continuer à travailler en collaboration avec vous. Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de siéger, à nouveau, au sein de mon jury de thèse. Soyez assurée de ma plus profonde gratitude et mon profond respect.

### **A Messieurs les Professeurs Nicolas PICARD et Franck SAINT-MARCOUX**

Merci à vous deux de m'avoir accordé votre confiance en m'acceptant comme étudiant, respectivement de Master, de thèse d'exercice et enfin de thèse de Sciences. J'ai pu apprécier vos précieux conseils, votre gentillesse et votre disponibilité. J'ai pris beaucoup de plaisir à apprendre et travailler avec vous et j'espère pouvoir longtemps continuer ainsi.

### **A 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 et de toute mon estime.

Un grand merci à mes amis et collègues

## **Merci à toute l'unité Inserm UMR-S850**

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 François-Ludovic pour ta rigueur, ta culture et ta maîtrise de la LC-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 Alexandre, Annick, Aurélie, Bastien « BB Urat ou *Le magasinier* », Benjamin « le petit nain » (et surtout sa maman qui nous faisait des gateaux), Claire, Danko, Emilie, Elodie, Florent, Hélène, James, Jana, Lucie « Big Poupou », Lynn, Marie, Patricia, Patrick, Seboubou Pusseron, Tahani, Val, Zeinab et au *petit lutin glouton du labo* pour tous ces bons moments passés dans l'unité.

## **Un grand merci à mes amis de plus longue date**

A Colin, le « *petit poisson pas né* », mon filleul et à ses parents, Thomas et Claire, pour toutes les soirées jeux de société-BBQ-garderie.

A Gabin et Gaëlle pour leur amitié fidèle et sincère depuis des années.

A Charlie, Julien et Célia pour les séjours passés à parcourir l'occitanie.

A Guillaume pour nos parties de pêche et de cartes à Cieux.

A mes amis du club d'échecs.

A mes abeilles, qui feraient mieux de bosser plutôt que de me piquer.

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

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

Merci à Mathilde

Pour ton soutien, ta patience et ton amour.

## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Table des matières

---

Abréviations .....	9
Introduction .....	11
Objectifs .....	13
Chapitre I. Le Ganciclovir, traitement de référence de l'infection par le Cytomégalovirus .....	14
I.1. Le Cytomégalovirus .....	14
I.1.1. Virus & structure .....	14
I.1.2. Réplication .....	15
I.1.3. Epidémiologie .....	16
I.1.4. Physiopathologie .....	17
I.1.4.1 Infection chez l'immunocompétent .....	18
I.1.4.2 Infection congénitale .....	18
I.1.4.3 Patient transplanté et immunodéprimé .....	19
I.1.5. Diagnostic .....	19
I.1.5.1 Direct .....	19
I.1.5.2 Indirect .....	20
I.2. Les traitements .....	20
I.2.1. Les traitements préventifs .....	20
I.2.1.1 Le traitement prophylactique .....	21
I.2.1.2 Le traitement préemptif .....	21
I.2.2. Les traitements curatifs .....	22
I.2.2.1 Ganciclovir & Valganciclovir .....	22
I.2.2.1.1. Structures .....	22
I.2.2.1.2. Formes thérapeutiques .....	23
I.2.2.1.3. Pharmacodynamie .....	23
I.2.2.1.4. Pharmacocinétique .....	26
I.2.2.1.5. Contre-Indications .....	28
I.2.2.1.6. Effets indésirables .....	28
I.2.2.1.7. Interactions médicamenteuses .....	28
I.2.2.2 Autres antiviraux .....	29
I.2.2.2.1. L'aciclovir (spécialité Zovirax®) .....	29
I.2.2.2.2. Le foscarnet (spécialité Foscavir®) .....	29
I.2.2.2.3. Le cidofovir (spécialité Vistide®) .....	30
I.2.2.2.4. Le fomivirsén (spécialité Vitravene®) .....	31
I.2.2.2.5. Les immunoglobulines .....	31
I.2.2.2.6. Les molécules les plus récentes .....	31
I.3. Les résistances virales au GCV .....	34
I.3.1. Prévalence .....	35

I.3.2. Les mutations principales .....	35
I.3.2.1 UL97 .....	35
I.3.2.2 UL54 .....	36
I.3.3. Traitement du CMV résistant .....	36
Chapitre II. Travaux personnels.....	38
II.1. Exploration des relations entre les marqueurs d'exposition au GCV et la toxicité hématologique .....	39
II.1.1. Mise au point d'une méthode de dosage des formes intracellulaires du GCV .....	39
II.1.2. Etudes des relations entre marqueurs d'exposition et toxicité.....	49
II.2. Etude d'association entre l'influence des polymorphismes de protéines de transport sur la survenue des effets indésirables hématologiques du ganciclovir en transplantation rénale .....	72
II.2.1. Contexte et objectif.....	72
II.2.2. Methodologies mises en œuvre dans ce travail .....	73
II.2.2.1 Le génotypage par PCR en temps réel Taqman® .....	73
II.2.2.2 Le séquençage post PCR de type Sanger. ....	75
II.2.3. Pharmacogènes étudiés .....	78
II.2.3.1 Classification des grandes familles de transporteurs.....	78
II.2.3.1.1. Les SLC.....	78
II.2.3.1.2. Les ABC .....	80
II.2.3.2 Les transporteurs du GCV.....	80
II.2.4. Etude d'association entre des polymorphismes de transporteurs et la toxicité hématologique du GCV .....	82
Chapitre III. Discussion et Perspectives .....	123
Références bibliographiques .....	129

## Table des illustrations

---

Figure 1: Présentation succincte du génome du CMV d'après Sijmon et al 2014(15) .....	15
Figure 2: Modèle de l'infection et de la dissémination du CMV chez l'hôte (D'après Smith et al.(33)).....	18
Figure 3: Valganciclovir (gauche) et Ganciclovir (droite).....	23
Figure 4: Pharmacodynamie du Valganciclovir .....	25
Figure 5: Structure de l'aciclovir.....	29
Figure 6: Structure du foscarnet .....	30
Figure 7: Structure du cidofovir.....	30
Figure 8: Structure du maribavir .....	31
Figure 9: Structure de l'artésunate.....	32
Figure 10: Structure du cyclopropavir .....	32
Figure 11: Structure du létermovir .....	33
Figure 12: Structure du brincidofovir.....	33
Figure 13: Synthèse des mécanismes d'action des principaux antiviraux .....	34
Figure 14: Arbre décisionnel du traitement du CMV résistant d'après Kotton et al. (43).....	37
Figure 15 : Résultat de génotypage de 96 patients sur ABI Prism 7000® du SNP c.-840G>A au niveau du gène UGT2B7 .....	75
Figure 16: Exemple de résultat de pyroséquençage d'une partie exonique du gène SLC22A1 (séquence de référence) .....	77

## Liste des tableaux

---

Tableau 1 Comparaison entre les traitements prophylactiques et préemptifs d'après Kotton et al. (43).....	21
Tableau 2: Posologies conseillées des traitements par antiviraux selon l'état de la fonction rénale .....	27
Tableau 3: Principales familles de gènes des transporteurs d'intérêt.....	81



## Abréviations

---

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 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

LC-MS/MS = chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

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  
PD = Pharmacodynamie  
PG = Pharmacogénétique  
P-gp = P-glycoprotéine  
PK = Pharmacocinétique  
PMEA = 9-(2-phosphonylméthoxyéthyl)adénine  
PMEG = 9-(2-phosphonylméthoxyéthyl)guanine  
po = Per os  
POPPK = Pharmacocinétique de population  
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  
SPE = Phase d'extraction solide  
SVF = Sérum de veau fœtal  
TRL = Terminal Repeat Long  
TRS = Terminal Repeat Short  
VGCV = Valganciclovir

## Introduction

---

En 1952, la découverte du système HLA a permis de mieux comprendre les systèmes de reconnaissance du soi et du non-soi et de permettre, en 1954, la première greffe rénale réussie entre deux jumeaux.

Pour autant, la transplantation rénale favorise l'induction d'une réponse immunitaire pouvant amener à trois types de rejet : le rejet hyper aigu, le rejet aigu cellulaire et la néphropathie d'allogreffe. La mise en place de traitements immunosuppresseurs permet de limiter ces risques. Dès 1956, sont apparus 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 2013, en France, l'Agence de la Biomédecine estime à 5123 le nombre de greffes effectuées, dont 3074 pour le rein (pour 9869 patients en attente d'une greffe de rein).

Ces patients transplantés, soumis à un traitement immunosuppresseur, présentent un terrain immunodéprimé, proie d'infections opportunistes. Parmi elles, l'infection à cytomégalo virus (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+)) (1).

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 ainsi qu'une augmentation de la morbidité et de la mortalité du patient par augmentation du risque de coïnfections opportunistes (notamment par le virus d'Epstein-Barr ou EBV), de diabète type 2 post-transplantation et de maladies cardiovasculaires (2).

Il est donc nécessaire de mettre en place une stratégie thérapeutique prophylactique et, parfois, thérapeutique. Les molécules utilisées en première intention sont **le ganciclovir (GCV) et sa prodrogue** administrée par voie orale : **le valganciclovir (VGCV)**.

Le GCV est un nucléoside synthétique, analogue de la 2-déoxy-guanosine. Proche structurellement de l'aciclovir, il est néanmoins beaucoup plus efficace que ce dernier sur le CMV. Dans la cellule le GCV est principalement phosphorylé par des enzymes virales. Il inhibe préférentiellement l'ADN-polymérase virale, par rapport à celle de l'hôte (3).

En plus d'inhiber l'ADN polymérase virale UL54, le GCV triphosphorylé va également pouvoir intégrer l'ADN viral bloquant alors sa synthèse. Les molécules partageant cette propriété sont appelées « terminateurs de chaîne ».

Les effets indésirables les plus fréquents (retrouvés chez plus d'un patient sur 10) sont les suivants : **neutropénie**, anémie, dyspnée, diarrhée. Ceci 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 de résistances virales et à un échec du traitement.**

Aujourd'hui, il est extrêmement difficile d'anticiper l'apparition d'une toxicité chez les patients. Une faible corrélation a été retrouvée entre l'exposition plasmatique au GCV et le risque de toxicité, cette dernière pouvant se manifester chez des personnes avec une faible exposition au GCV (4).

Le métabolisme intracellulaire du GCV est quant à lui encore mal connu. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse, notamment, **que le niveau d'accumulation intracellulaire du GCV ou d'un de ses métabolites pourrait être un facteur de risque de toxicité.**

## Objectifs

---

Ce travail de thèse avait pour objectif d'étudier les relations exposition-toxicité et la pharmacogénétique du GCV chez le patient transplanté. Des travaux ont été menés pour permettre l'étude du métabolisme intracellulaire, du transport transmembranaire et des relations entre les différents métabolites du GCV et sa toxicité hématologique. Ces recherches ont été effectuées au sein de **l'unité mixte de recherche (UMR) Inserm S850 de « Pharmacologie des immunosuppresseurs et de la transplantation »**.

Dans un premier temps, nous avons développé des outils permettant la recherche et le dosage des entités du métabolisme intracellulaire du GCV.

Dans un second temps, nous avons appliqué cette méthode à une cohorte de patients transplantés rénaux dont les données ont été modélisées pour explorer les relations exposition-toxicité.

Parallèlement, nous avons mené des travaux ayant trait à la pharmacogénétique du GCV. Le fil conducteur était la recherche de variations génétiques au sein de transporteurs membranaires impliquées dans l'accumulation intracellulaire du GCV. Plus précisément, l'objectif était d'identifier les transporteurs d'influx ou d'efflux pouvant prendre en charge le GCV et d'isoler des variants génétiques pouvant entraîner une modification de ce transport.

## Chapitre I. Le Ganciclovir, traitement de référence de l'infection par le Cytomégalovirus

---

Les cytomégalovirus (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 (qui comprennent également le Muromégalovirus et le Roséolovirus) sont tous caractérisés par une phase de latence dans les leucocytes, les glandes sécrétoires et le rein (5), et une étroite spécificité d'hôte. Ils entraînent également une lyse cellulaire lors de leur réplication (6).

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 cette « cytomégalie » pourrait être liée, du fait de la similitude des lésions, à un agent proche de celui de la varicelle ; ce qui remettait en doute l'hypothèse de l'existence d'un protozoaire soutenue jusqu'alors. 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, de lui donner le nom de cytomégalovirus (7).

Le CMV humain : hCMV est aussi appelé herpesvirus humain 5 (HHV5) selon la nomenclature officielle définie par l' « *International Committee on Taxonomy of Viruses* » (8). La première partie de cette thèse fait appel à un nombre important de références bibliographiques que l'on peut retrouver dans l'ouvrage *Fields' Virology* 5<sup>ème</sup> édition volume 2 aux éditions Wolters Kluwer Health (9).

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

### I.1. Le Cytomégalovirus

#### I.1.1. Virus & structure

Le virion mature du CMV mesure entre 200 et 300nm de diamètre (10). Il possède un ADN double brin linéaire, séquencé dans le cas de la souche de référence du CMV AD169 (11–13) (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 contenir 166 gènes(14). On retrouve deux segments distincts du génome : un fragment long  $U_L$  (82% du génome) et un fragment court  $U_S$ . Chaque segment est muni à ses extrémités de séquences répétées : Terminal Repeat Long (TRL), Internal Repeat Long (IRL), Internal Repeat Short (IRS) et Terminal Repeat Short (TRS). La figure ci-dessous présente la disposition de ces gènes (Figure 1).

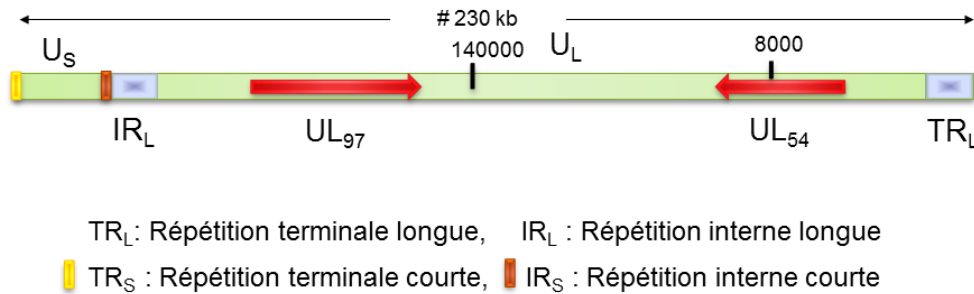


Figure 1: Présentation succincte du génome du CMV d'après Sijmon et al 2014(15)

Tout ce matériel est contenu dans une capsule icosaédrique de 125 nm de diamètre, elle-même incorporée à l'intérieur d'une matrice appelée tégment, comportant au moins 27 glycoprotéines pour la plupart phosphorylantes (16) qui jouent 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 de son activation** (17). Ce tégment peut être entouré par du réticulum endoplasmique ou par le compartiment intermédiaire de l'appareil de Golgi de la cellule hôte.

### I.1.2. Réplication

Le CMV ne se réplique que dans les cellules humaines et code environ pour 60 glycoprotéines (18). 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 (19), 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 (UL47 et UL48) et translocation vers le noyau (20). 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 successives :

- **Une phase 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 (21), de supprimer les messages des transducteurs du signal et des activateurs de la transcription de la cellule (22). 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 précoce** débutant environ 6 heures après l'infection et durant 18 à 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 (23). 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 bien décrite, 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 nucléocapsid (24). Des protéines du tégument en association avec des protéines non structurales permettent la libération du complexe dans le cytoplasme autour de la 48ème 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).

### I.1.3. Epidémiologie

Les humains sont les seuls réservoirs du CMV. Ce virus étant très fragile, **la contamination s'effectue par contact interindividuel direct ou indirect**. 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. La période d'excrétion est connue pour être plus longue après contamination congénitale, périnatale ou post-natale ; ceci explique le fait que les nourrissons soient un des plus grands réservoirs de virus contaminant (25). L'infection est endémique et ancienne dans la population mondiale : Le CMV humain a été 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 (26). On sait également que des



indices socioéconomiques faibles prédisposent à un taux d'infection plus important : la prévalence de l'infection est de 50% en France, environ 70% aux Etats-Unis et supérieure à 90% dans les pays en voie de développement. Elle est plus importante chez la femme que chez l'homme (27). L'âge du premier contact dépend bien entendu du lieu de vie et des conditions socioéconomiques des parents.

L'incubation du virus dure entre 20 et 40 jours, mais varie selon le mode de contamination : elle est beaucoup plus rapide après transfusion sanguine ou accouchement.

#### **I.1.4. Physiopathologie**

Lors de l'entrée du virus dans la cellule, celle-ci commence à sécréter des interférons et perd sa capacité à entrer en apoptose (28). Puis, la cellule sécrète des protéines virales et perd sa structure cytosquelettique. En microscopie optique, **on observe typiquement un ballonnement** avec, à titre d'exemple, des fibroblastes qui adoptent une conformation en banc de poissons. Finalement, **la multiplication du virus fait mourir la cellule hôte par éclatement**.

L'immunité non spécifique est 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 prend le relai avec la production d'immunoglobulines M (IgM). Le rôle prépondérant des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> permet d'entrevoir l'importance de cette pathologie chez les patients immunodéprimés et plus spécifiquement les sidéens (29).

**Le CMV a la faculté de rester latent dans l'organisme.** Si sa répartition et sa possibilité d'infecter tous les tissus est effective, il n'a été retrouvé à l'état latent que dans les monocytes et les progéniteurs CD34<sup>+</sup> de la moelle osseuse (30). La réactivation virale étant périodique chez l'immunocompétent, elle rend le **virus temporairement transmissible**.

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 (31). **L'immunité au CMV ne permet pas d'éviter la réinfection**, mais elle semble limiter les accès aigus chez les immunocompétents et même chez les immunodéprimés (32). Un modèle de la dissémination du CMV, tel que proposé par Smith et al (33) est présenté en figure 2.

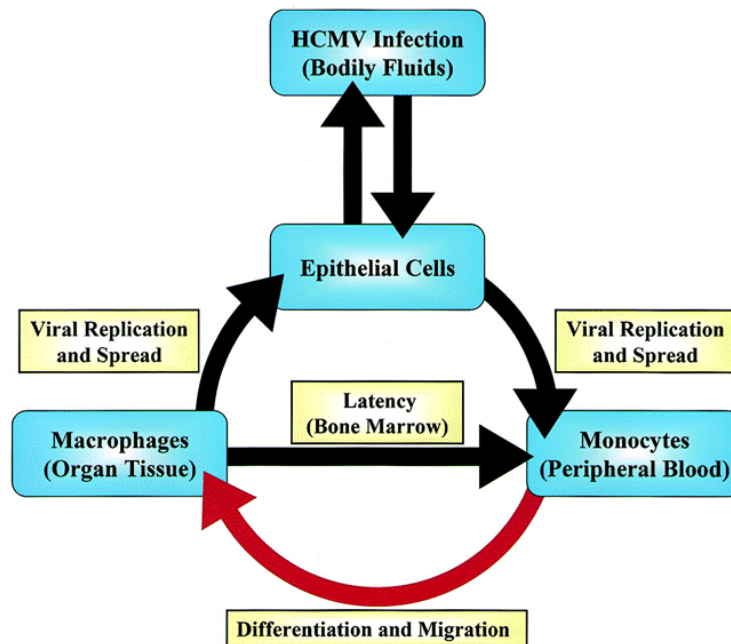


Figure 2: Modèle de l'infection et de la dissémination du CMV chez l'hôte (D'après Smith et al.(33))

#### I.1.4.1 Infection chez l'immunocompétent

Dans la majorité des cas, la **primo-infection par le CMV est silencieuse** du point de vue clinique. On peut toutefois retrouver des symptômes viraux non spécifiques pouvant faire penser à une mononucléose. L'infection est rapidement maîtrisée par le système immunitaire en 2 à 3 semaines, mais très rarement des manifestations graves telles que des méningites peuvent survenir. 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 (34). La latence du virus est ensuite garantie par l'immunité cellulaire.

#### I.1.4.2 Infection congénitale

C'est la première cause d'infection congénitale en Europe de l'ouest. Elle concerne 0,4 à 2,3% des nouveau-nés (35–37). Elle est responsable de malformations et de retards mentaux chez le nouveau-né et notamment du **SNHL** (*Sensorineural hearing loss*)(38).

**L'infection du placenta a lieu lors d'un pic de virémie chez la mère.** Le fœtus est ensuite 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 avec une atteinte pluriviscérale, notamment au niveau d'organes vitaux, une microcéphalie, une hépatosplénomégalie, un ictère, une thrombopénie, des convulsions, etc.

Le décès survient dans 1 cas sur 5, voire dans 1 cas sur 3 pour les fœtus de moins de 1 mois (39). Des troubles neurosensoriels sont observés chez 80-90% des survivants.

#### **I.1.4.3 Patient transplanté et immunodéprimé**

Le CMV est l'un des agents opportunistes les plus répandus. Ceci impacte bien entendu la prise en charge du patient transplanté.

Il se manifeste par réactivation du virus latent, par infection primaire ou par réinfection. La sévérité de l'infection dépend du niveau de l'immunodépression. On peut retrouver une fièvre et une neutropénie, mais également des atteintes graves d'organes se traduisant par des hépatites, des pneumonies, des gastrites et colites, des 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. Elles se manifestent deux fois plus fréquemment lors de transplantations combinées (rein-pancréas, par exemple) (40). L'allogreffe de moelle est considérée comme la transplantation la plus à risque avec près de 60% de complication infectieuse chez le receveur déjà porteur (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-) (41).

#### **I.1.5. Diagnostic**

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

##### **I.1.5.1 Direct**

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°C. Les cellules à inoculer sont le plus souvent dans des flasques de culture de 25cm<sup>2</sup> contenant une couche confluente de cellules MRC5 ou 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<sup>-1</sup> à 10<sup>-4</sup> pour un volume minimal de 500µL avec un anticorps monoclonal E-13 en immuno-peroxydase (IP). On peut également compter le nombre de foyers infectieux par microscopie optique.

Une méthode immunologique par immunofluorescence (IF) ou IP peut également révéler, 1 à 2 jours après l'inoculation, l'infection des cellules ; bien avant l'apparition de tout effet cytopathologique directement sur les cellules en culture. 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® (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.

Pour le diagnostic d'une infection active dans des milieux aqueux (LCR, humeur aqueuse, liquide amniotique...), on préfère effectuer des PCR. Celles-ci détectent rapidement, spécifiquement et sensiblement les séquences virales spécifiques. Le fonctionnement de la PCR est détaillé brièvement dans la partie II.2.1.3. La PCR dans le sang, pour recherche et quantification d'ADN viral, tend actuellement à remplacer la recherche de l'antigénémie.

### **I.1.5.2 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, c'est-à-dire de la force de liaison entre les antigènes et les anticorps, qui permet d'éliminer éventuellement une infection récente.

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

## **I.2. Les traitements**

### **I.2.1. Les traitements préventifs**

Les stratégies préventives ont significativement diminué l'incidence des maladies à CMV chez les patients transplantés.

A l'heure actuelle, il existe 2 grandes stratégies : (i) le traitement prophylactique (stricto sensu) qui consiste à administrer le traitement de référence, le plus souvent à doses réduites sans connaître le statut infectieux du patient ; (ii) le traitement préemptif qui est lui administré dès lors que le virus est détecté, avant les signes d'atteinte viscérale.

Si le choix de la stratégie reste ouvert chez un patient à risque moyen (D+ ou D-/R+), il est en revanche habituel (i) de mettre les patients à haut risque sous traitement prophylactique (D+/R-) et (ii) de ne pas introduire de traitement antiviral chez les patients à risque réduit (D-/R-).

### I.2.1.1 Le traitement prophylactique

Il peut être administré à tous les patients, qu'ils soient à haut risque ou non. Le traitement débute en général avant la transplantation, ou juste après, pour une période de 3 à 6 mois. Les antiviraux principaux sont le GCV par voie orale (de plus en plus rarement) et le VGCV.

### I.2.1.2 Le traitement préemptif

Un suivi régulier de la charge virale permet de détecter la reprise de la réplication virale. Lorsque cette réplication atteint le seuil de détection, on initie le traitement par GCV. Cette stratégie est contraignante car elle nécessite un suivi très régulier des patients, des interprétations rapides des analyses et le cas échéant une mise sous traitement sans délai. En effet, chez les patients D+/R-, le doublement de la charge virale peut intervenir en 1.54 jour (0.55-5.5) contre 2.67 jours (0.27-26.7) chez le patient (R+)(42).

Ces deux approches sont comparées dans le tableau suivant.

Tableau 1 Comparaison entre les traitements prophylactiques et préemptifs d'après Kotton et al. (43)

	<b>Prophylaxie</b>	<b>Préemptif</b>
<b>ADNémie du CMV précoce</b>	Rare	Courant
<b>Prévention des maladies à CMV</b>	Bonne efficacité	Bonne efficacité (moins optimale chez les patients à risque)
<b>Activation tardive</b>	Courant	Rare
<b>Résistances virales</b>	Occasionnel	Occasionnel
<b>Mise en place</b>	Assez facile	Complexe
<b>Autres herpes virus</b>	Prévient HSV, VZV	Pas de prévention
<b>Autres infections opportunistes</b>	Pourrait prévenir	Inconnu
<b>Coût</b>	Traitement VGCV	Monitoring
<b>Sécurité</b>	Effets indésirables du GCV	Diminution de la toxicité

Par effet indirect, les deux approches améliorent la survie du greffon et la prévention du rejet par réduction du nombre de copies du virus.

The *Transplantation Society International CMV Consensus Group* laisse le choix de la stratégie à employer à l'exception des greffes de pancréas, d'intestin ainsi que de zones très irriguées comme la face ou la main, pour lesquelles on doit privilégier le traitement prophylactique (par manque de données sur l'efficacité de l'approche préemptive).

En traitement prophylactique, le consensus prévoit, chez les patients à haut risque, une administration prophylactique de 3 à 6 mois pour les transplantés hépatiques, cardiaques et pancréatiques, d'au moins 6 mois pour les transplantés rénaux et de 6 à 12 mois pour les patients ayant subi une greffe pulmonaire. Chez les patients R+, ces durées sont réduites à 3 mois pour les transplantés rénaux et à 6 mois pour les greffes pulmonaires. Chez les patients à risque faible, le traitement prophylactique n'est pas conseillé.

En traitement préemptif, il est recommandé de surveiller la charge virale toutes les semaines pendant les 3 à 4 mois suivant la transplantation.

Certains centres ont une approche « hybride »: le patient est dans un premier temps traité en prophylaxie pendant 3 mois, au terme desquels sa charge virale est suivie de façon hebdomadaire ou toutes les deux semaines. A ce jour aucune étude ne s'est penchée sur l'efficacité de cette stratégie.

## **I.2.2. Les traitements curatifs**

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 des situations d'immunodépression particulières.

### **I.2.2.1 Ganciclovir & Valganciclovir**

D'après les recommandations du résumé des caractéristiques du produit 2014.

#### **I.2.2.1.1. 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 VCGV sont données dans la figure 3.

### I.2.2.1.2. Formes thérapeutiques

Les spécialités en France du GCV et du VGCV sont le Cymevan<sup>®</sup> et le Rovalcyte<sup>®</sup> ; toutes deux 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). Le VGCV se présente sous forme d'un comprimé pelliculé rose ovale et convexe à 450mg soit 496,3 mg sous forme chlorhydrate disponible en ville (liste I).

### I.2.2.1.3. Pharmacodynamie

Après administration par voie orale, le VGCV (Figure 3, gauche) est rapidement métabolisé en GCV (Figure 3, droite) par des estérases intestinales et hépatiques (44).

GCV et VGCV sont tous les deux des analogues de la 2'-désoxyguanosine. Le GCV est également 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, la pUL97, puis par des kinases cellulaires non spécifiques (45). Ce métabolisme a été mis en évidence dans des cellules infectées par le CMV (Figure 4).

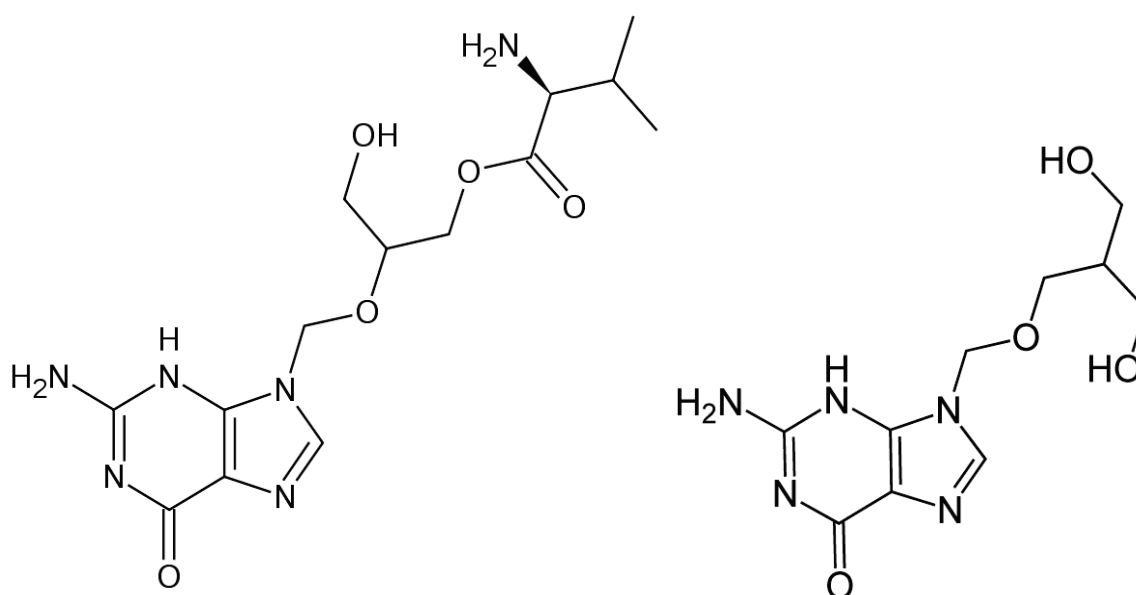


Figure 3: Valganciclovir (gauche) et Ganciclovir (droite)

Le fait d'être phosphorylé par une enzyme virale permet au GCV de cibler préférentiellement 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 (46). Il agit préférentiellement sur l'ADN-polymérase virale UL54 par rapport à celle de l'hôte par inhibition compétitive (3).

L'intégration de GCV-TP bloque alors la synthèse de l'ADN viral provoquant l'arrêt de son élongation, ces molécules sont pour cela appelées « terminateurs de chaîne ».



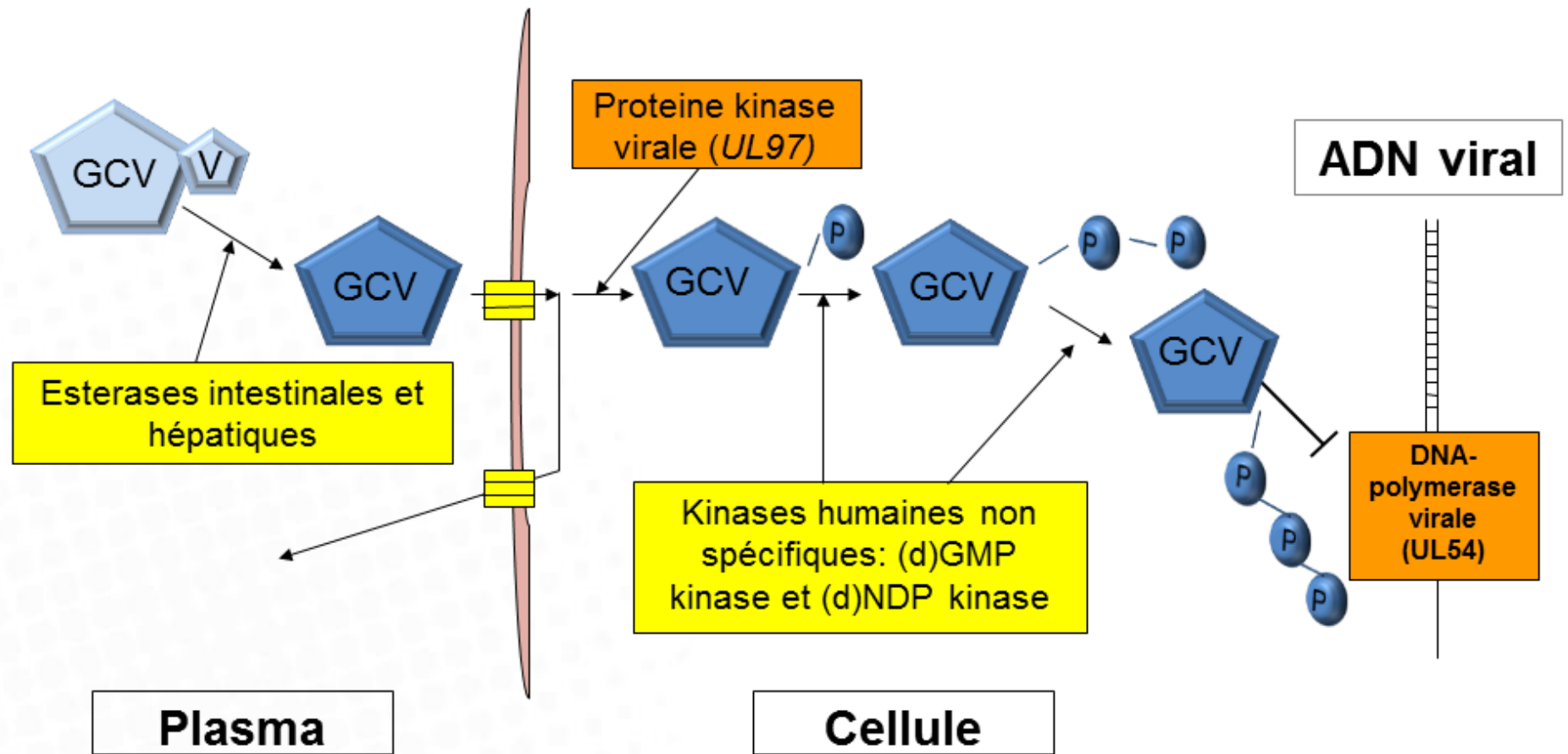


Figure 4: Pharmacodynamie du Valganciclovir

#### I.2.2.1.4. Pharmacocinétique

D'après le résumé des caractéristiques du produit du GCV et VGCV, la liaison du GCV aux protéines plasmatiques est d'environ 2% aux concentrations thérapeutiques. Le volume de distribution du GCV est de 0,680L/kg +/- 0,161 à l'état d'équilibre. Chez un sujet à fonction rénale normale les paramètres d'exposition sont les suivants :

- Le GCV à 5mg/kg i.v. donne une aire sous la courbe (ASC)<sub>0-12h</sub> de 28,6 +/- 9 µg x h/mL et une Cmax de 10,4 +/- 4,9 µg/mL.
- Le VGCV à 900mg p.o. donne des ASC<sub>0-12h</sub> de 32,8 +/- 10,1 µg x h/mL pour le GCV et de 0,37 +/- 0,22 µg x h/mL pour le VGCV et des Cmax de 6,7 +/- 2,1 µg/mL pour le GCV et de 0,18 µg/mL pour le VGCV.

Le GCV n'est pas métabolisé. Son élimination est rénale, par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire active. La clairance rénale représente ainsi 81,5% +/- 22 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 (Tableau 2).

Tableau 2: Posologies conseillées du traitement par antiviraux selon la clairance de la créatinine

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

Ces posologies permettraient d'atteindre une activité antivirale mesurée *in vitro* (CI50) comprise entre 0,08µM et 14µM.

#### **I.2.2.1.5. Contre-Indications**

L'utilisation est 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.

#### **I.2.2.1.6. Effets indésirables**

Une surveillance en début de traitement est nécessaire du fait d'un nombre important d'effets indésirables: neutropénie, anémie, dyspnée, diarrhée.

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, dermatite, 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'une hémodialyse et d'une hydratation.

#### **I.2.2.1.7. 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 glucuronoconjuguées de l'acide mycophénolique, sans impact sur la pharmacocinétique de l'acide mycophénolique. Les effets neutropéniant et leucopéniant des deux molécules sont en revanche à prendre en compte (interaction pharmacodynamique).

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

### I.2.2.2 Autres antiviraux

Ils sont surtout utilisés en second choix. Après la mise sur le marché du GCV en 1989, le foscarnet est apparu en 1991, puis l'aciclovir en 1995 et le cidofovir en 1996. Le VGCV est disponible depuis 2001.

#### I.2.2.2.1. 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 prescrit 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.

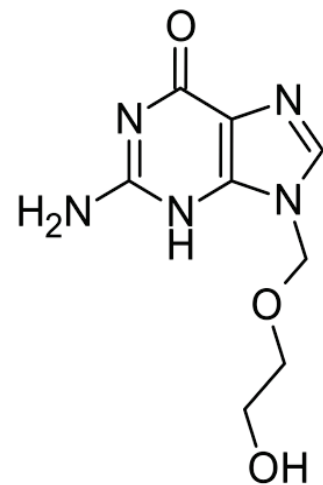


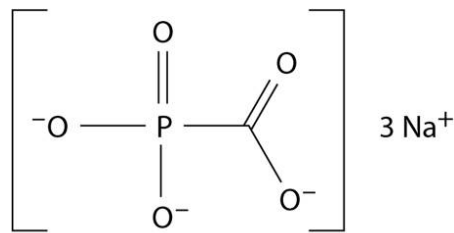
Figure 5: Structure de l'aciclovir

#### I.2.2.2.2. Le foscarnet (spécialité Foscavir®)

Il est indiqué lors du traitement des rétinites à CMV ou des infections mucocutanées à HSV résistantes à l'aciclovir chez les patients sidéens. C'est un antiviral virustatique par inhibition de l'ADN polymérase virale et de la transcriptase inverse des Herpesviridae, par analogie avec le pyrophosphate. Contrairement aux autres antiviraux de cette liste, il n'a pas besoin d'être phosphorylé pour être actif. 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 une toxicité rénale (30%),

des troubles électrolytiques avec hypocalcémie, hypokaliémie, hypomagnésémie, hyper- ou hypo-phosphorémie. Son utilisation est très limitée du fait de l'importance de sa néphrotoxicité. On conseille de donner 750mL à 1L de solution glucosée à 5% avant la première injection et tous les 90 à 120mg/kg de foscarnet. Au total, son utilisation est restreinte aux patients ayant des contre-indications majeures aux GCV.

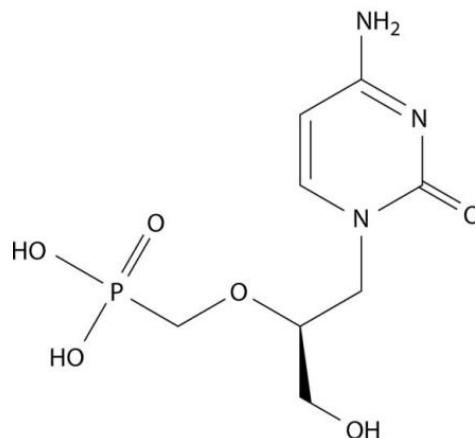
Figure 6: Structure du foscarnet



#### I.2.2.2.3. Le cidofovir (spécialité Vistide®)

C'est un antiviral essentiellement utilisé dans les rétinites à CMV. Il est contre-indiqué chez les insuffisants rénaux. Il n'existe aucune étude justifiant son utilisation chez les patients transplantés. C'est un analogue acyclique de la désoxycytidine monophosphate. Il ne nécessite pas de première phosphorylation par pUL97, de plus ses transformations ultérieures sont catalysées par des kinases cellulaires (47). 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.

Figure 7: Structure du cidofovir



#### I.2.2.2.4. Le fomivirsen (spécialité Vitravene®)

Il est indiqué dans le traitement de la rétinite à CMV chez les patients immunodéprimés sous forme d'implant. C'est un oligonucléotide qui se lie à l'ARN messager IE2 du CMV régulant le cycle de réplication du virus, sa composition est 5'-GCG TTT GCT CTT CTT CTT GCG-3'. L'effet indésirable le plus fréquent est une inflammation de la cornée. Il n'est plus utilisé en France.

#### I.2.2.2.5. Les immunoglobulines

Les préparations d'immunoglobulines anti CMV ont montré leur efficacité vis-à-vis de la glycoprotéine B permettant l'entrée du virus dans la cellule (48). D'autres immunoglobulines sont actuellement en développement ciblant d'autres protéines de fusion (49).

#### I.2.2.2.6. Les molécules les plus récentes

- Le maribavir

C'est un inhibiteur direct de la pUL97 de structure benzimidazole L-riboside. Ce mécanisme peut antagoniser l'effet du GCV. On évitera donc d'associer ces 2 antiviraux. Il montre une bonne biodisponibilité orale (50). Ce traitement a été utilisé avec succès chez les patients infectés par un virus ayant développé une résistance au GCV (51). Le peu de néphrotoxicité du maribavir en fait une bonne alternative au foscarnet, chez les patients résistants ayant des problèmes rénaux. Il a été relevé des effets indésirables tels que des maux de tête et des dysgueusies (52, 53). Bien qu'ayant échoué en phase III en tant que traitement prophylactique (54), il dispose aujourd'hui d'une autorisation temporaire d'utilisation.

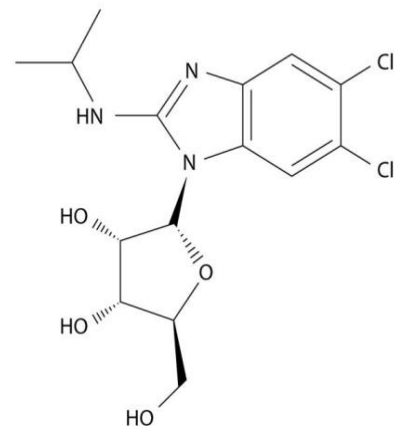


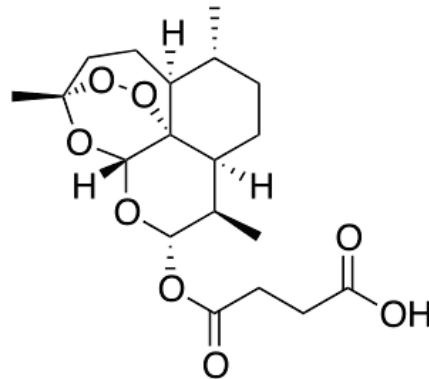
Figure 8: Structure du maribavir

- L'artésunate

Cet antipaludéen a montré une bonne efficacité *in vitro* vis-à-vis du CMV (55). Il n'a pas montré jusqu'alors d'effets indésirables majeurs lors de ses utilisations, ce qui en fait une option intéressante chez les patients infectés (56). Son mécanisme d'action est connu *in*

*in vitro* : il s'agit d'une down-régulation des voies NF- $\kappa$ B et Sp1 (57). Cependant, les quelques études ayant exploré son efficacité *in vivo* rapportent des résultats mitigés (56, 58).

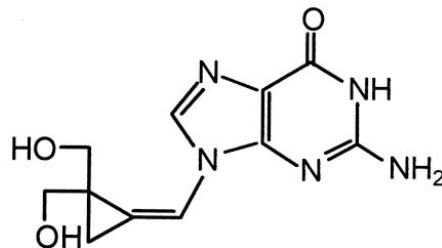
Figure 9: Structure de l'artésunate



- le cyclopropavir (ZSM-I-62)

C'est un analogue méthylènegcyclopropane du GCV. Son efficacité a été montrée *in vitro* sur le CMV, HHV-6A, HHV-6B et HHV-8. Son mécanisme d'action est très proche de celui du GCV et, requiert notamment une phosphorylation par pUL97. Cependant, il possède un profil de résistance différent de celui-ci.

Figure 10: Structure du cyclopropavir

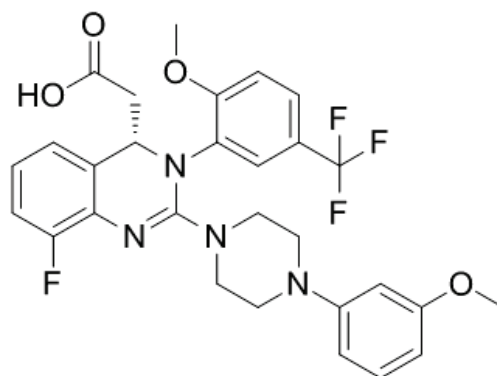


- le létermovir (AIC246)

C'est un inhibiteur de la pUL56 encore appelée terminase impliquée dans le repliement de l'ADN viral dans le nouveau virion (59, 60). Son efficacité a été testée avec succès en phase IIb, en prophylaxie chez des patients ayant reçu une greffe de cellules souches (61). Il peut être administré par voie orale ou *i.v.*. Lors de cette étude il a été bien toléré par les patients, avec en particulier peu de différence dans l'incidence de l'hématotoxicité entre les groupes placebo et létermovir.



Figure 11: Structure du létermovir



- le brincidofovir (CMX001)

Il s'agit de la prodrogue du cidofovir sur laquelle a été greffée une chaîne lipidique. Le brincidofovir est bien mieux absorbé, traverse mieux les membranes et possède une longue demi-vie intracellulaire (62–64). A l'intérieur de la cellule, sa partie lipidique est coupée et il est phosphorylé par les kinases intracellulaires (64). Contrairement au cidofovir, il ne présente pas de néphrotoxicité ou de risque de myélosuppression. En revanche, la diarrhée est un effet indésirable limitant (65). Son efficacité ne semble pas se limiter au CMV. Il semble également actif *in vitro* contre les orthopoxvirus (variole), poliovirus et les adénovirus (66). Son  $IC_{50}$  est 60 à 270 fois plus basse que celle du cidofovir sur les orthopoxvirus et le virus de la variole (67) et de 300 à 400 fois plus basse sur le HSV-1 et le CMV (68).

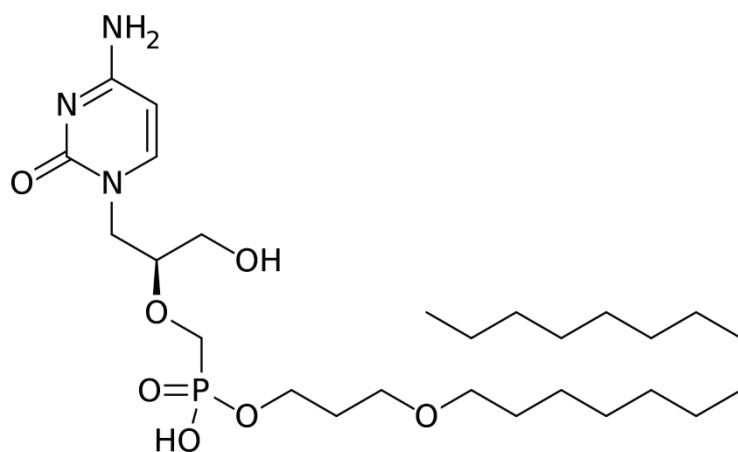


Figure 12: Structure du brincidofovir

La durée de traitement dépend de la négativité de la charge virale. On estime qu'après l'obtention de cette dernière il faut obtenir 2 à 3 résultats identiques avant d'arrêter le traitement.

Au terme du traitement curatif, il peut être mis en place une prophylaxie afin de prévenir une réactivation virale chez les patients à risque, et donc d'éviter l'émergence de résistances virales.

Les modes d'actions de ces divers antiviraux est résumé dans la figure 13.

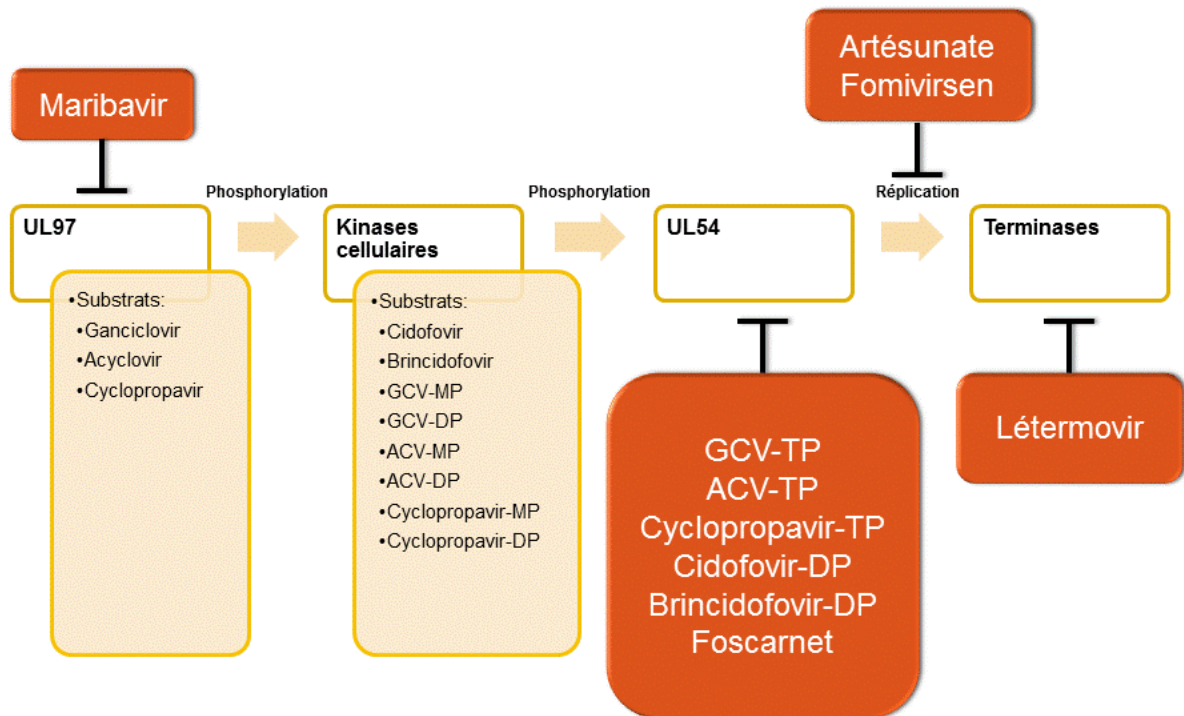


Figure 13: Synthèse des mécanismes d'action des principaux antiviraux

### I.3. Les résistances virales au GCV

Elles sont définies comme une persistance ou une augmentation de la charge virale malgré un traitement anti-CMV depuis plus de deux semaines, avec confirmation par un laboratoire que cette dernière est d'origine génétique (69). Si au contraire le laboratoire ne montre pas d'origine génétique à la résistance, il faut reconsidérer l'immunodépression et l'optimiser au mieux plutôt que de changer de traitement. Dans ce cas, il est conseillé d'accentuer le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) des immunosuppresseurs (70–72). Le STP permet de prédire à partir de dosages sanguins, la dose la plus adaptée au patient en garantissant d'un côté l'efficacité du traitement et de l'autre en limitant la survenue d'effets indésirables liés à un surdosage.

### **I.3.1. Prévalence**

Parmi tous les groupes de patients traités contre le CMV, le risque d'émergence de résistances virales est le plus élevé chez les patients transplantés les plus à risque (D+/R-). L'incidence de résistances virales est alors de 5 à 10% des patients, avec les chiffres les plus élevés pour les patients ayant eu une greffe pulmonaire ou intestinale du fait de leur fonction physiologique et de leur exposition aux germes (73–76) (77).

La résistance virale a des conséquences importantes sur la qualité de vie des patients. Ainsi dans une cohorte de 173 patients traités par GCV, parmi les 5 patients ayant développé des résistances, il a été observé 2 pertes du greffon, une perte fonctionnelle progressive du greffon et une cécité permanente (75).

### **I.3.2. Les mutations principales**

L'administration chronique des antiviraux à des patients immunodéprimés favorise l'apparition de mutations génétiques du CMV, notamment pour la kinase UL97 et l'ADN polymérase UL54 (51). Ces mutations ont été associées à une augmentation de la résistance aux traitements à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les virus possédant une mutation au niveau d'UL97 seront résistants au GCV et VGCV alors que ceux possédant des mutations au niveau d'UL54 posséderont également des résistances aux autres antiviraux ciblant la polymérase virale.

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

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 au Centre de Biologie et de Recherche en Santé, 2, av. Martin Luther King 87042 LIMOGES Cedex. Le responsable est le Pr Sophie ALAIN.

#### **I.3.2.1 UL97**

Le gène *UL97* code pour une kinase phosphorylant les protéines virales et cellulaires mais également le GCV. Environ 90% des résistances sont dues à une ou plusieurs mutations

dans *UL97* au niveau des codons 460,520,591-607 (78–80). Ces mutations confèrent des niveaux de résistances au GCV très variables, mais n'affectent pas le traitement par foscarnet ou cidofovir.

### **I.3.2.2 UL54**

Le gène *UL54* code pour l'ADN polymérase virale du CMV. Cette dernière a pour fonctions:

- La polymérisation des nucléotides.
- L'activité 3'-5' exonucléasique (activité correctrice) qui permet une haute fidélité de réplication et un taux de mutation très bas.

L'apparition de mutations sur ce gène crée un haut niveau de résistance, liée à une exposition chronique mais insuffisante au GCV. De telles mutations compromettent également la réussite de traitements par foscarnet et cidofovir. La présence de mutations sur *UL54* entraîne toutefois un retard dans la croissance virale (80–82).

### **I.3.3. Traitement du CMV résistant**

Il n'existe à ce jour pas d'études cliniques comparatives indiquant les molécules les plus efficaces en fonction du type de mutation. Cependant, Kotton et al. ont proposé l'algorithme suivant (Figure 14) (43).

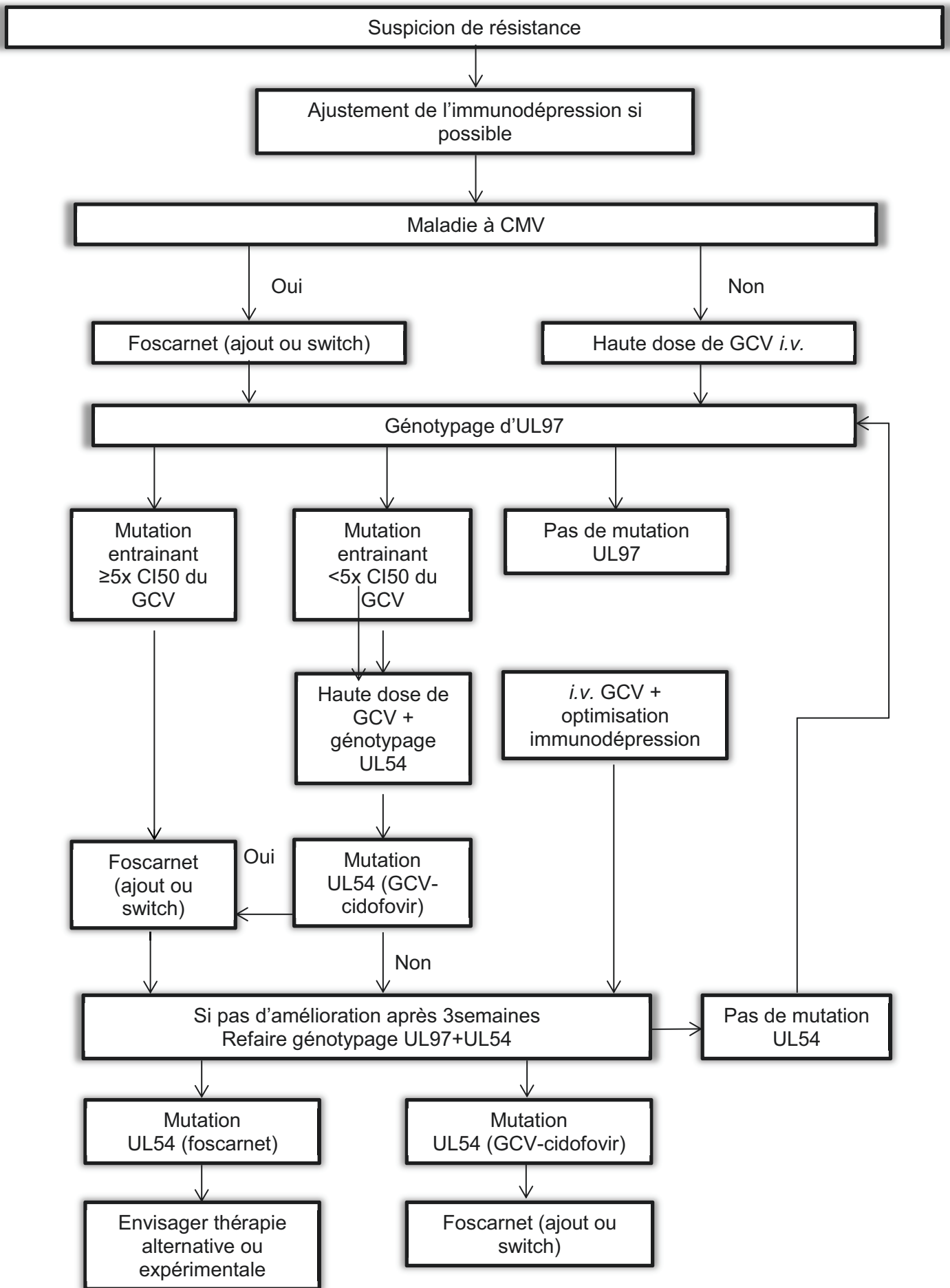


Figure 14: Arbre décisionnel du traitement du CMV résistant d'après Kotton et al. (43)

## Chapitre II. Travaux personnels

---

La neutropénie est l'effet indésirable majeur du traitement par GCV. A ce jour, les facteurs impliqués dans la survenue de cette toxicité sont mal connus. Dans ce contexte, notre objectif principal était de d'identifier ces facteurs prédictifs.

Dans la littérature, l'exposition des patients au GCV est étudiée à l'aide de marqueurs plasmatiques (concentrations résiduelles ou ASC plasmatiques du GCV). Si ceux-ci permettent d'obtenir une vision globale de l'exposition systémique, ils sont vraisemblablement mal corrélés à l'efficacité et/ou à la toxicité du médicament (83). Dans un premier temps, nous avons voulu explorer le métabolisme intracellulaire du GCV. Pour cela nous avons développé une méthode analytique permettant de doser les principaux métabolites du GCV (premier article, publié dans *Analytical and Bioanalytical Chemistry* en 2015). Cette méthode, une fois développée et validée, a permis d'établir des courbes temps-concentration des différents métabolites chez des patients sous traitement prophylactique par VGCV. Nous avons ensuite étudié les relations entre l'exposition à un métabolite ou au GCV et la diminution de la concentration de neutrophiles chez les patients par une approche POPPK non paramétrique. Nous avons pu mettre en évidence une association entre l'exposition au GCV-TP et la diminution du nombre de neutrophiles chez les patients (article soumis au *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*). Enfin, nous avons testé l'hypothèse que des variations génétiques ponctuelles au niveau de transporteurs du GCV pourraient être associées avec une diminution du nombre de neutrophiles chez les patients transplantés. Nous avons alors mené une étude pharmacogénétique des transporteurs du GCV en nous appuyant sur deux cohortes de patients et une confirmation de la fonctionnalité *in vitro*. Nous avons isolé un polymorphisme : rs11568658 dans le gène codant pour le transporteur MRP4 pouvant être impliqué dans une diminution des neutrophiles chez les patients transplantés et une augmentation intracellulaire de la concentration de GCV *in vitro* (article 3, en cours de soumission dans *Clinical Pharmacology and Therapeutics*).

## **II.1. Exploration des relations entre les marqueurs d'exposition au GCV et la toxicité hématologique**

### **II.1.1. Mise au point d'une méthode de dosage des formes intracellulaires du GCV**

Le point de départ de ces premiers travaux était l'absence d'une méthode de dosage des métabolites intracellulaires du GCV applicable à des patients recevant du VGCV.

Comme décrit précédemment le VGCV administré aux patients est rapidement converti en GCV par des estérases hépatiques ou intestinales, Dans les cellules infectées le GCV est phosphorylé en GCV-MP par la protéine kinase virale UL97 (17, 84). Ensuite des kinases cellulaires non spécifiques vont phosphoryler le GCV-MP en GCV-DP puis GCV-TP, forme active du GCV.

Notre objectif était donc de mettre au point une méthode de dosage permettant la mesure des concentrations plasmatiques de GCV et des concentrations intracellulaires des différents métabolites du GCV.

Nous avons mis au point une procédure en 4 étapes. Brièvement, celle-ci consiste à : 1) Séparer les différentes formes du GCV (GCV + GCV-MP, GCV-DP et GCV-TP) dans les cellules sanguines par extraction en phase solide (SPE), 2) Déphosphoryler les métabolites pour les retransformer en GCV, 3) Déssaler les échantillons et les concentrer, 4) Mesurer les concentrations en GCV dans les différentes fractions par une méthode LC-MS/MS.

Plus précisément :

A partir d'un échantillon de lysat cellulaire d'environ 10 millions de cellules, les différentes formes ont été séparées à l'aide de cartouches QMA SPE® (Waters, France). Les formes monophosphate et diphosphate ont été éluées avec respectivement 4,5mL de KCl à 75mM et 7,5mL de KCl à 100mM. Pour le GCV-TP l'éluion a nécessité 3mL de KCl à 1M. Les fractions ont ensuite été mises à incuber en présence d'acide phosphatase (4-5 UI) dans un tampon acide à 38°C afin de lyser les liaisons phosphates et former du GCV. Le dessalage des solutions s'est effectué par passage sur des cartouches SPE OASIS MCX® (Waters, France).

La méthode LC-MS/MS a ensuite reposé sur l'utilisation d'une colonne Atlantis Hilic silica 5µm® (Waters, France) et d'un API 4000Qtrap® (Applied-Biosystems, France).

L'ensemble de la procédure a été validé. La méthode était linéaire de 5-500 µg/L avec une limite de détection à 1µg/L pour les différentes formes du GCV. En l'absence d'échantillon standard de GCV-DP il a été impossible de quantifier cette forme.

Finalement, la procédure a été appliquée à des patients transplantés rénaux recevant du VGCV. Pour cela, une étude clinique a été conçue. Il s'agissait de l'étude PROGRESS (Pharmacokinetics of Ganciclovir and Ganciclovir triphosphate in renal transplant patients) dont le synopsis est présenté en annexe (annexe 1). Brièvement, les sujets ont été inclus au troisième mois de leur suivi post-transplantation rénale au service de Néphrologie, transplantation et dialyse à l'hôpital de Limoges. Cinq prélèvements ont été effectués en parallèle de leur STP de routine des immunosuppresseurs (avant la dose de GCV matinale et 1-2-3-5 heures après la prise). Les concentrations intracellulaires ont été obtenues à partir de cellules sanguines, comme décrit dans l'annexe 4.3. Cette étude a été soumise à la CNIL et approuvée par le comité d'éthique régional (annexe 2).

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication dans le journal *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, en 2015. Ce dernier est présenté dans les pages suivantes.



# Liquid chromatography tandem mass spectrometry quantitation of intracellular concentrations of ganciclovir and its phosphorylated forms

Pierre-André Billat · François-Ludovic Sauvage ·  
Nicolas Picard · Naima Tafzi · Sophie Alain · Marie Essig ·  
Pierre Marquet · Franck Saint-Marcoux

Received: 6 November 2014 / Revised: 6 January 2015 / Accepted: 10 February 2015 / Published online: 22 February 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Abstract** Ganciclovir (GCV) is prescribed for cytomegalovirus infection which is a major issue in immunodepressed patients. It is however characterized by hematological toxicity. A better understanding of GCV concentration-effects relationships implies the measurement of intracellular forms. The objective of this study was to develop a method to measure GCV and its derivatives in cells. A four-stage procedure was developed with the following strategy: (1) to separate into different

fractions the different intracellular forms of GCV (GCV itself and its phosphorylated forms) by solid-phase extraction (SPE) from blood cells, (2) to dephosphorylate the different phosphorylated forms into GCV, (3) to perform a second SPE to desalt samples and concentrate GCV, and (4) to measure GCV concentrations in the different extracts using a triple-quadrupole, linear ion trap mass spectrometer. Finally, the procedure was tested in 17 patients receiving GCV. From lysed cells, the different forms of GCV were fractionated, the phosphorylated forms were eluted with different KCl solutions, and the obtained fractions were treated with acid phosphatase to transform the phosphorylated metabolites back into GCV. The method was validated from 5 to 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  with a limit of detection of 1  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The whole procedure was validated according to the US Food and Drug Administration guidelines and successfully applied in 17 patients receiving GCV. The method liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) allowing the measurement of GCV and its phosphorylated forms in blood cells was developed and can be used in developing clinical studies to explore the role of these biomarkers in the event of toxicity.

Parts of this work “Discussed Poster Abstracts (2014). Fundamental & Clinical Pharmacology vol 28. doi: 10.1111/fcp.12065” were presented at the joint 18th Annual Meeting of French Society of Pharmacology and Therapeutics and 81th Annual Meeting of Society of Physiology [1].

P.-A. Billat · F.-L. Sauvage · N. Picard · M. Essig · P. Marquet ·  
F. Saint-Marcoux (✉)  
INSERM UMR 850, University of Limoges, 2, Rue Docteur  
Raymond Marland, 87025 Limoges, France  
e-mail: franck.saint-marcoux@chu-limoges.fr

F.-L. Sauvage · N. Picard · N. Tafzi · P. Marquet · F. Saint-Marcoux  
Department of Pharmacology, Toxicology and Pharmacovigilance,  
Limoges University Hospital, 87042 Limoges, France

S. Alain  
Centre National de Référence CMV, Limoges University Hospital, 2,  
Avenue Martin Luther King, 87042 Limoges, France

S. Alain  
Department of Bacteriology, Virology and Hygiene,  
Limoges University Hospital, 2, Avenue Martin Luther King,  
87042 Limoges, France

M. Essig  
Department of Nephrology, Dialysis and Transplantation,  
Limoges University Hospital, 2, Avenue Martin Luther King,  
87042 Limoges, France

F. Saint-Marcoux  
Toxicology Laboratory, Faculty of Pharmacy, University of Limoges,  
2, Rue Docteur Raymond Marland, 87042 Limoges, France

**Keywords** Ganciclovir · Intracellular · LC-MS/MS ·  
Metabolites

## Abbreviations

ACV	Acyclovir
AK	Enzyme acetate phosphotransferase
AUC	Area under the curve
$C_{\max}$	Maximal concentration observed after drug intake
$C_{\min}$	Residual concentration
CMV	Cytomegalovirus
CV	Coefficient of variation

GCV	Ganciclovir
GCV-DP	Ganciclovir diphosphate
GCV-MP	Ganciclovir monophosphate
GCV-TP	Ganciclovir triphosphate
IQC	Internal quality control
IS	Internal standard
LC-MS/MS	Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
LLOQ	Lower limit of quantification
LOD	Limit of detection
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
SPE	Solid-phase extraction
SRM	Selected reaction monitoring
$T_{\max}$	Time at which appears the maximal concentration
UPW	Ultrapure water
VGCV	Valganciclovir

## Introduction

Cytomegalovirus (CMV) infection is a major issue in immunodepressed patients, since it is associated with high morbidity. In solid organ transplantation (SOT), the incidence of CMV infection, without prophylaxis, is about 70 % in the at-risk population, with the highest morbidity for the combination of a positive donor with a negative recipient [2–4]. The frequency of CMV disease is 8–32 and 39–41 % in kidney and heart-lung transplant patients, respectively [5]. This percentage can be explained by the lack of anti-CMV immune response and a bad degree of human leukocyte antigen matching between the donor's organ and the recipient [6]. The type of SOT and the intensity of the immunosuppression are other factors [7].

Ganciclovir (GCV; Cymevan<sup>®</sup>, Roche Pharma) is a nucleoside analogue of guanosine [8, 9]. GCV or its prodrug valganciclovir (VGCV; Rovalcyte<sup>®</sup>, Roche Pharma) is used in prophylactic or pre-emptive therapy for CMV infection. In brief, when administered orally, the following details are known about the behavior of VGCV: first of all, VGCV is hydrolyzed into GCV by intestinal and hepatic esterases [10, 11], and then, in the CMV-infected cells, GCV is phosphorylated into GCV monophosphate (GCV-MP) by the viral protein kinase, pUL97. This is known as the limiting step mainly because the first phosphorylation is largely dependent on the viral kinase activity [12–14]. Several nonspecific cellular kinases further perform the phosphorylation of GCV-MP into GCV diphosphate (GCV-DP) and GCV triphosphate (GCV-TP).

GCV and VGCV are known to induce several adverse hematological effects (mainly neutropenia). Such toxicity leads to premature discontinuation of the treatment or to lowering

the dose. This obviously favors the emergence of viral resistance. In this context, a better understanding of the factors associated with the occurrence of such toxicity is of great interest. In a cohort of 240 patients, Wiltshire et al. suggested that a global exposure to GCV of 40–50 g h<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> (AUC value) could be linked to viremia suppression. However, such exposure was associated with an increase in the incidence of neutropenia and leukopenia [15].

Different methods of liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) have been proposed for the measurement of GCV plasma concentrations [16–18]. Such procedures have been developed to explore the pharmacokinetics of GCV and the relationships between the exposure to GCV in plasma and the effects [19]. However, up until now, the relationships between the intracellular forms and the effects have been poorly explored. Few studies have reported analytical methods for the measurement of base analogues in cells, but, to the best of our knowledge, no procedure for the measurement of GCV and its derivatives in blood cells has yet been published [20].

In the present study, our aim was to develop an LC-MS/MS method for the measurement of GCV and its derivatives in the human cells and to test the whole procedure in patients given GCV as part of their treatment.

## Methods

### Chemicals and reagents

The (*S*)-ganciclovir-5'-triphosphate lithium salt (GCV-TP, MW=495.2) was supplied by Tebu-bio<sup>®</sup> (Le Perray-en-Yvelines, France) and ganciclovir and acyclovir by TRC (Toronto, Canada); acetate phosphotransferase, acetic acid, acetonitrile, acid phosphatase, ammonium formate, chlorhydric acid, formic acid, potassium chloride, phosphodiesterase I, and methanol were acquired from Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA) and 35 % ammonia solution from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). The Waters Sep-Pak Accell Plus QMA cartridge (200 mg/3 mL) and Oasis MCX (3 cc, 60 mg) were obtained from Waters Corporation (Milford, MA, USA). Ultrapure water (UPW) was prepared with a Milli-Q Direct system (Millipore, MA, USA). Whole blood samples from healthy patients receiving GCV were stored in EDTA-anticoagulated tubes at room temperature.

### Analytical approach

#### *Isolation of the human peripheral blood mononuclear cells*

A Ficoll method was applied to separate the human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from the whole blood. It was applied both to the samples dedicated to building

calibration curves and for those from the patients. Then, the cells were rinsed twice before PBMCs were suspended in 1 mL phosphate-buffered saline (PBS) and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . An aliquot was used for determining cell counts before storage at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , implying the lysis of the cells. The cells were lysed by an “expansion-induced lysis” phenomenon at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### *Preparation of standards, internal standards, and quality controls*

Standard solutions of GCV-TP and GCV at  $1\text{ mg L}^{-1}$  were prepared in UPW. From these, the following concentration levels were prepared to build calibration curves in  $5.10^6$  lysed PBMC stored in PBS: 0, 1, 5, 10, 50, 100, 250, and  $500\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ . Internal quality control (IQC) samples were prepared at 5, 250, and  $500\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ . These standards and IQCs were stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Acyclovir (ACV) was used as the internal standard (IS). The IS solution stocks were at  $25\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  in UPW and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### *Synthesis of GCV-DP and GCV-MP*

The two components were prepared as proposed by Agbaria et al. [21]. A solution of GCV-DP was prepared by converting GCV-TP into GCV-DP using the enzyme acetate phosphotransferase (AK). More precisely, a buffer containing  $120\text{ mg L}^{-1}$  GCV-TP plus  $500\text{ mg L}^{-1}$  AK (in  $0.01\text{ mol L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8.0),  $0.2\text{ mol L}^{-1}$  ammonium acetate, and  $0.01\text{ mol L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ) had to be incubated for 8 h at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . GCV-MP was prepared by converting GCV-TP into GCV-MP using the enzyme venom phosphodiesterase (i.e., a snake's venom). The buffer consisted of  $50\text{ }\mu\text{g}$  of GCV-TP plus 1 IU of phosphodiesterase (in  $250\text{ }\mu\text{L}$  of  $0.01\text{ mol L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 9) containing  $1\text{ mmol L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ). The mixture had to be incubated for 6 h at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Finally, the samples were heated at  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 2 min and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### *Extraction of GCV and its phosphorylated intracellular forms from blood cells*

Firstly, the objective was to optimize extraction conditions to allow the separation of the different forms of GCV into different fractions.

Waters QMA solid-phase extraction cartridges were used. Spiked samples at  $100\text{ }\mu\text{g/L}$  were prepared as previously described and loaded on a Waters QMA SPE cartridge. These were preconditioned with 2 mL UPW, 1.5 mL of  $1\text{ mol L}^{-1}$  KCl, and 2 mL of  $5\text{ mmol L}^{-1}$  KCl. Optimization of this step was made

until 95 % of each form could be collected in a fraction.

Secondly, each fraction was dephosphorylated into GCV using  $4\text{ }\mu\text{L}$  of acid phosphatase (4–5 IU) in  $25\text{ }\mu\text{L}$  of  $1\text{ mol L}^{-1}$  sodium acetate, pH 5. Then, each mixture was vortexed and incubated for 30 min at  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a water bath.

After incubation, the tubes were kept at room temperature for 15 min, before adding  $25\text{ }\mu\text{L}$  of IS solution and  $400\text{ }\mu\text{L}$  of 2 % formic acid (to obtain a pH 3 buffer).

The next step consisted of desalting and concentrating the samples using MCX cartridges. After conditioning the cartridges with a wash of 3.0 mL of methanol, the samples were loaded before being washed with 3.0 mL of 2 % formic acid followed by 3 mL methanol. The analytes were eluted using a 95:5 methanol/ammonia (35 % v/v) buffer. The samples were then extemporaneously dried under nitrogen at  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

The final reconstitution was performed with  $50\text{ }\mu\text{L}$  of 90:10 acetonitrile/ammonium formate, pH 3,  $2\text{ mmol L}^{-1}$  (v/v). Then,  $5\text{ }\mu\text{L}$  was injected into the LC-MS/MS system.

#### LC-MS/MS instrumentation and conditions

The HPLC-MS/MS system consisted of a Shimadzu SIL20-AC high-pressure gradient pumping system equipped with two LC-20AD binary pumps, a SIL20-ACHT injector, and a CTO-10ASVP column oven and a 4000 QTRAP® (Applied Biosystems, France) triple-quadrupole, linear ion trap mass spectrometer. The gradient of elution used as phase A ammonium formate (pH 3),  $2\text{ mmol L}^{-1}$ , and as phase B 90:10 acetonitrile/ammonium formate (pH 3),  $2\text{ mmol L}^{-1}$  (v/v). Chromatographic separation was performed at a flow rate of  $200\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$  with a gradient going from 98 to 20 % phase B followed by 2 min at 20 % phase B using a Waters Atlantis® HILIC Silica  $5\text{ }\mu\text{m}$  ( $2.1\times 150\text{ mm}$ ) column, maintained at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

The mass spectrometer was operated in the positive ion mode using selected reaction monitoring (SRM). The SRM transitions of interest are presented in Table 1.

#### Validation procedures

The assay was developed according to the guidelines of the US Food and Drug Administration [22], on the basis of five replicates for a 5-day period. The selectivity was tested by analyzing the plasma samples and lysed blood cells from five healthy volunteers not given GCV as part of a treatment. Linear and quadratic regressions with different types of weighting ( $x$ ,  $1/x$ ) were applied for building the calibration curves.

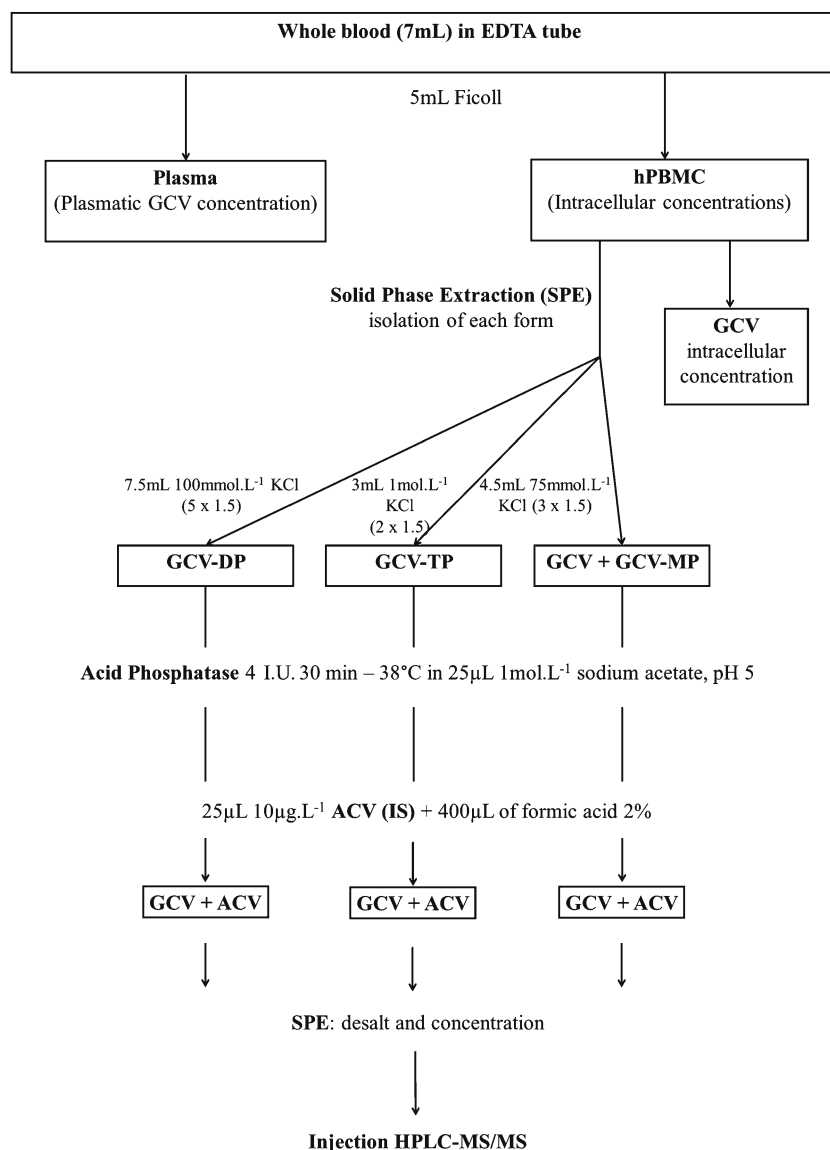
**Table 1** MS and chromatographic characteristics for GCV and ACV

Compound	SRM transition, $m/z$	Collision energy (V)	$R_T$ (min)
Ganciclovir	256.1→152.2	17	5.47
	256.1→135.2	47	
	256.1→110.2	47	
Acyclovir	226.2→152.2	17	4.80
	226.2→135.2	41	
	226.2→110.2	41	

Ion source parameters were as follows: spray voltage of 5500 V, ion source gas of 115 (arbitrary units), ion source gas of 230 (arbitrary units), curtain gas of 20 (arbitrary units), and capillary temperature of 400 °C. Instrument control, data acquisition, and processing were performed using the Analyst™ software version 1.5 (AB SCIEX, Framingham, MA, USA). Nitrogen was used as curtain gas and source gas

For intracellular GCV, the linearity of the technique was evaluated up to 50,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , by constructing calibration curves including the following concentration data: 0;1;5;10;20;50;100;500;1000;5000;10,000 and 50,000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The lower limit of quantification (LLOQ) was determined as the lowest concentration where imprecision was less than 20 % (coefficient of variation, CV). The limit of detection (LOD) was defined as the lowest concentration of the drug giving a signal-to-noise ratio of >3:1 and was determined for all compounds using an analysis of the blank samples enriched with decreasing amounts of the analytes.

For intracellular GCV-MP, no commercial standard of GCV-MP was available. GCV was used to validate the quantification of GCV-MP, knowing that both compounds have a

**Fig. 1** Summary of the extraction procedure

similar behavior during the extraction phase (see “Results”). The linearity of the technique was evaluated up to  $40 \mu\text{g L}^{-1}$ , by constructing calibration curves including the following concentration data: 0;1;5;10;20 and  $40 \mu\text{g L}^{-1}$ . The LLOQ and the LOD were determined similarly.

For intracellular GCV-TP, the linearity of the technique was evaluated up to  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ , by constructing calibration curves including the following concentration levels: 0;1;5;10;20;50;100;250 and  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ . The LLOQ and the LOD were determined similarly.

For intracellular GCV-DP, in the absence of a commercial standard, a precise determination of GCV-DP concentration was not possible.

### Application in patients given GCV

Seventeen renal transplant patients receiving Rovalcyte® (VGCV; Roche Pharma, France) were enrolled in an ancillary study entitled EPHEGREN (no. 130-2013-30). All 17 patients, treated in the Department of Nephrology, Dialysis and Transplantation of Limoges University Hospital, gave their written informed consent.

The following samples were obtained in EDTA tubes:  $T_0$ ,  $T_1 \text{ h}$ ,  $T_2 \text{ h}$ ,  $T_3 \text{ h}$ , and  $T_5 \text{ h}$  after the VGCV morning dose. For each sample, the following concentrations were measured: intracellular GCV, GCV-MP, and GCV-

TP. Additionally, GCV plasma concentrations were measured using a validated in-house method LC-MS/MS routinely used in the lab.

### Results

The main steps of the whole procedure are shown in Fig. 1.

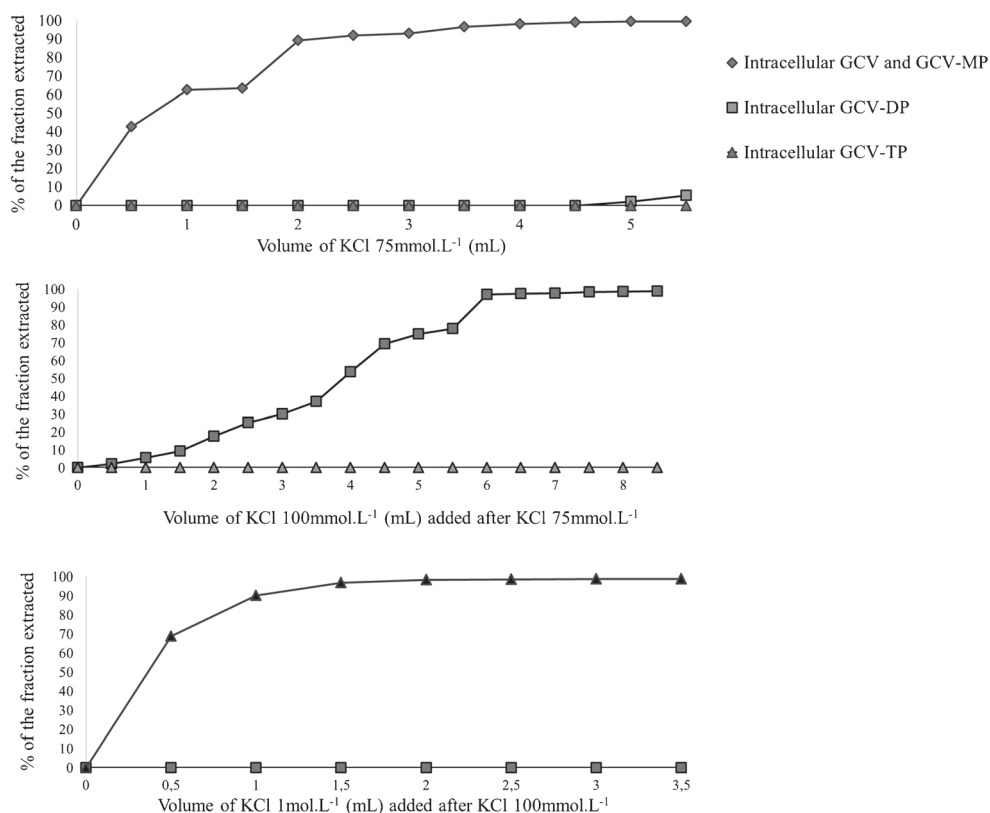
The following elutions were obtained: GCV and GCV-MP needed 4.5 mL of  $75 \text{ mmol L}^{-1}$  KCl, GCV-DP needed 7.5 mL of  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  KCl, and GCV-TP needed 3 mL of  $1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl. Under these conditions, more than 95 % of each form was recovered in each fraction (e.g., >98 % of GCV-TP actually present in its dedicated fraction and <2 % of the GCV-DP in the GCV-TP fraction) (see Fig. 2).

The dephosphorylation of the phosphorylated forms was complete after 30 min in contact with 4 IU of acid phosphatase.

Two different aliquots were used for the measurements of GCV-MP: one where GCV was measured without dephosphorylation and another where GCV was measured after dephosphorylation. The difference is GCV-MP.

The results of the validation of the LC-MS/MS methods for the measurements of the different GCV forms are shown in Table 2.

**Fig. 2** Separation of GCV and GCV-MP, GCV-DP, and GCV-TP by anion exchange chromatography among the different gradients of KCl ( $n=3$ )



**Table 2** Summary of validation data

	Theoretical concentration GCV-TP			Theoretical concentration GCV-MP			Theoretical concentration GCV		
	IQC 5 µg L <sup>-1</sup>	IQC 250 µg L <sup>-1</sup>	IQC 500 µg L <sup>-1</sup>	IQC 5 µg L <sup>-1</sup>	IQC 20 µg L <sup>-1</sup>	IQC 40 µg L <sup>-1</sup>	IQC 500 µg L <sup>-1</sup>	IQC 2600 µg L <sup>-1</sup>	IQC 5200 µg L <sup>-1</sup>
Inter-assay (n=5)									
Mean±SD concentration	5.8±1.1	248.4±9.8	498.6±1.9	4.4±0.3	20.9±1.3	39.6±0.4	399.7±27.0	2646.7±218.7	5235.0±672.8
Coefficient of determination (r <sup>2</sup> )	0.9981			0.9987			0.9997		
Relative bias (%)	16.0	0.7	0.3	12.0	4.6	1.0	20.0	1.8	0.7
%CV	18.7	3.9	0.4	7.4	4.4	1.0	6.8	8.3	12.9
Intra-assay (n=5)									
Mean±SD	6.7±0.3	240±4.9	454.8±39.7	4.3±0.1	18.2±0.6	35.0±1.0	485.0±77.7	2738.3±49.6	5400.0±305.8
Relative bias (%)	34.8	4.0	9.0	13.1	8.9	12.6	3.0	5.3	3.9
%CV	4.7	2.0	8.7	3.0	3.4	2.7	16.0	1.8	5.7

IQC internal quality control, SD standard deviation, CV coefficient of variation

Calibration curves were generated using a weighted (1/x) model linear regression. All coefficients of determination (r<sup>2</sup>) were >0.99. Inter-run precision showed CVs of <18.7 % (this value being reported for the smallest targeted GCV-TP concentration). Intra-run precision showed CVs of <16.0 % for all the analytes. The specificity study reported no signal in the plasma and lysed cells of the five tested healthy volunteers.

Extracted sample stability was assessed by keeping five replicate IQC samples in an autosampler maintained at 4 °C. These samples were reinjected 24 h later. The range of deviations was -16 to 1.5 % from the control for all the tested conditions.

Mean concentration-time curves obtained from the cohort of 17 patients are shown in Fig. 3. The exposure indices derived from these curves are presented in Table 3.

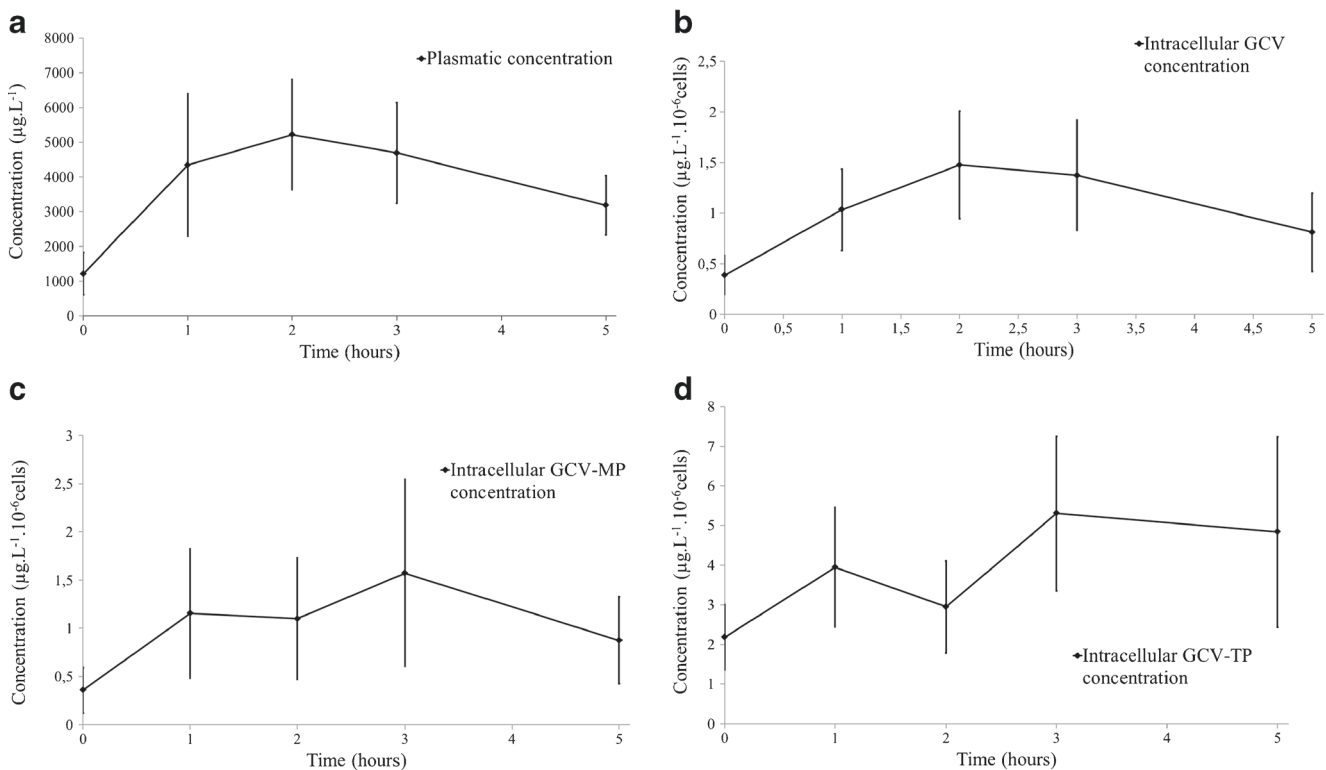
The patients were classified by taking into account their given dose and their estimated clearance of creatinine. All the GCV forms were detected in all the patients, which proved that the procedure is able to explore the exposure to the different forms of GCV in the plasma and in the blood cells.

**Discussion**

We have developed and validated the first analytical procedure that allows the measurement of GCV and its derivatives in blood cells. The performance of the whole procedure was tested in patients receiving GCV as part of their treatment.

The steps were optimized to render feasible the measurements of the intracellular phosphorylated forms of GCV. A solid-phase extraction (SPE) approach was used to separate into different fractions the different intracellular forms of GCV. This approach was previously proposed by Bushman et al. in order to separate phosphorylated nucleosides [20]. After the optimization of multiple steps, the method was extensively validated. It complied with all the analytical validation parameters. To the best of our knowledge, there are no commercial standards readily available for GCV-MP and GCV-DP. In the present study, GCV-MP and GCV-DP were obtained using enzymatic syntheses (with no possibility to evaluate their yield). As illustrated in Fig. 2, GCV and GCV-MP were present in the same fraction after the first SPE. Consequently, the concentration of GCV-MP was indirectly determined by subtraction of the concentration obtained following the SPE, both with and without dephosphorylation, using the phosphatase acid. The concentrations of GCV-DP were not measured.

Blood samples of 17 patients were used in the procedure. In these patients, the observed pharmacokinetic (PK) profiles of



**Fig. 3** **A** Mean concentration-time curves of plasmatic GCV observed in 17 patients. **B** Mean concentration-time curves of intracellular GCV observed in 17 patients. **C** Mean concentration-time curves of GCV-MP

observed in 12 patients. **D** Mean concentration-time curves of GCV-TP observed in 17 patients

GCV in the plasma were comparable to those previously reported [23–26]. An important interpatient variability in the PK profiles of the different GCV forms was observed. Previous studies have already reported such variability in GCV blood concentrations [26]. The intracellular GCV, GCV-MP, and GCV-TP PK profiles yielded  $T_{max}$  values of  $2.5 \pm 1.0$ ,  $3.4 \pm 1.3$ , and  $3.1 \pm 1.1$  h. This corresponded to a delay of up to 2 h compared to GCV in the plasma. It should be noted that some genetic variations in GCV transporters may be involved in this variability of GCV to accumulate in cells and possibly to the cytotoxicity [27].

GCV-TP was detected in all the patients, while none of them had a CMV viral PCR above 500 copies at the time of sampling. However, the first phosphorylation step of GCV is known to be dependent on the viral kinase. One can hypothesize that unspecific kinases can convert GCV into GCV-MP.

We therefore conclude that this procedure will be the pillar of clinical studies exploring the role of these different biomarkers, together with genetic variations in GCV transporters, in the occurrence of toxicity.

**Table 3** Population characteristics of GCV and its metabolites

Analyte (number of patients)	Dose (mg)	Creatinine clearance (mL min <sup>-1</sup> )	$C_{max}$ (µg L <sup>-1</sup> )	$C_{min}$ (µg L <sup>-1</sup> )	$AUC_{0-5\ h}$ (µg h <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> )	$T_{max}$ (h)
Plasmatic GCV (14)	450	45.8±18.3	5808±3751	997±1224	19,348±10,100	1.64±0.64
Plasmatic GCV (3)	900	74.7±18.3	8723±4100	2187±1736	34,402±16,727	2.33±1.15
Intracellular GCV (14)	450	–	1.76±1.28 <sup>a</sup>	0.38±0.46 <sup>a</sup>	5.46±3.98 <sup>a</sup>	2.35±0.84
Intracellular GCV (3)	900	–	1.36±1.45 <sup>a</sup>	0.25±0.23 <sup>a</sup>	3.69±3.25 <sup>a</sup>	3.33±1.53
Intracellular GCV-MP (10)	450	–	2.1±2.1 <sup>a</sup>	0.38±0.61 <sup>a</sup>	5.79±6.65 <sup>a</sup>	3.3±1.34
Intracellular GCV-MP (2)	900	–	1.25±0.95 <sup>a</sup>	0.26±0.28 <sup>a</sup>	3.72±2.83 <sup>a</sup>	4±1.41
Intracellular GCV-TP (14)	450	–	6.38±4.72 <sup>a</sup>	2.06±1.63 <sup>a</sup>	19.43±14.18 <sup>a</sup>	2.92±0.63
Intracellular GCV-TP (3)	900	–	9.88±5.78 <sup>a</sup>	3.02±0.87 <sup>a</sup>	26.26±14.05 <sup>a</sup>	3.67±1.15

Values are expressed as mean±SD

$C_{max}$  the maximal concentration observed after drug intake,  $C_{min}$  the residual concentration,  $T_{max}$  the time at which appears the maximal concentration

<sup>a</sup> Values are expressed by 10<sup>6</sup> cells

## References

- Discussed Poster Abstracts (2014). *Fundam Clin Pharmacol* 28:30–90. doi:10.1111/fcp.12065
- Weclawiak H, Mengelle C, Ould Mohamed A, Izopet J, Rostaing L, Kamar N (2010) [Cytomegalovirus effects in solid organ transplantation and the role of antiviral prophylaxis]. *Nephrol Ther* 6:505–512. doi:10.1016/j.nephro.2010.06.003
- Rubin RH (2007) The pathogenesis and clinical management of cytomegalovirus infection in the organ transplant recipient: the end of the 'silo hypothesis'. *Curr Opin Infect Dis* 20:399–407. doi:10.1097/QCO.0b013e328285a358
- Limaye AP, Raghu G, Koelle DM, Ferrenberg J, Huang ML, Boeckh M (2002) High incidence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection among lung transplant recipients receiving preemptive therapy. *J Infect Dis* 185:20–27. doi:10.1086/338143
- Sia IG, Patel R (2000) New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 13:83–121
- Fishman JA, Rubin RH (1998) Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 338:1741–1751. doi:10.1056/NEJM199806113382407
- Bailey TC, Buller RS, Ettinger NA, Trulock EP, Gaudreault-Keener M, Langlois TM, Fornoff JE, Cooper JD, Storch GA (1995) Quantitative analysis of cytomegalovirus viremia in lung transplant recipients. *J Infect Dis* 171:1006–1010
- Schaeffer HJ (1982) Acyclovir chemistry and spectrum of activity. *Am J Med* 73:4–6
- Martin JC, Dvorak CA, Smee DF, Matthews TR, Verheyden JP (1983) 9-[(1,3-Dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine: a new potent and selective antiherpes agent. *J Med Chem* 26:759–761
- Sullivan V, Talarico CL, Stanat SC, Davis M, Coen DM, Biron KK (1992) A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* 358:85. doi:10.1038/358162a0
- Littler E, Stuart AD, Chee MS (1992) Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature* 358:160–162. doi:10.1038/358160a0
- Biron KK, Stanat SC, Sorrell JB, Fyfe JA, Keller PM, Lambe CU, Nelson DJ (1985) Metabolic activation of the nucleoside analog 9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:2473–2477
- Flechner SM, Avery RK, Fisher R, Mastroianni BA, Papajcik DA, O'Malley KJ, Goormastic M, Goldfarb DA, Modlin CS, Novick AC (1998) A randomized prospective controlled trial of oral acyclovir versus oral ganciclovir for cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant recipients. *Transplantation* 66:3053–3055
- Winston DJ, Wirin D, Shaked A, Busuttill RW (1995) Randomised comparison of ganciclovir and high-dose acyclovir for long-term cytomegalovirus prophylaxis in liver-transplant recipients. *Lancet* 346:69–74
- Wiltshire H, Paya CV, Pescovitz MD, Humar A, Dominguez E, Washburn K, Blumberg E, Alexander B, Freeman R, Heaton N, Zuideveld KP (2005) Pharmacodynamics of oral ganciclovir and valganciclovir in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 79:1477–1483
- Singh O, Saxena S, Mishra S, Khuroo A, Monif T (2011) Determination of valganciclovir and ganciclovir in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometric detection. *Clin Biochem* 44:907–915. doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.04.003
- Xu HR, Li XN, Chen WL, Liu GY, Chu NN, Yu C (2007) A sensitive assay for simultaneous determination of plasma concentrations of valganciclovir and its active metabolite ganciclovir by LC/MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 848:329–334. doi:10.1016/j.jchromb.2006.10.053
- Gunda S, Earla R, Cholkar K, Mitra AK (2014) Pharmacokinetic studies and LC-MS/MS method development of ganciclovir and dipeptide monoester prodrugs in Sprague Dawley rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. doi:10.1007/s13318-014-0200-2
- Scott JC, Partovi N, Ensom MH (2004) Ganciclovir in solid organ transplant recipients: is there a role for clinical pharmacokinetic monitoring? *Ther Drug Monit* 26:68–77
- Bushman LR, Kiser JJ, Rower JE, Klein B, Zheng JH, Ray ML, Anderson PL (2011) Determination of nucleoside analog mono-, di-, and tri-phosphates in cellular matrix by solid phase extraction and ultra-sensitive LC-MS/MS detection. *J Pharm Biomed Anal* 56:390–401. doi:10.1016/j.jpba.2011.05.039
- Agbaria R, Candotti F, Kelley JA, Hao Z, Johns DG, Cooney DA, Blaese RM, Ford H Jr (2001) Biosynthetic ganciclovir triphosphate: its isolation and characterization from ganciclovir-treated herpes simplex thymidine kinase-transduced murine cells. *Biochem Biophys Res Commun* 289:525–530. doi:10.1006/bbrc.2001.6011
- Brian Booth JK (2013) Guidance for industry. Bioanalytical method validation
- Paya C, Humar A, Dominguez E, Washburn K, Blumberg E, Alexander B, Freeman R, Heaton N, Pescovitz MD, Valganciclovir Solid Organ Transplant Study G (2004) Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 4. doi:10.1111/j.1600-6143.2004.00382.x
- Vezina HE, Brundage RC, Balfour HH Jr (2014) Population pharmacokinetics of valganciclovir prophylaxis in pediatric and adult solid organ transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol*. doi:10.1111/bcp.12343
- Pescovitz MD, Jain A, Robson R, Mulgaonkar S, Freeman R, Bouw MR (2007) Establishing pharmacokinetic bioequivalence of valganciclovir oral solution versus the tablet formulation. *Transplant Proc* 39:3111–3116. doi:10.1016/j.transproceed.2007.10.007
- Caldes A, Colom H, Armendariz Y, Garrido MJ, Troconiz IF, Gil-Vernet S, Lloberas N, Pou L, Peraire C, Grinyo JM (2009) Population pharmacokinetics of ganciclovir after intravenous ganciclovir and oral valganciclovir administration in solid organ transplant patients infected with cytomegalovirus. *Antimicrob Agents Chemother* 53. doi:10.1128/AAC.00085-09
- Adachi M, Sampath J, Lan LB, Sun D, Hargrove P, Flatley R, Tatum A, Edwards MZ, Wezeman M, Matherly L, Drake R, Schuetz J (2002) Expression of MRP4 confers resistance to ganciclovir and compromises bystander cell killing. *J Biol Chem* 277:38998–39004. doi:10.1074/jbc.M203262200



## II.1.2. Etudes des relations entre marqueurs d'exposition et toxicité

Après la mise au point d'une méthode de dosage des différentes formes plasmatiques et intracellulaires du GCV, ces travaux avaient pour objectif d'étudier la pharmacocinétique de ces différentes entités et d'explorer leurs relations avec l'évolution du compte de neutrophiles chez des patients traités.

Pour cette étude, 22 patients adultes ont été inclus et suivis pendant les 3 premiers mois post-greffe. Il s'agissait de ceux de l'étude Progress (voir paragraphe II-1-1). Chez ces patients, les doses de VGCV étaient ajustées sur la clairance de la créatinine : 19 patients prenaient 450mg et 3 prenaient 900mg pendant les 3 mois avant l'inclusion. Aucun de ces patients n'avait eu d'épisode d'infection ou de réactivation virale durant les 3 mois. Parmi eux, 10 étaient seropositifs au CMV.

Les données de concentrations du GCV et de ses métabolites ont été analysées par approche non paramétrique avec le logiciel Pmetrics®. Pour pouvoir décrire le comportement de toutes les entités, un modèle à 4 compartiments (13 paramètres et un temps de latence) a été mis au point. Le modèle finalement retenu permettait de prédire avec précision les valeurs individuelles d'ASC, pour chaque molécule.

L'association entre les différentes formes et la diminution du nombre de neutrophiles pendant les 3 mois de traitement a été testée par régression linéaire.

Une forte association a été trouvée entre l'exposition au GCV-TP ( $ASC_{0-5h}$ ) et l'évolution du nombre de neutrophiles ( $\beta = -0.0019 \pm 5.10^{-4}$ ,  $p < 0.01$ ). Dans notre population pour laquelle l' $ASC_{0-5h}$  moyenne du GCV-TP était de 19.3  $\mu\text{g.h/L}$ , nous avons observé qu'une augmentation de l' $ASC_{0-5h}$  de 18  $\mu\text{g.h/L}$  correspond à une perte d'environ  $1.10^9$  neutrophiles /L par mois.

Ces travaux sont sous presse dans le Journal of Antimicrobial Chemotherapy.

Il serait intéressant, par la suite, de confronter ce modèle à des données issues d'une population indépendante afin d'évaluer la valeur prédictive du GCV-TP dans la survenue de neutropénies.

1 **Plasma and intracellular exposure to ganciclovir in adult renal transplant recipients: is**  
2 **there an association with hematological toxicity?**

3

4 **BILLAT Pierre-André<sup>1,2,\*</sup>, WOILLARD Jean-Baptiste<sup>1,2,3</sup>, ESSIG Marie<sup>1,2,4</sup>, SAUVAGE**  
5 **François-Ludovic<sup>1,2</sup>, PICARD Nicolas<sup>1,2,3</sup>, ALAIN Sophie<sup>5,6</sup>, NEELY Michael<sup>7,8</sup>,**  
6 **MARQUET Pierre<sup>1,2,3</sup>, SAINT-MARCOUX Franck<sup>1,2,3</sup>.**

7 <sup>1</sup> Univ. Limoges, UMR\_S 850, F-87000 Limoges, France.

8 <sup>2</sup> INSERM, U850, F-87000 Limoges, France.

9 <sup>3</sup> CHU Limoges, Service de pharmacologie, toxicologie et pharmacovigilance, F-87000  
10 Limoges, France.

11 <sup>4</sup> CHU Limoges, Service de néphrologie, dialyse et transplantation, F-87000 Limoges,  
12 France.

13 <sup>5</sup> INSERM, U1092, F-87000 Limoges, France.

14 <sup>6</sup> CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, F-87000 Limoges, France.

15 <sup>7</sup> University of Southern California, Keck School of Medicine, Los Angeles, California, USA

16 <sup>8</sup> Laboratory of Applied Pharmacokinetics and Bioinformatics (LAPKB), Children's Hospital of  
17 Los Angeles, Los Angeles, California, USA

18

19 **Running title: Ganciclovir exposure-effect in transplant patients**

20

21 **Corresponding author**

22 Dr. Pierre-André BILLAT

23 Univ. Limoges, UMR\_S 850,

24 INSERM, U850, F-87000 Limoges, France.

25 C.B.R.S

26 2 avenue Martin-Luther King

27 87042 LIMOGES Cedex

28 France

29 Tel: +33 5 19 56 42 32

30 Fax: +33 5 55 43 59 36

31 p.a@billat.org

32

33 **References: 21**

34 **Figures: 3**

35 **Tables: 4**

36 **Supplemental data : 1**

37

38 **ABSTRACT**

39 **Background:** Ganciclovir is the most widely used treatment of cytomegalovirus infections.  
40 However, neutropenia is a frequent associated adverse effect leading to a decrease in the  
41 ganciclovir dose or to a discontinuation of the therapy, thereby favoring viral resistance. In  
42 the present study, the objectives were: (i) to describe the pharmacokinetics of blood and  
43 intracellular ganciclovir and its metabolites; (ii) to explore the relationship between the  
44 exposure to ganciclovir and/or its metabolites and the evolution of neutrophil count under  
45 treatment.

46 **Methods:** Pharmacokinetic (PK) profiles (Pre-dose and 1, 2, 3, and 5 hours after dosing) of  
47 ganciclovir and its metabolites were measured in 22 adult renal transplant patients and  
48 further modeled by a non-parametric approach (PMetrics®). The relationship between the  
49 exposure indices to ganciclovir and the slope of the neutrophil count was investigated using  
50 multiple linear regression.

51 **Results:** A 4-compartment open model was able to accurately describe ganciclovir and its  
52 intracellular forms. A significant association was found between intracellular ganciclovir  
53 triphosphate concentrations ( $AUC_{0-5h}$ ) and the decrease in neutrophil count over the first 3  
54 months of treatment ( $\beta = -0.0019 \pm 5.10^{-4}$ ,  $p < 0.01$ ).

55 **Conclusion:** In this population of renal transplant patients, the decrease in neutrophil count,  
56 used as a surrogate marker of hematological toxicity, was associated with ganciclovir  
57 triphosphate accumulation in blood cells. Further studies are needed to test this biomarker as  
58 a predictive factor of toxicity.

59 **Key-words:** Ganciclovir, Pharmacokinetics, Neutropenia, Renal transplantation.

60

## 61 INTRODUCTION

62 Cytomegalovirus (CMV) infection significantly increases the morbidity and mortality in solid  
63 organ transplant (SOT) patients.(85) The two most used drugs for CMV prophylactic or  
64 curative treatment in SOT patients are ganciclovir and its prodrug valganciclovir. Because  
65 valganciclovir has a better bioavailability, it is preferred for both prophylactic and preemptive  
66 therapies.(86) valganciclovir and ganciclovir pharmacodynamics are well understood: firstly  
67 valganciclovir is hydrolyzed into ganciclovir by intestinal and hepatic esterases.(87) In CMV  
68 infected cells, ganciclovir is then phosphorylated into ganciclovir mono-phosphate (GCV-  
69 MP<sub>ic</sub>). It is known as the limiting step, because this first phosphorylation is largely dependent  
70 on the viral protein kinase, pUL97.(17, 84) GCV-MP<sub>ic</sub> is phosphorylated into ganciclovir tri-  
71 phosphate (GCV-TP<sub>ic</sub>) which is the active form that incorporates the DNA.

72 The main side effect of ganciclovir therapy is hematological toxicity and particularly  
73 neutropenia. It can occur in up to 50 % of the patients given ganciclovir,(88) leading to a  
74 decrease in the ganciclovir dose or to a discontinuation of the therapy, thereby favoring viral  
75 resistance. Some studies have explored the relationship between ganciclovir blood  
76 concentrations and the occurrence of neutropenia. In a study on 372 solid organ transplant  
77 patients, Wiltshire et al. only noted that higher ganciclovir exposure resulted in a weak  
78 increase of neutropenia (and leukopenia).(4) Therefore, intracellular metabolism of  
79 ganciclovir and its metabolites could be associated to neutropenia. But, very little is known  
80 about the pharmacokinetics of intracellular ganciclovir and its metabolites in patients' blood  
81 cells.

82 In this context, the objectives of the present study were: (i) to describe the pharmacokinetics  
83 of blood and intracellular ganciclovir and its metabolites, in a cohort of renal transplant  
84 patients; (ii) to explore the relationship between the exposure to ganciclovir and/or its  
85 metabolites and the evolution of neutrophil count under treatment.

86

## 87 MATERIALS AND METHODS

### 88 Population:

89 Data were obtained from the ProGGResS (Pharmacokinetic of Ganciclovir and valGanciclovir  
90 triphosphate in Renal transplant patients) trial conducted in 22 adult renal transplant patients  
91 followed at the nephrology department of the Limoges university hospital, France. It was an  
92 ancillary study of EPHEGREN study (n°130-2013-30). All the patients gave written informed  
93 consent. This trial complied with the declaration of Helsinki amended in Tokyo and was  
94 reviewed and approved by the regional ethics committee of Limoges, France (n°164-2015-  
95 01).

96 The patients included received valganciclovir (Rovalcyte<sup>®</sup>, Roche, Switzerland) for the  
97 prophylaxis of CMV infections. All patients were given valganciclovir at a dose of 450mg QD  
98 (19 patients) or 450mg BID (3 patients) according to their creatinine clearance (as defined in  
99 the Summary of Product Characteristics), for 3 months (since transplantation). The exclusion  
100 criteria were prior valganciclovir treatment and granulocyte colony stimulating factor intake.  
101 Demographic and clinical data collected for the 22 patients, at the time of PK sampling, are  
102 summarized in table 1.

103

### 104 Blood sampling and drug analysis:

105 All patients were sampled during the third month after transplantation. Samples were  
106 collected in EDTA tubes at pre-dose, T1h, T2h, T3h and T5h after the valganciclovir morning  
107 dose. Cells and plasma were immediately isolated from whole blood using a classical Ficoll-  
108 dextran method. Cells were then counted and samples were stored at -20°C. For each  
109 sample, ganciclovir in plasma ( $GCV_p$ ) was measured, as well as  $GCV_{ic}$ ,  $GCV-MP_{ic}$  and  $GCV-$   
110  $TP_{ic}$  in PBMC. The concentrations were obtained using a validated LC-MS/MS method and  
111 intracellular forms concentrations were normalized per million of cells as previously  
112 described.<sup>(89)</sup> Briefly, each intracellular form was isolated through a solid-phase-extraction  
113 Sep-Pak Accell Plus QMA cartridge (Waters Corporation<sup>®</sup>, Milford, MA, USA) using a KCl

114 gradient. The samples were then desalted and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. The LC-MS/MS  
115 methods used a 4000 Qtrap<sup>®</sup> (Applied-Biosystems<sup>®</sup>, France) triple quadrupole linear ion-trap  
116 mass spectrometer.

### 117 **Pharmacokinetic modeling:**

118 All the PK profiles ( $\text{GCV}_p$ ,  $\text{GCV}_{ic}$ ,  $\text{GCV-MP}_{ic}$  and  $\text{GCV-TP}_{ic}$ ) obtained from the 22 renal  
119 transplant patients were analyzed using the non-parametric adaptive grid approach  
120 implemented in a R-package (Pmetrics<sup>®</sup> version 1.3.2 (90)). Several structural models were  
121 evaluated during the development process with and without absorption lag time. The analysis  
122 was based on a 4-compartment open model: absorption of valganciclovir was modelled as a  
123 first order process and conversion to ganciclovir in the central compartment was assumed to  
124 be instantaneous (as previously described (91)). As presented in Fig. 1, the model included a  
125 plasmatic compartment, an intracellular  $\text{GCV}_{ic}$  compartment and intracellular  $\text{GCV-MP}_{ic}$  and  
126  $\text{GCV-TP}_{ic}$  compartments.

127 Screening and selection of covariates were performed as part of the population  
128 pharmacokinetic analysis, following a classical stepwise approach. The model was  
129 parameterized in terms of absorption rate constant ( $K_a$ ), renal clearance of the drug (CL),  
130 central volume of distribution of each compartment, constant of absorption ( $K_a$ ),  
131 intercompartmental transfer rate constants ( $K_{n,n+1}$ ). The constant  $K_{40}$  referred to the  
132 elimination of  $\text{GCV-TP}_{ic}$  (literally from compartment 4 to compartment 0). This elimination  
133 could be made both by: integration into DNA (viral or cellular) or efflux of  $\text{GCV-TP}_{ic}$  from  
134 cells.

135 A linear error model was used to describe the analytical variability.

136 The performance of the model were appreciated by studying its ability to estimate the  
137 individual AUC values of each ganciclovir form: The mean bias between the individual AUCs  
138 calculated using the individual posthoc parameters and those obtained by the linear  
139 trapezoidal method was calculated.

140

141 **Relationship between the exposure to ganciclovir and the evolution of the neutrophil**  
142 **count:**

143 The individual slope of the neutrophil count (from the beginning of the treatment to the time  
144 of sampling, *i.e.* approximately 3 months later) was used as the main criteria. A multiple  
145 linear regression analysis was performed to explore the influence of the following individual  
146 covariates on the individual slope: creatinine clearance, age, sex, valganciclovir dose,  $GCV_p$   
147 AUC,  $GCV_{ic}$  and its metabolites AUCs,  $C_{maxCMV}$  serology and mycophenolate mofetil dose.  
148 Classically, a univariate analyze was first performed using a p value threshold of 0.1. In a  
149 second step, all significant covariates were included in an intermediate model. Finally, the  
150 final model was selected using a backward stepwise procedure based on the likelihood ratio  
151 test for the selection of the final model, using a p value threshold of 0.05.

152



## 153 RESULTS

154 The observed concentration-to-time profiles of ganciclovir and its different metabolites in the  
155 22 renal transplant patients are displayed in Fig. 2. The exposure indices are given in table 2.  
156 For each form, concentrations <5ng/mL (the limit of quantitation of the analytical method)  
157 were considered as null and intracellular concentrations were normalized per million PBMC.  
158 There were no correlation between the exposure indices to GCV<sub>p</sub> (AUC<sub>0-5h</sub>) and those of  
159 GCV-TP<sub>ic</sub> (Spearman coefficient  $r=0.35$ ,  $p=0.11$ ). Moreover, the valganciclovir dose was not  
160 correlated with any GCV-TP<sub>ic</sub> exposure indices (data not shown).

161 A model using thirteen parameters plus a lag time to describe the absorption phase was  
162 necessary to determine the pharmacokinetics of GCV<sub>p</sub>, GCV<sub>ic</sub>, GCV-MP<sub>ic</sub> and GCV-TP<sub>ic</sub>. The  
163 pharmacokinetic parameters are given in table 3. The supplemental Fig. S1 illustrates the  
164 goodness of fit.

165 The relative bias between the reference (trapezoidal rule) and model estimated AUCs were:  
166 -5.1% (minimum to maximum range :-34% to 42%), -2.8% (-26% to 124%), -0.6% (-60% to  
167 95%) and -9.6% (-38% to 74%) for of GCV<sub>p</sub>, GCV<sub>ic</sub>, GCV-MP<sub>ic</sub> and GCV-TP<sub>ic</sub> respectively

168 The results of the multiple linear regression analysis investigating the relationships between  
169 the individual covariates and the evolution of the neutrophil count are given in Table 4. The 3  
170 exposure indices for GCV-TP<sub>ic</sub> were significant in the univariate analysis. In the multivariate  
171 analysis, only the AUC<sub>0-5h</sub> of GCV-TP<sub>ic</sub> was associated to the slope of neutrophil count. The  
172 effect on the slope was  $\beta=-0.0019 \pm 5.10^{-4}$ ,  $p<0.01$  with a correlation  $r_{\text{Spearman}}=0.64$ . This last  
173 result is illustrated in Fig. 3. As an example, this figure shows that the patient having the  
174 lowest AUC value 2.82ng\*h/mL/10<sup>6</sup> cells has had a gain of 10% in his neutrophil count, while  
175 the one having the highest AUC value 29.3 ng\*h/mL/10<sup>6</sup> cells has had a severe neutropenia  
176 (decrease of 87% in the neutrophil count).

177

## 178 DISCUSSION

179 To our knowledge, we report the first study describing the PKs of ganciclovir, including  
180 intracellular forms, in renal transplant patients given valganciclovir. To better explore the  
181 relationships between ganciclovir in plasma and its intracellular outcome, including the  
182 factors that may contribute to any interindividual variability, a pharmacokinetics of population  
183 (POPPK) model was developed. Additionally, a significant relationship between GCV-TP<sub>ic</sub>  
184 levels - *i.e.* the active intracellular form- and the decrease in the neutrophil count was  
185 reported.

186 In our population of 22 adult renal transplant patients, an important interindividual variability  
187 in the exposure to valganciclovir was calculated. Observed T<sub>max</sub> was reached at about 1.7  
188 ±0.9h with a concentration of about 5900 ±3600ng/mL for GCV<sub>p</sub> and a mean trough  
189 concentration of 1000 ±1200ng/mL. These values were consistent with those previously  
190 reported in similar populations,(92, 93) or in a review article that reported valganciclovir  
191 maximum plasma concentration of 3100 ±800 ng/mL after a dose of 450 mg and of 6600  
192 ±1900 ng/mL after a dose of 900 mg with a T<sub>max</sub> of 3.0 ±1.0 hours.(94)

193 A nonparametric approach was chosen to describe the PKs of both the plasmatic and the  
194 intracellular forms of ganciclovir. Briefly, this approach doesn't make the assumption that PK  
195 parameters are normally distributed (or that any bimodal distribution could exist), but  
196 provides an estimate of the whole probability distribution of these PK parameters. It is  
197 recognized that this approach better describes the POPPK parameters than parametric  
198 methods when distributions are non-Gaussian and when the studied population is rather  
199 small (here n=22 patients).(95–97)

200 Little is known about the intracellular outcome of ganciclovir. For GCV-TP<sub>ic</sub>, we have  
201 observed that T<sub>max</sub> was reached at about 3h with a concentration of about 6 ng/mL and a  
202 mean trough concentration of about 1.5ng/mL per million PBMC. But, a huge interindividual  
203 variability was observed.

204 Through a multiple linear regression analysis, we found an association between the  
205 decrease in the neutrophil count during the first 3 months of treatment and the GCV-TP<sub>ic</sub>  
206 exposure. Precisely, the main exposure indices to GCV-TP<sub>ic</sub> were significant in the univariate  
207 analysis ( $C_{\text{trough}}$ ,  $C_{\text{max}}$  and  $AUC_{0-5h}$ ), and finally the single significant covariate was  $AUC_{0-5h}$  in  
208 the multivariate analysis. This was not the case for the exposure to GCV<sub>p</sub>, as previously  
209 reported (4).

210 Thirty years ago, Smee et al. observed *in vitro* that GCV-TP<sub>ic</sub> could persist in cells for 18  
211 hours after exposure to ganciclovir, and that ganciclovir excretion from cells was very  
212 slow.(98) These authors wrote that “presumably, higher toxicity in these cell lines [HET and  
213 MET cell lines] may be correlated with higher levels of intracellular nucleoside triphosphate”.  
214 Moreover, in cells transfected with the viral thymidine kinase treated with ganciclovir,  
215 Halloran et al. showed that the triphosphorylated form of ganciclovir is incorporated into the  
216 cellular DNA and arrests the cell cycle.(99) Our result supports these hypotheses.

217 Therefore the correlation between the  $AUC_{0-5h}$  of GCV-TP<sub>ic</sub> and the neutrophil slope values  
218 is quite poor. For example several patients have an  $AUC_{0-5h}$  of about 30 ng\*h/mL/10<sup>6</sup> cells  
219 with a slope of neutrophil count decreasing from 0.02 to 0.1G/L/day. It is likely that this  
220 biomarker is not the main one and other variables may play also a role in the decrease of  
221 neutrophil count.

222 More precisely, the role of ganciclovir and GCV-TP<sub>ic</sub> membrane transporters is probably  
223 important and is certainly involved in this variability among patients. Adachi et al. have  
224 reported that the multidrug resistance protein 4 (MRP4) is involved in intracellular ganciclovir  
225 efflux.(100) In a population of 206 renal transplant patients we have identified a single  
226 nucleotide polymorphism (SNP) (known to decrease MRP4 activity (101)) that favors  
227 ganciclovir accumulation in neutrophils. In this study, it was observed that the decrease in  
228 neutrophil count was more pronounced in patients carrying this SNP. (102)

229 This study presents some limits. This is a monocentric study that has included only 22 renal  
230 transplant patients. More patients would certainly help to reach more meaningful conclusions  
231 concerning the correlation between AUC values and the slope of neutrophil count.

232 Additionally, while the neutrophil count was measured many times in each patient, the  
233 exposure to ganciclovir was measured only during the third month after drug introduction and  
234 the valganciclovir dose, adapted according their creatinine clearance, may have changed  
235 during the treatment. This change was not reported and only the morning ganciclovir dose  
236 before the PK sampling was taken in account. A longitudinal follow-up with multiple  
237 measurements of ganciclovir exposure should be performed in further studies.

238 While valganciclovir is widely used as CMV prophylactic or curative treatment, its  
239 hematological toxicity limits its efficacy. A classical therapeutic drug monitoring based on the  
240 measurement of  $GCV_p$  is probably unable to detect this toxicity. The results of the present  
241 study suggest that the measurement of  $GCV-TP_{ic}$  could better anticipate a decrease in the  
242 neutrophil count. The combination of this biomarker together with the pharmacogenetic  
243 information about the transporters involved in the accumulation of ganciclovir into the cells  
244 could probably be helpful.

245

246

247 **FUNDING**

248 This work was supported by the French Ministry of Health, the Hospital of Limoges and the  
249 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm). The funders had no role  
250 in study design, data collection, analysis, decision to publish or preparation of the  
251 manuscript.

252

253 **TRANSPARENCY DECLARATIONS**

254 None to declare.

255

256 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

257 **BILLAT P-A:** Main Author

258 **WOILLARD J-B:** Pharmacokinetics

259 **ESSIG M:** Inclusion of renal transplant patients

260 **SAUVAGE F-L:** Analytical chemistry

261 **PICARD N:** Pharmacogenetics

262 **ALAIN S:** Virology

263 **NEELY M:** Modeling

264 **MARQUET P:** Second investigator

265 **SAINT-MARCOUX F:** Principal investigator

266

267

268

269 **LIST OF TABLES AND FIGURES**

270

271 Table 1: Patients characteristics

272 Table 2: Observed exposure indices to ganciclovir

273 Table 3: Population pharmacokinetic parameters

274 Table 4: Multiple linear regression analysis investigating the effect of covariates on the slope  
275 of neutrophil count.

276

277 Figure 1: Pharmacokinetic model

278 Figure 2: Pharmacokinetic profiles. Ganciclovir plasma (A), intracellular ganciclovir (B),  
279 ganciclovir monophosphate (C) and ganciclovir triphosphate (D). Crosses represent  
280 observed ganciclovir concentrations. Solid lines represent the median line indicating the  
281 general data trend and dashed lines the 10<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> percentiles.

282 Figure 3: Relationship between AUC<sub>0-5h</sub> of GCV-TP and the neutrophil count after 3 months  
283 of oral valganciclovir treatment.

284 Supplemental Figure S1: Goodness-of-fit plots of the pharmacokinetic model. Ganciclovir  
285 plasma (A), intracellular ganciclovir (B), ganciclovir monophosphate (C) and ganciclovir  
286 triphosphate (D).

287

288 Table 1- Patients characteristics after introduction of valganciclovir treatment and at the day  
 289 of PK sampling (3 months after introduction of the treatment).

<b>Variables</b>	<b>Patients n=22</b>	
Age (years)	57.5 [25-76]	
Sex M/F	18/4	
Valganciclovir dose 450/900mg	19/3	
Mycophenolate mofetil Yes/No	12/10	
Creatinine Clearance (mL/min)	45.7 [18.8-95.7]	
CMV serology + / -	10/12	
	<b>First blood sample after drug introduction</b>	<b>Blood sample at PK sampling</b>
Hemoglobin concentration (g/L)	11.55 [7.85-13.7]	12.05 [9.29-15.6]
Platelets (10 <sup>9</sup> /L)	198 [117-532]	204 [139-337]
Lymphocytes (10 <sup>9</sup> /L)	1.63 [0.35-5.44]	1.51 [0.28-3.59]
Neutrophils (10 <sup>9</sup> /L)	5.31 [1.78-8.88]	3.85 [0.6-8.04]

290

291 Data are given as median [range]

Table 2- Observed exposure indices to ganciclovir

<i>Valganciclovir dose (mg)</i>	<b>Plasma GCV<sub>p</sub></b>			<b>GCV<sub>ic</sub> (per 10<sup>6</sup> cells)</b>			<b>GCV-MP<sub>ic</sub> (per 10<sup>6</sup> cells)</b>			<b>GCV-TP<sub>ic</sub> (per 10<sup>6</sup> cells)</b>		
	<i>450 QD</i>	<i>450 BID</i>	<i>All</i>	<i>450 QD</i>	<i>450 BID</i>	<i>All</i>	<i>450 QD</i>	<i>450 BID</i>	<i>All</i>	<i>450 QD</i>	<i>450 BID</i>	<i>All</i>
AUC <sub>0-5h</sub> (ng*h/mL)	17134 ±14826	34402 ±16727	19488 ±12060	5.42 ±3.56	3.69 ±3.25	5.18 ±3.50	4.90 ±5.72	3.72 ±2.83	4.76 ±5.41	16.3 ±13.3	26.3 ±14.1	19.3 ±14.4
Trough level (ng/mL)	740 ±993	2187 ±1736	993 ±1247	0.36 ±0.46	0.25 ±0.23	0.31 ±0.36	0.11 ±0.20	0.17 ±0.25	0.15 ±0.22	1.48 ±1.49	1.82 ±1.52	1.56 ±1.51
Cmax (ng/mL)	5466 ±3416	8723 ±4100	5910 ±3593	1.77 ±1.16	1.36 ±1.45	1.71 ±1.17	1.99 ±1.86	1.25 ±0.95	1.90 ±1.77	5.42 ±4.37	9.88 ±5.78	6.03 ±4.69
Tmax (h)	1.58 ±0.84	2.33 ±1.15	1.68 ±0.89	2.25 ±1.07	3.33 ±1.53	2.39 ±1.16	3.4 ±1.30	4 ±1.41	3.47 ±1.28	2.95 ±0.91	3.67 ±1.15	3.04 ±1.29

Results are given as mean ± standard deviation; Intracellular values (GCV<sub>ic</sub>, GCV-MP<sub>ic</sub> and GCV-TP<sub>ic</sub>) are expressed per 10<sup>6</sup> cells; AUC is the Area under the Curve; Cmax is the maximal concentration; Tmax is the time at which Cmax is obtained; 19 patients were given 450mg and 3 were given 900mg at the day of sampling.



Table 3- Population pharmacokinetic parameters

Parameter	Unit of measure	Final model parameter estimate
Ka	h <sup>-1</sup>	0.35 (0.05-1.0)
CL/F	L/h	0.58 (0.4-1.8)
V1/F	L	32 (fixed parameter)
V2/F	L	40.17 (37-42)
K12	h <sup>-1</sup>	0.016 (0.01-0.09)
K21	h <sup>-1</sup>	72.96 (20-85)
V3/F	L	22.55 (12-25)
K23	h <sup>-1</sup>	1.48 (0.2-2.5)
K30	h <sup>-1</sup>	1.18 (0.1-10)
V4/F	L	1.48 (1-6)
K34	h <sup>-1</sup>	8.74 (2-12)
K43	h <sup>-1</sup>	18.85 (10-50)
K40	h <sup>-1</sup>	1.28 (0.1 ,6.5)
Lag time	h	0.0735 (0-0.94)

Data are given as median [range]; CL/F is the apparent clearance of ganciclovir;  $K_{n,n+1}$  is the rate constant from compartment n to compartment n+1; 1 refers to ganciclovir in plasma, 2 refers to intracellular ganciclovir, 3 refers to GCV-MP<sub>ic</sub> and 4 to GCV-TP<sub>ic</sub>; V(1, 2, 3 ,4) are the apparent volumes of distribution for the 4 compartments.

Table 4- Multiple linear regression investigating the effect of covariates on the slope of neutrophil count.

Variable	Category	Slope of the neutrophil count ( $\beta \pm SD$ )	p value
Age	Per year	$-6.0 \cdot 10^{-4} \pm 6.10^{-4}$	0.34
Creatinin clearance	mL/min	$-3.2 \cdot 10^{-5} \pm 5.10^{-4}$	0.95
CMV seropositivity	Yes vs No	$-3.4 \cdot 10^{-3} \pm 0.015$	0.82
MMF dose	per mg	$-1.54 \cdot 10^{-6} \pm 2.10^{-5}$	0.93
valganciclovir dose	450mg QD vs 450mg BID	$-1.5 \cdot 10^{-5} \pm 5.10^{-5}$	0.76
<b>GCV<sub>p</sub> in plasma</b>			
AUC <sub>0-5h</sub>	ng*h/mL	$1.1 \cdot 10^{-7} \pm 7.10^{-7}$	0.88
Cmax	ng/mL/10 <sup>6</sup> cells	$-1.4 \cdot 10^{-7} \pm 2.10^{-6}$	0.95
Ctrough	ng/mL/10 <sup>6</sup> cells	$-5.8 \cdot 10^{-6} \pm 6.10^{-6}$	0.34
<b>Intracellular GCV<sub>ic</sub></b>			
AUC <sub>0-5h</sub>	ng*h/mL/10 <sup>6</sup> cells	$4.0 \cdot 10^{-4} \pm 0.003$	0.88
Cmax	ng/mL/10 <sup>6</sup> cells	$1.2 \cdot 10^{-3} \pm 0.01$	0.90
Ctrough	ng/mL/10 <sup>6</sup> cells	$-0.015 \pm 0.005$	0.43
<b>Intracellular GCV MP<sub>ic</sub></b>			
AUC <sub>0-5h</sub>	ng*h/mL/10 <sup>6</sup> cells	$1.1 \cdot 10^{-4} \pm 9.10^{-4}$	0.90

Cmax	ng/mL/10 <sup>6</sup> cells	2.1.10 <sup>-3</sup> ±0.003	0.94
Ctrough	ng/mL/10 <sup>6</sup> cells	-0.035±0.02	0.05
<b>Intracellular GCV TP<sub>ic</sub></b>			
AUC <sub>0-5h</sub>	ng*h/mL/10 <sup>6</sup> cells	-1.9.10 <sup>-3</sup> ±5.10 <sup>-4</sup>	<0.01
Cmax	ng/mL/10 <sup>6</sup> cells	-6.5.10 <sup>-3</sup> ±0.002	<0.01
Ctrough	ng/mL/10 <sup>6</sup> cells	-0.011±0.005	0.03

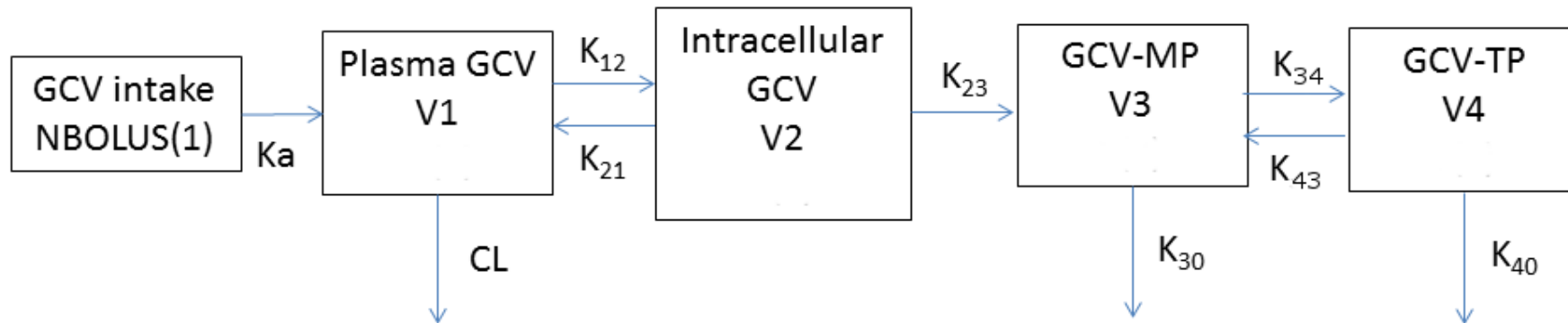


Fig1. Overview of the developed model

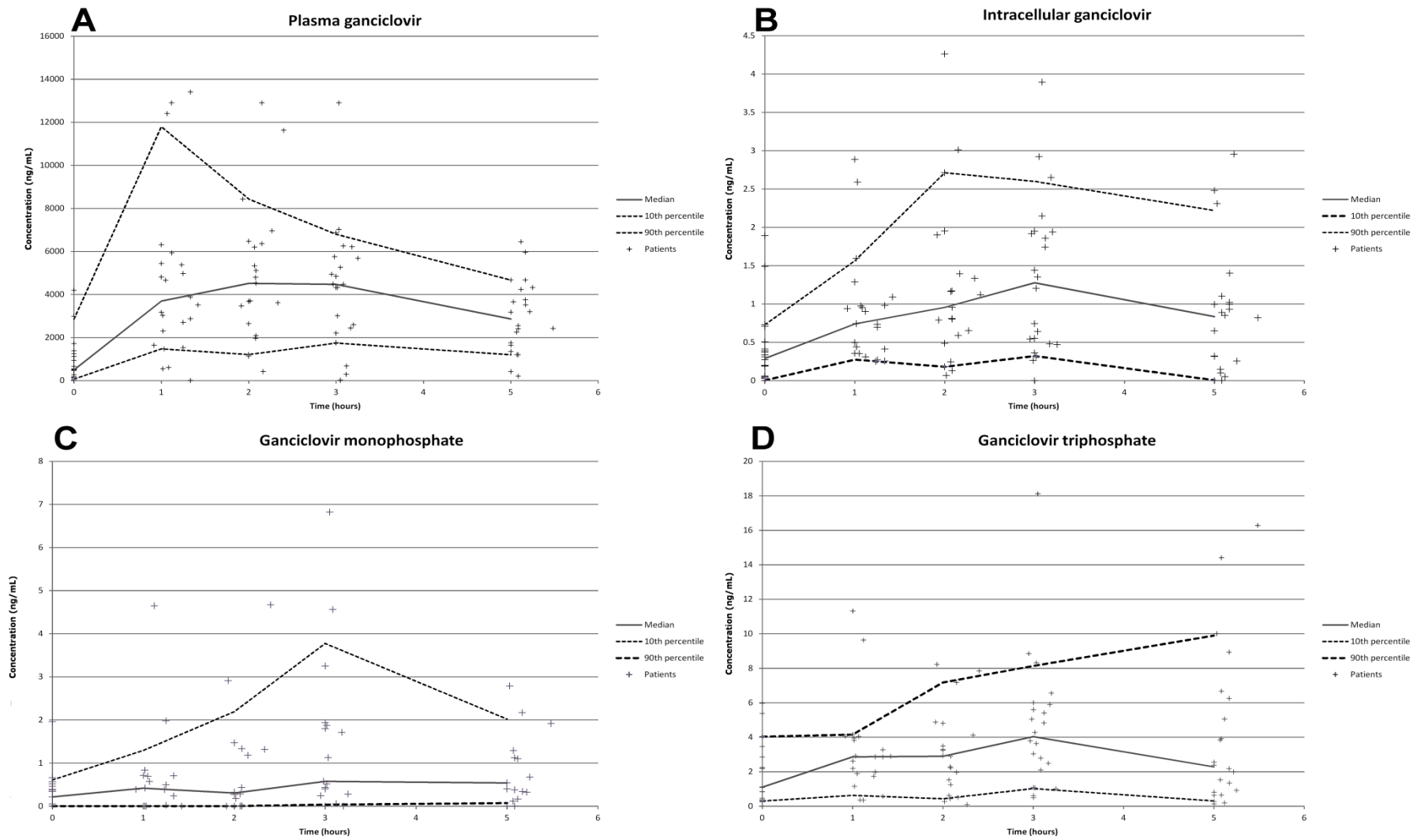


Fig2. Ganciclovir serum (A) intracellular ganciclovir (B) ganciclovir monophosphate (C) and ganciclovir triphosphate (D) concentrations versus time postdose following oral administration of VGCV in renal transplant patients.

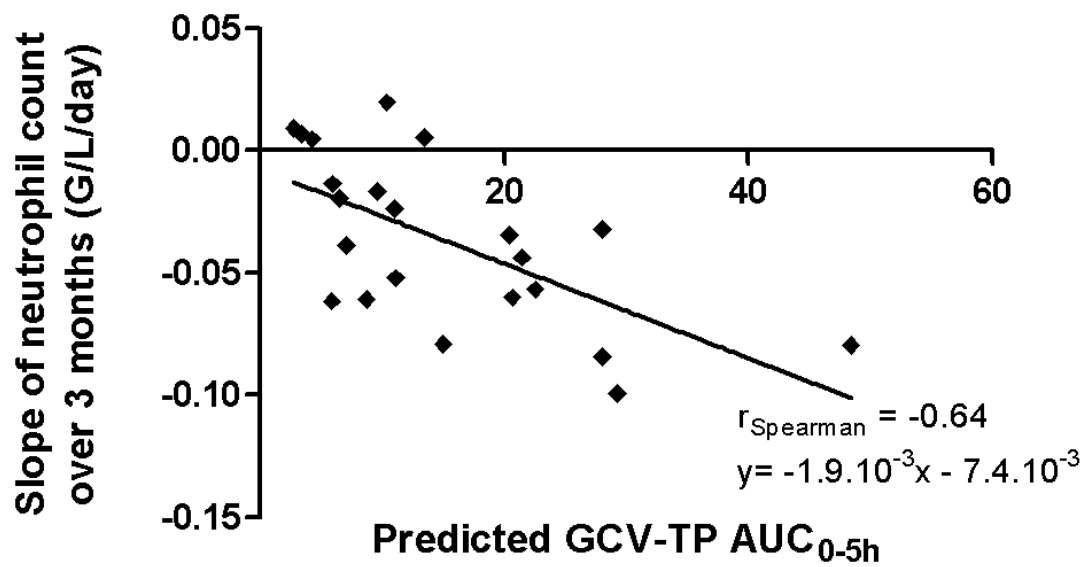
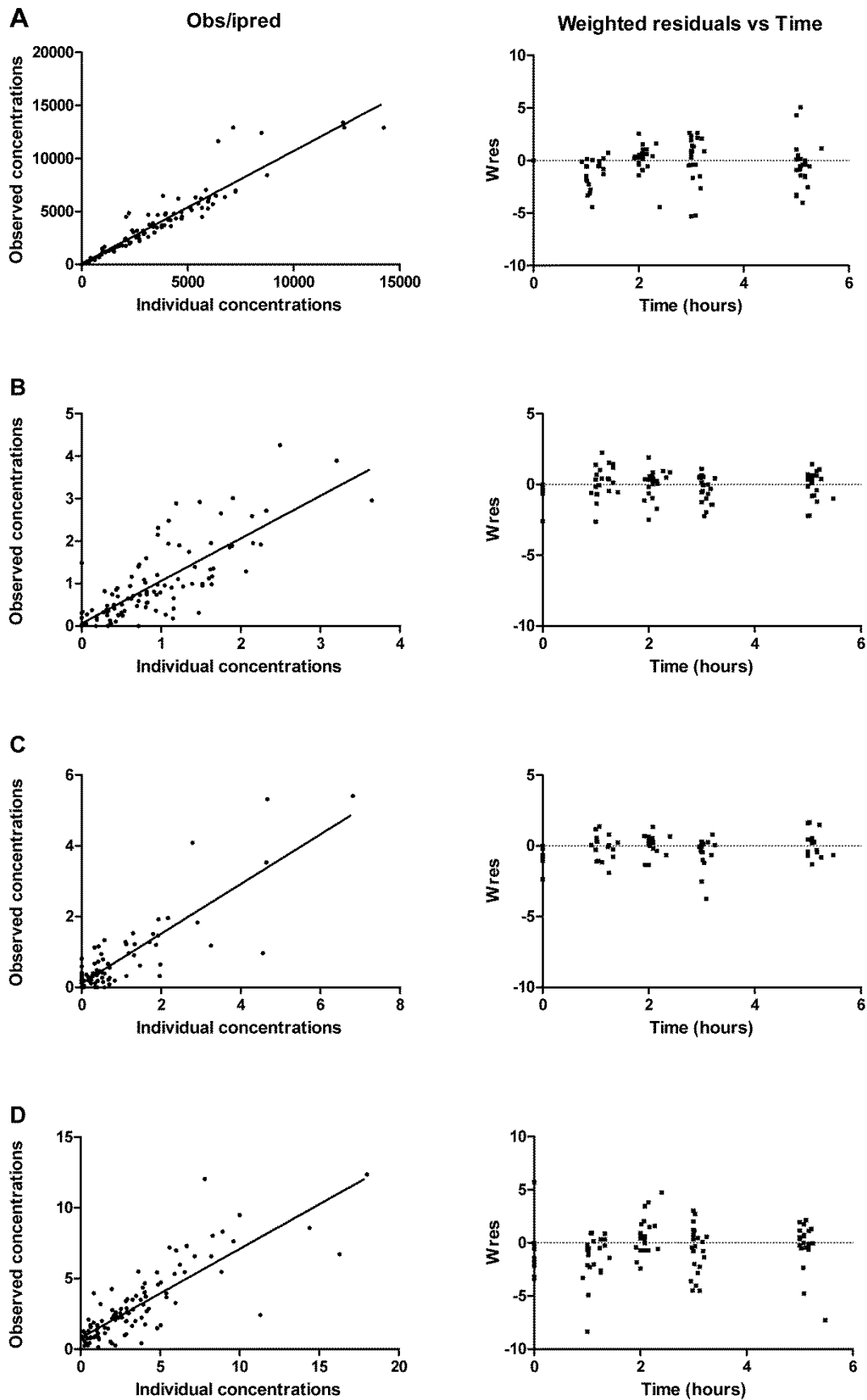


Fig.4 Relationship between AUC<sub>0-5h</sub> of GCV-TP and the neutrophil count after 3 months of oral VGCV treatment.

Fig3. Relationship between the modeled AUC<sub>0-5h</sub> of GCV-TP and the neutrophil count after 3 months of oral VGCV administration in renal transplant patients.



FigS1. Goodness-of-fit plots for the population pharmacokinetics mode

## **II.2. Etude d'association entre l'influence des polymorphismes de protéines de transport sur la survenue des effets indésirables hématologiques du ganciclovir en transplantation rénale**

### **II.2.1. Contexte et objectif**

Dans le cadre de cette thèse nous avons souhaité étudier les facteurs de risque pharmacogénétique de survenue des effets indésirables hématologiques du GCV. Le GCV n'étant pas métabolisé, nous nous sommes intéressés à l'étude de ses transporteurs membranaires. Cette étude a été plus spécifiquement focalisée sur les transporteurs exprimés au niveau des cellules sanguines. En effet, en transplantation rénale, l'élimination rénale du GCV est sous la dépendance du greffon. Les transporteurs membranaires présents à ce niveau dépendent du génome du donneur et non de celui du receveur étudié dans ce travail.

La recherche des variations génétiques influençant la réponse au médicament définit ce domaine de recherche en plein essor qu'est la pharmacogénétique (PG).

Le bénéfice de la PG en routine clinique est maintenant établi dans plusieurs domaines pharmacothérapeutiques. La modification de l'activité d'un transporteur liée à la présence d'une variation génétique peut potentiellement entraîner d'importantes variations dans l'absorption, la distribution et l'élimination d'un principe actif. Aujourd'hui des recommandations internationales imposent l'étude du rôle de plusieurs transporteurs lors du développement de nouvelles molécules. Les recommandations les plus récentes ont été émises par l'International Transporter Consortium (103). La présence de certains polymorphismes sur des transporteurs pourrait modifier le devenir du principe actif. Parmi les transporteurs dits d'intérêt, les agences européenne (EMA) et états-unienne (FDA) conseillent d'étudier au sein des transporteurs d'efflux : la P-glycoprotéine (P-gp; MDR1, *ABCB1*), la breast cancer resistance protein (BCRP; *ABCG2*); la bile-salt export pump (BSEP ou SPGP; *ABCB11*) et les multidrug resistance proteins (MRP; *ABCC*).

Ces agences conseillent également d'étudier au sein des transporteurs d'influx : les organic anion transporters 1 et 3 (OAT1 ; *SLC22A6* ; OAT3 ; *SLC22A8*) ; l'organic cation transporter 1 et 2 (OCT1; *SLC22A1* ; OCT2; *SLC22A2*); la multidrug and toxin extrusion protein 1 et 2-K (MATE1; *SLC47A1* ; MATE2-K ; *SLC47A2*); deux membres de la famille des OATP (OATP1B1 ; *SLCO1B1* ; OATP1B3 ; *SLCO1B3*).



L'un des rares exemples pharmacogénétique concernant les transporteurs qui fait l'objet d'une application de routine concerne l'OATP1B1. L'analyse de son polymorphisme génétique peut être utile dans certaines circonstances pour prévenir le risque de toxicité musculaire lors d'un traitement par simvastatine. Des recommandations ont été émises par le CPIC (clinical pharmacogenomics implementation consortium)(104).

A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à la pharmacogénétique du GCV en transplantation.

## **II.2.2. Methodologies mises en œuvre dans ce travail**

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. Dans ce travail nous avons eu recours à deux types de techniques, plus anciennes, dont l'utilisation est encore très répandue. Celles-ci sont décrites ci-dessous.

### **II.2.2.1 Le génotypage par PCR en temps réel Taqman®**

Le principe général de la PCR dite « 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 génotypage (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 « variante »), marquées par des fluorochromes spécifiques).

Les sondes Taqman<sup>®</sup> sont conçues pour avoir la complémentarité optimale avec les séquences cibles (sauvage et variante). 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<sup>®</sup> est appelée ainsi en raison du mode de fonctionnement de la Taq polymérase (activité exonucléasique) rappelant le jeu PacMan<sup>®</sup>.

La sonde Taqman<sup>®</sup> 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 (un fluorophore breveté) et des 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.

Les résultats sont représentés sur des graphiques de type Scatter (figure 15)

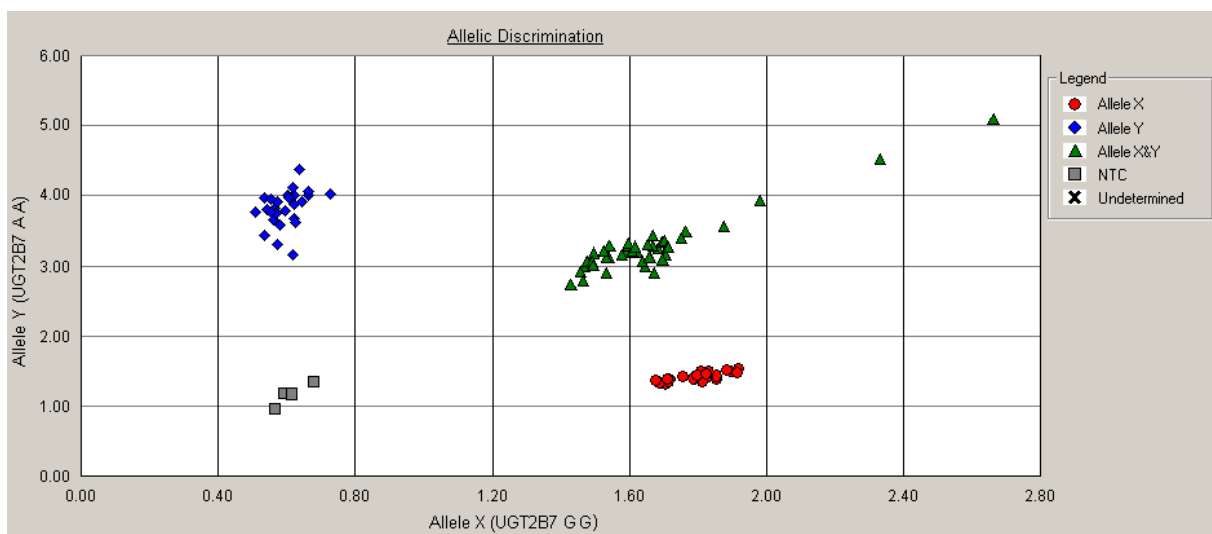


Figure 15 : Résultat de génotypage de 96 patients sur ABI Prism 7000® du SNP c.-840G>A au niveau du gène UGT2B7

*(en rouge les patients homozygotes « sauvages », en vert les hétérozygotes et en bleu les patients homozygotes variants, les contrôles négatifs sont signalés par des rectangles gris).*

### **II.2.2.2 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 d'un agent intercalant comme le 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.

Cette technique a évolué, entre autres sous la forme de séquençage capillaire. Les résultats sont alors donnés sous la forme suivante (Figure 16).

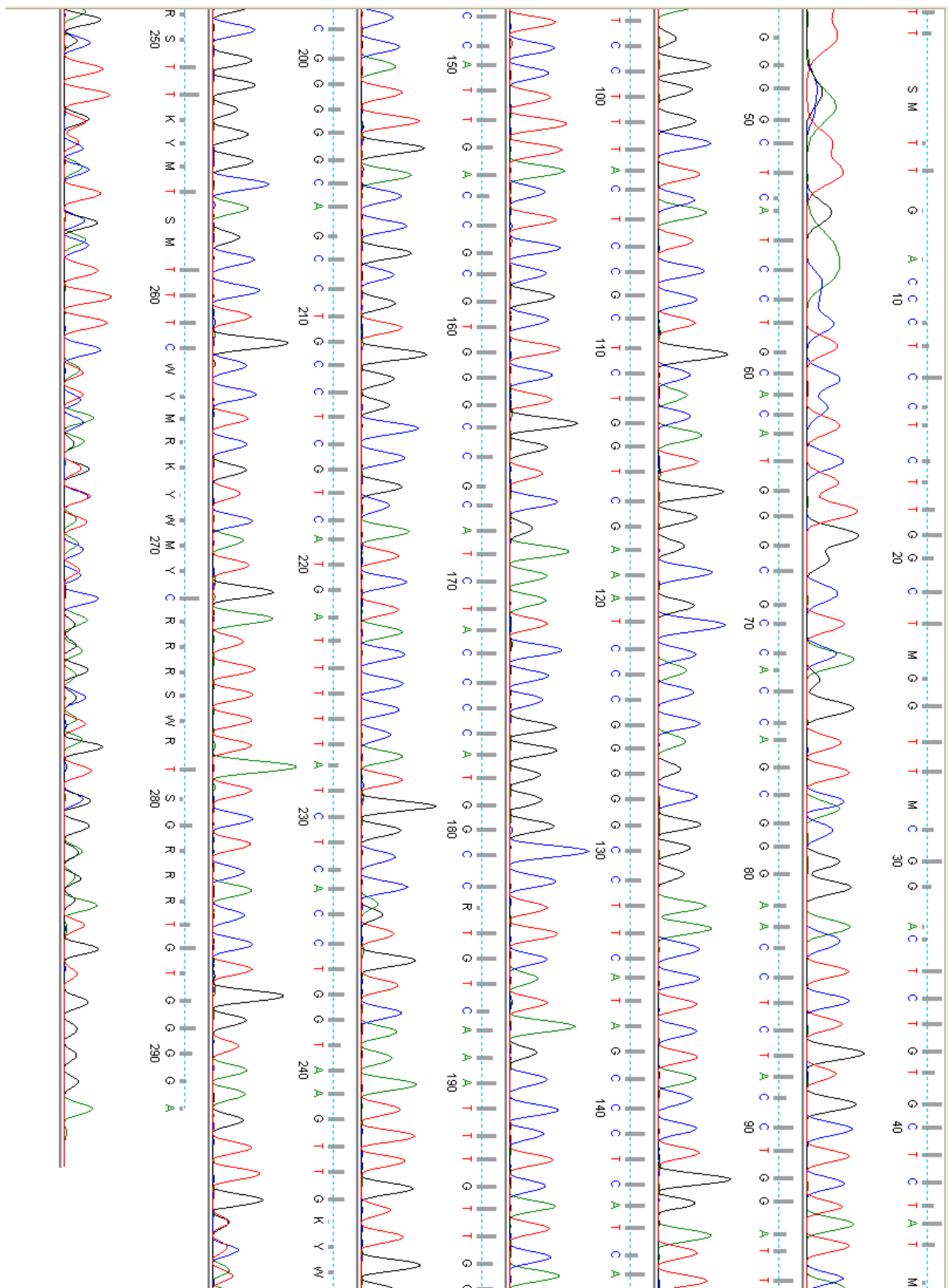


Figure 16: Exemple de résultat de pyroséquençage d'une partie exonique du gène SLC22A1 (séquence de référence)

### **II.2.3. Pharmacogènes étudiés**

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 ses métabolites phosphorylés au sein de la cellule pouvant entraîner une accumulation intracellulaire excessive ou diminuée.
- Une altération du fonctionnement des kinases cellulaires prenant en charge le GCV monophosphorylé (GCV-MP) par la kinase virale.

Ces dernières étant mal connues nous nous sommes concentrés sur l'étude des transporteurs.

#### **II.2.3.1 Classification des grandes familles de transporteurs**

Si la majorité des transporteurs sont impliqués dans le transport de substances endogènes à l'instar des glucides, acides aminés et neuromédiateurs 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 ». D'autres assurent une diffusion « facilitée » ou un transport « secondairement actif » (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.

##### **II.2.3.1.1. Les SLC**

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 (105)...

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 statines et le méthotrexate (106).

- Les transporteurs de cations organiques :

- OCT codés par les gènes *SLC22A* (comme les OAT) impliqués dans le transport d'antinéoplasiques, d'antagonistes histaminiques, de la metformine et d'antiviraux comme l'aciclovir, la lamivudine et le GCV

- Les transporteurs de carnitine OCTN sont également codés par les gènes *SLC22A* qui transportent la quinidine, la L-carnitine et le vérapamil (107).

Récemment des transporteurs de bases nucléiques ENT et CNT (Equilibrative et Concentrative Nucleoside Transporters) codés respectivement par les gènes *SLC29A* et *SLC28A* ont été identifiés. 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 (108). Il a été montré, également, que des analogues des bases nucléotidiques comme la gemcitabine et la zidovudine étaient substrats de CNT1 et que la ribavirine était substrat de CNT2 (109). 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 (110), de composés tels que la guanidine, thiamine et de médicaments : metformine, cimétidine et aciclovir (111).

### **II.2.3.1.2. Les ABC**

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*, *ABCF* 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 molécules 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 (112). Également 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). Köck et al. listent leurs principaux substrats (113), on retiendra parmi les xénobiotiques : pour les transporteurs MRP1 et MRP2 des antirétroviraux inhibiteurs de la protéase, des anticancéreux dont le méthotrexate et plus spécifiquement 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 PME A, 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...

### **II.2.3.2 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 bibliographique 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 3.

Tableau 3: 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

A titre d'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 (100). 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 ( $CI_{50}$  60 $\mu$ M *versus* 12  $\mu$ M).

**De par son expression importante au niveau des cellules sanguines et des cellules souches hématopoïétiques et ses importantes variabilités génétiques (101), MRP4 représentait 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 »)(114). 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) devait 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 (114).

#### **II.2.4. Etude d'association entre des polymorphismes de transporteurs et la toxicité hématologique du GCV**

***A pharmacogenetic study identifies the Multi-drug Resistance Associated Protein 4 (MRP4) as a potential contributor to ganciclovir-induced neutropenia in renal transplant patients.***

BILLAT Pierre-André<sup>a,b</sup>, OSSMAN Tahani<sup>a,b</sup>, SAINT-MARCOUX Franck<sup>a,b,c</sup>, ESSIG Marie<sup>a,b,d</sup>, FABRE Gabin<sup>e</sup>, REROLLE Jean-Philippe<sup>b,d</sup>, KAMAR Nassim<sup>f</sup>, ROSTAING Lionel<sup>f</sup>, MERVILLE Pierre<sup>g</sup>, ETIENNE Isabelle<sup>h</sup>, CHOUKROUN Gabriel<sup>i</sup>, WEESTEL Pierre-Françoise<sup>i</sup>, WOILLARD Jean-Baptiste<sup>a,b,c</sup>, MONCHAUD Caroline<sup>b,c</sup>, MARQUET Pierre<sup>a,b,c</sup>, TROUILLAS Patrick<sup>a,b</sup>, PICARD Nicolas<sup>a,b,c</sup>.

***Authors and affiliations***

a Univ. Limoges, UMR\_S 850, F-87000 Limoges, France.

b INSERM, U850, F-87000 Limoges, France.

c CHU Limoges, Service de pharmacologie, toxicologie et pharmacovigilance, F-87000 Limoges, France.

d CHU Limoges, Service de néphrologie, dialyse et transplantation, F-87000 Limoges, France.

e LCSN—EA1069, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges, 87025 Limoges, France.

f INSERM, U1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse F-31300, France; CHU Toulouse, Hôpital Rangueil, Département de Néphrologie, Dialyse et Transplantation multi-organe, F-31300, France.

g UMR CNRS 5164, CNRS, Service de Néphrologie, Transplantation, Dialyse, CHU Bordeaux, France.

h Department of Nephrology, Rouen University Hospital, and Inserm CIC 0204, Institute of Biomedical Research, University of Rouen, France.

i Nephrology, Dialysis, Transplantation and Intensive Care Department, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Amiens, Jules Verne University, France.

***Corresponding author***

Pr PICARD Nicolas

CBRS, CHU Limoges, Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance

2 rue du Dr Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France.

Tel : +33 5 19 56 42 41

Fax : +33 5 55 43 59 36

***Number of references: 38***

***Number of tables, figures: 3 tables, 3 figures***

***Keywords: ganciclovir, neutropenia, pharmacogenetics, molecular dynamics***

## **Abstract**

Ganciclovir (GCV) helps preventing cytomegalovirus-related diseases in transplant patients. It has adverse hematological effects which lead to dose reduction, thus favoring resistance. We investigated the role of membrane transporter polymorphisms in GCV toxicity on neutrophils in renal transplant recipients from two multicenter cohorts (n=174 and n=96). Experiments using HEK-293T transfected cells were performed to validate the clinical findings. In both cohorts, we found a variant in *ABCC4* (rs11568658) associated with decreased neutrophil counts following GCV prodrug (valganciclovir) administration (exploratory cohort:  $\beta \pm SD = -0.69 \pm 0.25$ ,  $p = 0.015$ ; confirmatory cohort:  $\beta \pm SD = -0.84 \pm 0.29$ ,  $p = 0.004$ ). GCV accumulation was decreased in cells expressing *ABCC4* when compared to control cells transfected with an empty vector (-61%;  $p < 0.0001$ ). Accumulation in cells expressing the rs11568658 variant was similar to that of the negative control. *In silico* simulations showed that GCV passive diffusion is a rather slow process, and GCV partitioning in bilayers is rather high; both results highlight the role of active transport.

## **Introduction**

Infection or reactivation of cytomegalovirus (CMV) is one of the major complications in immunodepressed patients and a leading cause of morbidity and mortality. As the risk of infection is significantly higher in the early post-transplantation period, a prophylactic or preemptive therapeutic strategy using ganciclovir (**Figure 1A**) (GCV, Cymevan<sup>®</sup>, Roche<sup>®</sup>) or its oral prodrug valganciclovir (VGCV, Rovalcyte<sup>®</sup>, Roche<sup>®</sup>) is recommended.

VGCV is rapidly hydrolyzed into GCV in blood. GCV is eliminated unchanged, through renal secretion and filtration. It is phosphorylated into GCV monophosphate by the host and viral (pUL97) kinases. GCV diphosphate and triphosphate are further produced by non-specific cellular kinases(115–117).

GCV induces several adverse hematological effects and mainly neutropenia(118). Such toxicity leads to premature discontinuation of the treatment or to lowering the dose but systemic exposure to the drug might not be a critical matter of concern: Wiltshire et al. reported a weak association between the plasmatic area under the curve of GCV and hematological toxicity(4) but the toxicity also concern patients receiving low doses of GCV with no clear association with plasma exposure(94, 119). In 22 renal transplant patients, we found no association between GCV plasma exposure (evaluated as area under GCV concentration-time curve ( $AUC_{0-5h}$ )) and the evolution of the neutrophil concentration ( $p=0.44$ ). In contrast, a significant association was found between the  $AUC_{0-5h}$  of intracellular GCV-triphosphate concentrations (the terminal active GCV metabolite) and the decrease in neutrophil count over the first 3 months of treatment ( $\beta=-0.0019 \pm 5.10^{-4}$ ,  $p<0.01$ ) (personal data, in press for publication) supporting the hypothesis that mechanisms of GCV or GCV metabolites intracellular accumulation might play a role in the toxicity.

Despite its extensive clinical use, GCV membrane crossing has not been much documented so far and it is still under debate. Purine nucleobase carriers and nucleoside transporters were involved to rationalize GCV influx in human erythrocytes, apparently showing inability to cross membranes by non-facilitated diffusion(114). More recently, facilitated diffusion was proposed as a mechanism of GCV penetration in rabbit retina and human retinal pigmented epithelium cells(120), carrier-

mediated transport process being preclude. Simple passive diffusion was even suggested in the maternal-fetal placental(121, 122).

Based on the hypothesis that genetic variability in GCV membrane transporters could play a role in intracellular drug accumulation, which might in turn contributes to GCV hematological toxicity, we investigated the association between functional polymorphisms in a selected panel of candidate transporters and the risk of GCV-induced neutrophil toxicity in renal transplant recipients. In order to better understand the mechanism of GCV membrane crossing we studied interactions, penetration, and accumulation of GCV in lipid membranes using molecular dynamics (MD) simulations and through calculation of free-energy profiles.

## Results

### *Association of membrane transporter polymorphisms with GCV neutrophil toxicity*

#### - Genotyping distribution and allele frequencies

Genotype distributions and allele frequencies in the exploratory study are given in **Table 1**.

Distributions of the genotypes were in Hardy–Weinberg equilibrium (**Table 1**) and allelic frequencies were similar to those reported in the literature for Caucasians (see **supplemental Table 1**). As previously described, *ABCB1* SNPs were in strong linkage disequilibrium ( $D'$  rs1128503 - rs2229109 = 0.996;  $D'$  rs1128503 - rs1045642 = 0.726;  $D'$  rs2229109 - rs1045642 = 0.786)(123).

#### - Neutropenia incidence

Among all patients treated with ganciclovir, twelve patients in the exploratory study (7%) and six patients in the confirmation study (6%) experienced at least one episode of neutropenia defined as an absolute neutrophil count  $<1.10^6$  cells/mL.

#### - Associations with neutrophil count decrease in the exploratory group

The results of the exploratory study are presented in **Table 2**. Among the 21 tested covariates, 7 were included in the multivariate model. In the final multivariate model, four covariates were significantly associated with the evolution of neutrophil count: rs2229109 in *ABCB1*, rs11568658 in *ABCC4*, rs2231137 in *ABCG2* and rs10868138 in *SLC28A3*. No significant association with co-treatments and the dose of GCV was found (**Table 2**).

#### - Associations with neutrophil count decrease in the confirmation group

The SNPs found as significant in the exploratory cohort were investigated in the confirmation cohort. Among the 4 tested SNPs (rs2229109, rs11568658, rs2231137 and rs10868138), 2 were retained in the final model: *ABCC4*-rs11568658 ( $p=0.007$ ) and *ABCB1*-rs2229109 ( $p=0.06$ ). In the multivariate analysis, *ABCB1* rs2229109 and *ABCC4* rs11568658 were significantly associated with the evolution of neutrophil count (G/A vs G/G:  $\beta\pm SD = -0.82\pm 0.39$ ,  $p=0.034$  and G/T vs G/G  $\beta\pm SD = -0.84\pm 0.29$ ,  $p=0.004$ , respectively)



### *Transport of GCV in Jurkat and MRP4-expressing cells*

- Accumulation of GCV in Jurkat cells in the presence of the MRP inhibitor MK-571.

GCV ( $20 \text{ mg.L}^{-1}$ ) accumulation in Jurkat cells was enhanced when co-incubated with the inhibitor of the MRP family MK-571. The effect was only significant for incubations performed during 90 seconds (**Figure 2**;  $p_{\text{Mann-Whitney}} < 0.001$ ).

- Effect of rs11568658 on the accumulation of GCV in *ABCC4*-transfected cells

GCV ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ) was incubated with HEK293T cell transfected with *ABCC4* reference and variant (rs11568658) sequences. After 1 min incubation, GCV concentration was significantly higher in cells expressing MRP4 variant than in those expressing the reference MRP4 (+290%,  $p_{\text{Mann-Whitney}} < 0.0001$ ) (**Supplemental Figure 1**). The accumulation of GCV in MRP4 variant transfected cells was similar to that observed in cells transfected with an empty vector ( $p=0.18$ ).

### *Molecular dynamics of GCV transport across membranes*

- Location of GCV in the bilayer

Whatever the starting location of GCV, the free MD simulations systematically show the drug lying inside the lipid bilayer at  $1.5 \pm 0.6 \text{ nm}$  from the center of the membrane, that is close to the polar head group region (**Figure 1B**). When starting outside of the bilayer (i.e., in the water phase), the penetration occurs quickly (within ca. 80 ns). The equilibrium position is driven by interactions existing between GCV and the highly polar surface both Coulomb interaction and hydrogen bonding. A thorough analysis of the distribution in position of GCV shows no difference in location of both the aromatic rings and the aliphatic moieties ( $1.6 \pm 0.6$  and  $1.5 \pm 0.7 \text{ nm}$  from the center of the membrane, respectively). This indicates that the drug is roughly parallel to the bilayer surface. The distribution of the angle between the vector defined by the C=O bond and z-axis exhibits a maximum at around  $30^\circ$  (**Supplemental Figure 2**), indicating a preferred orientation of the keto group toward the polar head groups of the bilayer. In any event, much fluctuation is observed, as confirmed by the broad angle distribution (**Supplemental Figure 2**).

Interestingly when artificially increasing concentration, namely inserting ten GCV molecules in the simulation box, supramolecular arrangements were observed. Such a situation corresponds to drug accumulation if any. At the early stage of the 1 $\mu$ s MD simulation, the drugs interacted forming non-covalent aggregates. The average location of GCV within such aggregates (1.6 $\pm$ 0.6 nm from the center of the membrane, see **Figure 1C**) is not dramatically modified compare to that of the non-interacting compounds. However the standard deviation, highlighting fluctuation, is slightly higher pointing out that in such aggregate some compound are somehow pushed deeper in the bilayer, whereas other are stuck to the membrane surface (**Figure 1C**). The driving force of the formation of non-covalent dimer and then n-mer aggregates appears to be  $\pi$ -stacking interactions between aromatic rings, with interatomic distance of ca. 3.9 Å (**Supplemental Figure 3**), typical of DNA nucleobase stacking.

- Kinetics of GCV penetration

The free energy profile of GCV penetration/crossing indicates that penetration is spontaneous (negative free energy of penetration  $\Delta G^{\text{pen}}$ ). A clearly potential well is observed at the equilibrium location described for the center of mass of GCV (ca. 2.2 nm from the center of membrane) (**Figure 3A**). This result does not agree with MD simulations, showing GCV at 1.5 nm from membrane center. However, MD simulation have showed to be more accurate at predicting the exact location of organic compounds with respect to COSMOmic, which more provide an accurate qualitative description(124). The stabilizing free energy inside the membrane with respect to the water phase ( $\Delta G^{\text{pen}}$ ) is  $-2.76 \pm 0.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . This difference in energy corresponds to a partition inside/outside of ca. 98%:2%.

Membrane crossing (i.e., passage through the center of the bilayer) requires a free energy  $\Delta G^{\text{cross}}$  of  $18.6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . Using an Arrhenius-like expression within the transition state theory, the rate constant of membrane crossing is given by:

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{\Delta G^{\text{cross}}}{RT}\right)$$

This law provides an approximation of the rate constant of membrane crossing. An  $18.6 \text{ kcal.mol}^{-1}$  free energy of activation corresponds to rate constant of  $0.52 \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ . Given a concentration of  $1 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ , the mean time of crossing is ca. 20 days. However,  $\Delta G^{\text{cross}}$  is in a critical range, in which an error of  $2 \text{ kcal.mol}^{-1}$  (a typical error expected from theoretical evaluation) may modify the mean time of penetration from 20 hours to more than 1 year. In any event, due to the relatively high free energy barrier, the passive diffusion of GCV appears a rather slow process. Moreover, within the simulation time scale ( $1 \text{ }\mu\text{s}$ ), no flip-flop was observed for all molecules tested.

- GCV-metabolites membrane crossing

As expected, GCV-mono, di and triphosphate metabolites cannot penetrate to lipid bilayer, locating in water phase close to the head polar groups of DOPC at  $d=2.4\pm 0.6\text{nm}$  (**Figure 1D**). The stable position outside the membrane of the metabolites is attributed to the negative charge, which dramatically increases the electrostatic interactions with water and polar head groups of membrane and then limits penetration. Penetration/crossing of GCV metabolites is even more unlikely,  $\Delta G^{\text{cross}}$  being 79, 94 and  $103 \text{ kcal.mol}^{-1}$  for the mono-, di- and triphosphate, respectively (**Figure 3B**).

## Discussion

This study provides direct evidence that GCV is a substrate of the efflux transporter MRP4 and that the rs11568658 variant is associated with reduced transport of GCV in HEK293T cells. We found a significant decrease of the neutrophil count in renal transplant patients treated with VGCV, carriers of this variant and suggest that this might be the consequence of intracellular drug accumulation. MD simulations showed that GCV passive diffusion is a slow process and that the drug may accumulate in the membrane, which may favor efflux processes, while GCV phosphorylated metabolites are unable to penetrate or to cross cell membranes through diffusion.

Hematological toxicity is a major concern during GCV therapy. GCV can cause marrow toxicity, notably neutropenia that may consequently expose immunosuppressed patients to life-threatening infections. Identifying the risk factors for neutropenia in patients treated with GCV is useful for lowering its incidence and for designing alternative strategies in high-risk patients. In this study, few patients showed acute toxicity to GCV: approx. 6-7% of the patients developed neutropenia, which is relatively low as compared to previous reports in solid organ transplantation (7–68%)(125–127). One explication could be that some of the patients received neutrophil growth factors at the very beginning of the treatment because of a high risk of neutropenia. This has not been specifically reported in the exploratory study and only 5 patients received colony-stimulating factors in the confirmatory study population, which suggest that this was not a common procedure. The weak incidence of acute neutropenia and the absence of international consensus on the neutrophil concentration threshold value in renal transplant patients to defined neutropenia lead us to study the evolution of neutrophil count to evaluate neutrophil toxicity. The main other hematologic adverse event is thrombocytopenia (i.e.  $< 150.10^6/\text{mL}$ ). Its incidence is closed to that of neutropenia(125, 127, 128) .It occurred in 8% (1 patient among 14) and 13% (12 patients among 96) of the patients of the exploratory and confirmatory studies, respectively). Since it is considered as a

less important issue in renal transplant patients, it was not been consistently reported in patient clinical files in the exploratory study and was consequently not studied here.

Renal function state is a major feature in GCV pharmacokinetics, thought to be important for its toxicity. GCV dose is thus generally adapted according to the creatinine clearance. Association between drug dose and neutrophil toxicity is however not clear. Some studies have suggested that high doses lead to a high risk of neutropenia but a formal toxic threshold has not been proposed(94, 125). Other studies found no or poor relationships between GCV exposure or trough concentration and the occurrence of adverse events(4, 129). Here, no association was found between the use of high dose of GCV (>450 mg/j) and the decrease in neutrophil count. This is certainly a result of a correct GCV dose adaptation according to the renal function of each renal transplant patient.

Transplant recipients are at particular risk of hematological toxicity. Specifically, treatments with mycophenolate mofetil or cotrimoxazole are known to increase the risk of neutropenia but they were not associated with neutrophil evolution in this study. A limitation is however that potential changes in the dose of GCV or of the co-treatments were not always reported in the first cohort.

Our hypothesis is that active transport processes of GCV could substantially limit the toxicity by increasing GCV intracellular accumulation in blood cells. Little is known about GCV transport through membrane cells. Among the numerous techniques used to probe drug-membrane interactions, MD simulation is more and more employed with success. When using the proper models and methodologies, the behavior of drug-membrane systems can be accurately evaluated, namely to capture interaction details at the molecular scale and to extract thermodynamic properties. Regarding GCV, we found that the drug most probably accumulates in membranes, therefore multiplying the number of “crossing” events. This is in agreement with the rather high polarity of GCV ( $\log P = -1.65$ ), but also with its amphiphilic character. Accumulation in the inner leaflet may constitute a reservoir of drug prior to delivery inside the cells. In this accumulating region, close to the inner surface, GCV may also be actively flushed out by ABC transporters.

As far as GCV reaches the inner cell compartment, penetration back to the bilayer is feasible, roughly according to a 98%:2% ratio.

To perform a relevant pharmacogenetic study, we aim at selecting genes that may be involved in GCV transport (efflux or influx) in blood cells. As GCV is an analogue of puric bases we selected all transporters expressed in neutrophils able to carry puric bases. Genetic polymorphisms in these transporters were selected only if good evidences for clinical or *in vitro* functional effects had been reported in the literature, and if their minor allele frequency (MAF) was above 2.5% in Caucasians (to ensure sufficient statistical power). Other polymorphisms were excluded which has to be considered as a limit of the study although it ensures a good consistency.

We found that *ABCC4* rs11568658 genotype correlated with the decrease in neutrophil count in renal transplant recipients treated with VGCV. Experiments with transfected HEK293T cells confirm that this variant decreases MRP4-mediated efflux of GCV. This result is in accordance with previous study concerning other substrates such as 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT) and 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA)(101). MRP4 is expressed in blood cells. It mediates the efflux of a number of antiviral drugs and endogenous compounds from cells(130, 131). It has been previously described that GCV is a substrate of MRP4. More precisely, overexpression of MRP4 was found to decrease the intracellular accumulation of GCV and to confer resistance to the cytotoxic effects of GCV<sup>15</sup>. In line with this finding, Adachi et al showed *in vitro* that GCV steady-state concentration in MRP4-transfected MCF-7 cells was about 50% that in the vector cells. In addition they demonstrated that the efflux of intracellular GCV was faster in MRP4-transfected cells as compared to vector cells (half-lives of 16 and 32 min, respectively). Here, we confirm using a selective inhibitor of the MRP-transporters (MK-571) that efflux mechanisms play a role in GCV transmembrane transport, at least in Jurkat cells. Moreover experiments using HEK-293T cells provide direct additional evidence that GCV is a substrate of MRP4.

The SNP found to decrease GCV efflux and to increase the risk of neutrophil toxicity leads to an amino acid substitution (Gly<sup>187</sup>Trp) in the transmembrane domain of MRP4. Two other variants in

*ABCC4* were studied: rs3742106 and rs2274407. The rs3742106 is located in the 3' UTR region and has been associated with an elevation of lamivudine-triphosphate concentrations (approx. + 20%) in variant carriers(132). It was however not found to be associated with increased concentrations of tenofovir diphosphate in human peripheral blood mononuclear cells 24h post-dose (133) . Similarly, the rs2274407 (Lys<sup>403</sup>Asn) in exon 8 was found to correlate with higher incidence of high-grade thrombocytopenia in methotrexate-treated patients(134). Gradhand et al. found that this variant allele associated with a reduction in MRP4 liver expression (-46%) (135). This could not be confirmed by Ansari et al (134). None of these two controversial SNPs were associated with decrease in neutrophil count in the present study. We did not investigate their impact on GCV transport or cellular expression.

Another SNP in *ABCB1* (rs2229109) leading to the Ser<sup>400</sup>Asn substitution was found to have a significant impact on neutrophil evolution in the exploratory and confirmation cohorts. The SNP is known to enhance trans-epithelial permeability of vinblastine and vincristine, through increasing the cellular efflux of these drugs(136). Here the variant allele had contradictory effects. In the exploratory cohort, it showed a protective effect on neutrophil toxicity ( $\beta=0.88\pm0.25$   $p=0.0005$ ), which is consistent with the literature showing that it contribute to the resistance to several chemotherapeutic agents (presumably through increased transport activity)(137–139). Conversely, in the confirmatory cohort, carriers of the variant showed more pronounced decrease of neutrophil count ( $\beta=-0.82\pm0.39$   $p=0.034$ ). This is in favor of a false finding and emphasizes the necessity to have a confirmatory group in pharmacogenetic studies.

*ABCG2*-rs2231137 leading to the Val<sup>21</sup>Met substitution has been deeply explored in the literature but results are ambiguous. Some publications found an effect on tyrosine kinase inhibitor clinical pharmacokinetics and side effect outcomes (140, 141) whereas others found no association(142, 143). Here, only one patient was carrier of this allele in the exploratory study and none in the confirmatory study which make any conclusion impossible.

These polymorphisms have to be explored further, in particular using transfected cellular models to precise their actual impact on GCV transport.

In conclusion, *in silico* analysis on GCV membrane crossing suggest that passive diffusion is a slow process and that GCV location inside the membrane is likely to favor active transport mechanisms. The study provides direct evidence that GCV is a substrate of the efflux transporter MRP4 and suggest that the intracellular fate of GCV is significantly influenced by *ABCC4* rs11568658 variant in renal transplant recipients receiving GCV. The variant may accentuate the risk of severe neutrophil decrease. MRP4 has a lot of substrates including puric bases, uric acid, eicosanoid acids, chemotherapeutic agents and antiviral drugs. In addition to genetic polymorphisms which can alter MRP4 expression level or transport activity, one can suggest that drug interactions could occur and result in decrease efflux of GCV. Although current Food and Drug Administration and European Medicines Agency recommendations do not yet include MRP4 in the panel of the transporters requiring careful attention for drug interactions, further studies would be of particular interest. Further studies are also needed to clarify the roles of *ABCB1*-rs2229109 and *ABCG2*-rs2231137 in the transport of GCV.



## Materials and Methods

### Materials

Ganciclovir and acyclovir were purchased from TRC (Toronto, Canada). Stock solutions ( $1\text{g.L}^{-1}$ ) were prepared in ultra-pure water (UPW) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . All other chemical and reagents, unless stated otherwise, were obtained from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO).

### Clinical pharmacogenetic study

#### - Selection of candidate genes and polymorphisms

We aimed at selecting candidate gene polymorphisms in membrane transporters, which might lead to abnormal accumulation of GCV into blood cells. Nine transporters previously found to carry analogues of puric bases and ideally GCV were first selected. Among these, only 7 transporters expressed in blood cells were finally retained (**supplemental Table 2**).

Seventeen candidate gene polymorphisms were carefully selected from the literature and the SOPHIE (Study of Pharmacogenetics in Ethnically Diverse Populations) database (<http://pharmacogenetics.ucsf.edu/index.html>) based on reported evidences of clinical or *in vitro* functional effects and a MAF threshold of 2.5% in Caucasians. The list of candidates and their selection criteria are summarized in supplemental **Table 1**.

#### - Population studies

A first population of 174 renal transplant patients derived from a French multicenter cohort of 444 patients, enrolled between October 2007 and October 2011, constituted the exploratory group (EPIGREN; Clinical Trial Registry No. NCT 01989832). A second group of 96 renal transplant patients included since February 2013 in an independent French multicenter served as the confirmation group. All the patients provided written informed consent for pharmacogenetic investigations. The patients included from the two cohorts received VGCV for the treatment or the prophylaxis of CMV infections. This study was approved by local ethic committees. Patient characteristics are given in **Table 3**.

#### - Identification of genotypes

Patients' DNA were isolated from EDTA-treated whole blood tubes using the Qiagen DNA blood minikit or from saliva. Saliva was collected with the ORAGENE OG-500 DNA collection kit (DNA Genotek inc. Ottawa, Canada) and genomic DNA extraction performed following the manufacturer precipitation protocol. Genotyping was performed using TaqMan Real time Polymerase Chain Reaction (PCR) allelic discrimination assays (Life Technologies, Saint Aubin, France) using the Type-it Fast Probe PCR Master Mix (Qiagen, Courtaboeuf, France) and the Rotor-Gene Q PCR instrument (Qiagen®). Assays were ordered from Life Technologies as validated assays (rs11568658 and rs2274407) or custom assays for rs2229109, rs1128503 rs2032582, rs1045642, rs2231137, rs12208357, rs35167514, rs2413775, rs10868138. The deletion in *SLC22A1* gene (referred as rs202220802, rs34305973, rs35191146) was explored by direct sequencing as previously described(144). Briefly, the PCR mixture consisted of 5µL of 10X PCR buffer (Invitrogen®), 1µL of dNTP at 10 mmol.L<sup>-1</sup> (Invitrogen®), 1.5 µL of MgCl<sub>2</sub> at 50 mmol.L<sup>-1</sup>, 0.2µL of Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen®), and 39.3 µL of UPW. 10ng of DNA and 3µL of sense and antisense primers (10µM) were added. After 35 cycles of thermocycling, DNA was purified using QiAQuick® PCR Purification kit (Qiagen®). Finally, sequencing was performed using 4µL of BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit® (Applied Biosystems®), 2µL of sense and antisense primers at 2.5µmol.L<sup>-1</sup>, 2µL of UPW per sample and 2µL of purified DNA obtained as previously described on a 3130-XL instrument (Applied Biosystems).

#### - Statistical analysis

The primary objective of the study was to identify factors associated with the occurrence of neutrophil toxicity among patients receiving VGCV. The following variables were analyzed: dose of VGCV, duration of treatment, co-treatments associated with a particular risk of neutropenia (mycophenolate mofetil dose and cotrimoxazole intake), CMV donor and recipient serologies. These factors were then correlated with neutrophil count decrease during antiviral therapy. Statistical analysis of associations between genotypes, co-treatments, and the evolution of neutrophil counts after drug introduction was performed using generalized estimating equation (gee) multiple linear

regression with an autoregressive correlation matrix. This method takes into account the correlation between the visits for a given subject(145) (R package geepack ; <http://www.r-project.org>). Variables with a  $p < 0.10$  in the univariate analysis were included in the multivariate analysis and only factors with  $p < 0.05$  were retained in the final model. The final model was selected by a backward stepwise strategy based on the likelihood ratio test.  $\beta$  represents the effect of the covariate on the slope of neutrophil count for the treatment length.

### *Cellular assays*

#### - Cell culture

Human Embryonic Kidney 293T/17 (HEK293T) cells (CRL-11268™, American Type Culture Collection®, Manassas, VA) and Jurkat cells (TIB-152™, ATCC®) were routinely cultured at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life technologies, Cergy-Pontoise, France) and RPMI 1640 medium (Life technologies), respectively. Media contained 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100U.mL<sup>-1</sup> penicillin, and 100µg.mL<sup>-1</sup> streptomycin.

#### - MRP4 functional assay

ABCC4-pcDNA5/FRT plasmid containing the reference sequence of the human multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) gene was a generous gift from Prof. Deanna Kroetz, department of biopharmaceutical Sciences and Pharmaceutical chemistry, University of California, San Francisco (CA). This plasmid was constructed and functionally tested as described in Abla et al.(101). This reference plasmid was used as a template for constructing the most common variant of MRP4 (rs11568658; p.187G>W) in Caucasians (MAF=0.025) associated with a significant loss of function *in vitro* for antiviral drugs(101). The variant construct was obtained by site-directed mutagenesis, using the Quick change II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies®, Massy, France) and the following primers:

5'-ttagtaacatggccatgtggaagacaaccacaggc-3' (reverse)

5'-gcctgtggttcttccacatggccatgttactaa-3' (forward)

*ABCC4* and its variant plasmid sequences were verified by sequencing.

For transient transfection, HEK293T cells were seeded in 10-cm dishes. Cells were placed in an antibiotic-free medium for 30 minutes and transfected with 10µg of pDNA (or empty vector), 2 mL of OptiMEM and 20 µL of lipofectamine LTX (both from Life Technology®). The day after, cells were trypsinized and seeded onto 24-well poly-D-lysine-coated plates (BD Discovery Labware®, Bedford, MA) at a density of  $5 \times 10^5$  cells/well in order to reach confluence within 24h for uptake assays. Transport activities were analyzed through measuring intra-cellular accumulation of GCV as follow. Cells were washed twice with 1mL of prewarmed 37°C Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS, Life technologies®) and uptake experiments initiated by the addition of 1mL of a prewarmed 37°C DPBS containing  $10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  GCV. After 30 minutes of incubation at 37°C, cells were transferred on ice to stop the transport activity and rinsed twice with 1mL of ice-cold DPBS. Cells were desiccated and lysed with 200µL of pentadecafluorooctanoic acid at 1% for 15 minutes and stored at -20°C until analysis. Intracellular amounts of GCV were determined using a validated LC-MS/MS method(89). Results were normalized to per-well protein content as measured using the bicinchoninic acid protein assay (BCA, Thermo Scientific®).

#### - Inhibition experiments

Jurkat cells were chosen because they derive from blood cells and express MRP4, BCRP and the P-gp(146). MK-571 (Tebu-bio®, Le Perray-en-Yvelines, France), a selective inhibitor of MRP-transporters family(147), was used as a chemical inhibitor of GCV transport in Jurkat cells. Briefly, 500µL of Jurkat cells suspension ( $1 \times 10^6$  cells/mL) was transferred into 1mL microtubes. The cells were washed twice with 1 mL of DPBS. The uptake experiment was started by addition of 500µL of prewarmed (37°C) DPBS with or without MK-571 ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), containing GCV at  $20 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Tubes were incubated at 37°C for 30, 60, 90 and 120 seconds. The tubes were then transferred on ice and the cells were pelleted down (200g; 1 minute at 4°C), washed twice with 1 mL of DPBS, desiccated and lysed with 200µL of 1% pentadecafluorooctanoic acid. Cell lysates were stored at -20°C until LC-MS/MS determination of GCV content. Each incubation was performed in duplicate, three times (n=2X3

experiments). Results were normalized to the protein content as measured using the BCA (Thermo Scientific®).

- Sample preparation and LC-MS/MS analysis

Five  $\mu\text{L}$  of the internal standard (acyclovir at  $100\mu\text{g.L}^{-1}$ ) was added to the cell lysates. The calibrants ( $5\mu\text{g.L}^{-1}$  to  $5.000\mu\text{g.L}^{-1}$ ) and internal quality controls ( $500\mu\text{g.L}^{-1}$ ,  $2600\mu\text{g.L}^{-1}$  and  $5200\mu\text{g.L}^{-1}$ ) were prepared in a blank matrix (*i.e.* HEK293T or Jurkat cell lysates).

The LC-MS/MS method had been previously validated and is described in details in Billat et al. (89).

*Molecular dynamic (MD) study: methods of calculations*

MD simulations were performed using a system constituted of 128 molecules of DOPC (1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) arranged in a bilayer *i.e.*, 64 lipid molecules per leaflet. The bilayer surrounded by an explicit SPC (single point charge) water model (4511 molecules of water) and ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ). The bilayer surface defined by the polar head groups is perpendicular to the z-axis of the box containing the whole system.

The conformation of GCV was optimized, prior to insertion in the membrane model, at the density functional theory (DFT) level using B3LYP/6-31+G (d, p). The topology was generated with the PRODRG program. The partial atomic charges were generated using the RESP method based on B3LYP/cc-pVDZ calculations.

The lipid bilayer was initially treated using both the united-atoms force field Berger. The lipid model was relaxed prior to drug insertion during 100 ns. All MD simulations were performed with the GROMACS package version 4.6.5.

Afterwards, the MD simulations were performed with the molecular systems made of non-interacting GCV molecules inserted at various locations *i.e.* inside the membrane or in the water phase. To enable sufficient sampling of all intermolecular motions, the MD simulations were performed over 2.4  $\mu\text{s}$ . The simulations were carried out using the Gromos43a1-S3 force field; constant number of particles; constant temperature (310 K); anisotropic pressure coupling (1 bar);

and periodic boundary conditions in all directions. In the presence of the drug, the Gromos43a1-S3 was preferred over Berger, as the latter is known to overestimate lipophilicity of compounds(124). The pressure and temperature were controlled using Parrinello-Rahman and nose-hoover thermostat, respectively with a coupling constant of 5.0 ps and 0.5 ps, respectively. Van der Waals and Coulomb interactions were evaluated using Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics with a cut-off of 1.4 nm. The VMD software was used for visualization.

To assess analysis, the surface of the membrane was defined by the averaged location of the P-atoms of the phosphatidylcholine head groups, which define the xy-plane. The distribution of GCV location in membrane was defined as the number density of the center of mass, the aromatic ring, and the aliphatic moieties. Averaging was obtained from the last 300ns of the MD simulations (representative of equilibrium location). The angle between the z-axis and the C=O vector was also monitored over the last 300 ns of the simulations was monitored over the simulation to describe the GCV orientation. To calculate the free-energy profile of GCV membrane penetration and crossing, TurBOMOLE in the Tmolex package and COSMOmic from the COSMOthermX package were used. Twenty different conformations of GCV obtained using CONFAB were optimized using DFT/cosmo with TURBOMOLE at the functional b-p and basis set TZVP. Then, the free energy profiles for all geometries were calculated at 310 K using the COSMOmic software. In this implicit methodology, the DOPC bilayer was separated into 50 slices. About 162 orientations of ganciclovir were used in DOPC membrane to estimate their free energy profiles. The final free energy profiles of all conformations were averaged over the individual free energy profile.

## Study Highlights

### WHAT IS THE CURRENT KNOWLEDGE ON THE TOPIC?

✓ Few data is available in the literature on GCV membrane transport and there have been no study exploring the association between membrane transporter gene polymorphisms and neutrophil toxicity in patients receiving GCV. The mechanism of GCV toxicity is not yet elucidated but might involve accumulation of the drug in blood cells.

### WHAT QUESTION DID THIS STUDY ADDRESS?

✓ Can genetic polymorphisms of membrane transporters contribute to neutrophil toxicity during GCV treatment?

✓ What mechanisms are involved in GCV membrane crossing

### WHAT THIS STUDY ADDS TO OUR KNOWLEDGE

✓ GCV membrane crossing is slow as the drug accumulates inside membranes at positions likely favoring active transport mechanism.

✓ We identified a variant in *ABCC4* (rs11568658) associated with neutrophil count decrease in renal transplant patients. The variant was found to favor GCV accumulation in HEK-293T cells by reducing its cellular efflux. This is the first report of an association between this variant and GCV neutrophil toxicity.

### HOW THIS MIGHT CHANGE CLINICAL PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS

✓ This result provide new hints for the comprehension of GCV toxicity and possibly efficacy and drug-drug interaction. From a clinical perspective, the results may contribute to identify patients at particular risk of neutropenia under GCV therapy.

## **Acknowledgments**

We thank Pr. Deanna Kroetz (Departments of Biopharmaceutical Sciences and Pharmaceutical Chemistry, UCSF) for the gift of the plasmid containing the *ABCC4* gene. This work was supported by the French Ministry of Health, the Hospital of Limoges, FHU SUPPORT and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm). The funders had no role in study design, data collection, analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

## **Conflic of Interest/Disclosure**

This work was partially supported by Roche Pharma<sup>®</sup>.

## **Author Contributions**

BILLAT Pierre-André: Main author

CHOUKROUN Gabriel: Inclusion of Amiens patients

ESSIG Marie: Inclusion of Limoges patients

ETIENNE Isabelle: Inclusion of Rouen patients

FABRE Gabin: modeling

KAMAR Nassim: Inclusion of Toulouse patients

MARQUET Pierre: Main investigator of EPIGREN and EPHEGREN studies

MERVILLE Pierre: Inclusion of Bordeaux patients

OSSMAN Tahani: Second author

PICARD Nicolas: Main referent

REROLLE Jean-Philippe: Inclusion of Limoges patients

ROSTAING Lionel: Inclusion of Toulouse patients

SAINT-MARCOUX Franck: Pharmacokinetics

TROUILLAS Patrick: Modeling



WEESTEL Pierre-Françoise: Inclusion of Amiens patients

WOILLARD Jean-Baptiste: Statistical analysis

### **Abbreviations**

BCA, bicinchoninic acid protein assay; CMV, Cytomegalovirus; DPBS, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline ; GCV, Ganciclovir; HEK293T, Human Embryonic Kidney 293T/17; MD, Molecular dynamics; PCR, polymerase chain reaction; pDNA, plasmid DNA; S.D., Standard deviation; SNP, single nucleotide polymorphism; SOPHIE, Studies of Pharmacogenetics in Ethnically Diverse Populations; UPW, Ultrapure water; VGCV, Valganciclovir.

### Figure Legends.

- **Table 1:** Candidate gene Single Nucleotide Polymorphism (SNP) distributions and frequencies in the exploratory group.
- **Table 2:** Univariate and multivariate analysis results of association with neutrophil count evolution in the exploratory group.
- **Table 3:** Patient characteristics.
- **Supplemental Table 1:** List of the candidate SNP studied with consequences, frequencies in Caucasians and reported evidences of functionality.
- **Supplemental Table 2:** List of the candidate transporters with references for evidences regarding their expression in blood cells and their capacity to carry purine analogs or GCV itself.
  
- **Figure 1:** A) Chemical structure of ganciclovir (GCV). B) Average location of center of mass (COM) of GCV (black profile), the aromatic rings (red profile) and the aliphatic chain (green profile). The blue profile describes the P-atom distribution. C) Average location of COM of GCV (black profile). The blue profile describes the P-atom distribution. D) Average location of COM of GCV-monophosphate (red profile), GCV-diphosphate (green profile) and GCV-triphosphate (orange profile). The blue profile describes the P-atom distribution.
- **Figure 2:** Effect of MK-571 ( $50\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) on ganciclovir intracellular accumulation ( $20\text{mg.L}^{-1}$ ) Values are mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments made in duplicate ( $n=6$ ). Statistical analysis was performed on intracellular accumulation in Jurkat cells where data in control condition ( $37^\circ\text{C}$ ) were compared with those in the presence of inhibitor. \*\*\*  $p < 0.001$
- **Figure 3:** A) Free energy profile of penetration of GCV across the DOPC membrane along the z-axis, from the edge of the box ( $d = 4\text{nm}$ ) to the center of the bilayer ( $d = 0 \text{ nm}$ ).  $\Delta G^{\text{cross}}$  is the free energy barrier of penetration across the bilayer core.  $\Delta G^{\text{pen}}$  is the water/lipid barrier (affinity to

the membrane and partitioning). B) Free energy profile for GCV-monophosphate (red profile), GCV-diphosphate (black profile) and GCV-triphosphate (green profile).

- **Supplemental Figure 1:** *In vitro* GCV accumulation in cells expressing ABCC4, in cells expressing the rs11568658 variant and in control cells transfected with an empty plasmid (n=22 per group).

\*\*\*\*  $p < 1.10^{-4}$

- **Supplemental Figure 2:** Distribution of the angle defined by the normal of the bilayer (z-axis) and the vector defined by the C=O carbonyl bond.
- **Supplemental Figure 3:** Average distance between aromatic rings.

**Table 1:** Candidate gene Single Nucleotide Polymorphism (SNP) distributions and frequencies in the exploratory group.

GENE	SNP	wt/wt	wt/vt	vt/vt	Population
					allele frequency
<b><i>SLC29A1</i></b>	rs747199	129/206	68/206	9/206	21%
<b><i>SLC28A3</i></b>	rs10868138	168/206	37/206	1/206	9%
<b><i>SLC28A2</i></b>	rs2413775	101/203	79/203	23/203	31%
<b><i>SLC22A1</i></b>	rs12208357	144/205	51/205	10/205	17%
	rs34059508	198/206	8/206	0/206	2%
	420 DEL	133/199	62/199	4/199	18%
	rs628031	87/199	94/199	18/199	33%
<b><i>ABCG2</i></b>	rs2231137	170/206	35/206	1/206	9%
<b><i>ABCC4</i></b>	rs2274407	176/206	30/206	0/206	7%
	rs3742106	70/186	89/186	27/186	38%
	rs11568658	197/205	8/205	0/205	2%
<b><i>ABCB1</i></b>	rs1045642	63/206	103/206	40/206	44%
	rs2032582	77/206	92/206	37/206	40%
	rs1128503	70/206	96/206	40/206	43%
	rs2229109	188/205	17/205	0/205	4.0%

wt : wild type; vt : variant

**Table 2:** Univariate and multivariate analysis results of association with neutrophil count evolution in the exploratory group.

Variable	Genotype	Univariate analysis			Multivariate analysis		
		$\beta$	Standard deviation	p value	$\beta$	Standard deviation	p value
Dose > 450mg/d	-	-0.4366	0.044	0.0489			
Treatment length (weeks)	-	0.00147	0.0021	0.48			
Mycophenolate mofetil dose (mg)	-	-0.3989	0.3452	0.25			
Cotrimoxazole intake (Yes/No)	-	-0.1494	0.1842	0.42			
CMV R+	-	-0.0305	0.1892	0.87			
CMV D+	-	-0.026	0.1856	0.89			
<i>ABCB1</i> -rs2229109	G/A vs G/G	0.6924	0.2714	0.011	0.8801	0.2531	0.00051
<i>ABCB1</i> -rs1128503	G/A vs A/A	-0.2197	0.02221	0.32			
<i>ABCB1</i> -rs1128503	G/G vs A/A	-0.2292	0.2322	0.32			
<i>ABCB1</i> -rs2032582	G/T vs G/G	0.1073	0.1865	0.57			

<b>ABCB1-rs2032582</b>	T/T vs G/G	-0.1846	0.2353	0.598			
<b>ABCB1-rs1045642</b>	T/C vs C/C	0.2766	0.1966	0.16			
<b>ABCB1-rs1045642</b>	T/T vs C/C	<b>0.3721</b>	<b>0.2422</b>	<b>0.12</b>			
<b>ABCC4-rs11568658</b>	G/T vs G/G	<b>-0.638</b>	<b>0.322</b>	<b>0.048</b>	<b>-0.6854</b>	<b>0.2804</b>	<b>0.0145</b>
<b>ABCC4-rs3742106</b>	A/C vs A/A	0.1044	0.1858	0.57			
<b>ABCC4-rs3742106</b>	C/C vs A/A	0.3575	0.336	0.28			
<b>ABCC4-rs2274407</b>	G/T vs G/G	-0.1603	0.162	0.32			
<b>ABCG2-rs2231137</b>	A/G vs A/A	<b>-1.236</b>	<b>0.208</b>	<b>2.80.10<sup>-09</sup></b>	<b>-1.2393</b>	<b>0.2123</b>	<b>5.3.10<sup>-9</sup></b>
<b>ABCG2-rs2231137</b>	G/G vs A/A	<b>-1.3669</b>	<b>0.0853</b>	<b>&lt; 2.10<sup>-16</sup></b>	<b>-1.3732</b>	<b>0.0981</b>	<b>&lt; 2.10<sup>-16</sup></b>
<b>SLC22A1-rs34059508</b>	G/A vs G/G	-1.1352	0.6133	0.064			
<b>SLC22A1-rs12208357</b>	C/T vs C/C	-0.1404	0.1634	0.39			
<b>SLC22A1-rs12208357</b>	T/T vs C/C	-0.1669	0.2272	0.46			
<b>SLC22A1-420deletion</b>	-	<b>0.3287</b>	<b>0.179</b>	<b>0.066</b>			
<b>SLC22A1-rs628031</b>	G/A vs A/A	0.1337	0.265	0.61			
<b>SLC22A1-rs628031</b>	G/G vs A/A	0.0204	0.2624	0.44			
<b>SLC28A2-rs2413775</b>	A/T vs A/A	0.0217	0.1806	0.9			

<b>SLC28A2-rs2413775</b>	T/T vs A/A	0.2063	0.3313	0.53			
<b>SLC28A3-rs10868138</b>	<b>G/A vs A/A</b>	-0.0557	0.2223	0.8	-0.1156	0.2079	0.58
<b>SLC28A3-rs10868138</b>	<b>G/G vs A/A</b>	<b>-1.8346</b>	<b>0.1623</b>	<b>&lt;2.10<sup>-16</sup></b>	<b>-2.594</b>	<b>0.2861</b>	<b>&lt; 2.10<sup>-16</sup></b>
SLC29A1-rs747199	C/G vs C/C	0.3878	0.2528	0.13			
SLC29A1-rs747199	G/G vs C/C	0.3101	0.2301	0.18			

**Table 3: Patient characteristics**

	Exploratory group (EPIGREN) n=174	Confirmation group (EPHEGREN) n=96
Median Age (min-max), years	59 (25-83)	57 (23-80)
Sex (male/female)	103/73	63/33
Weight, kg	70 (38-159)	73 (45-117)
Median antiviral treatment duration, weeks	16 (1-235)	5.3 (1-71)
proportion of CMV seropositivity in Recipients (R+)	0.57	0.56
Proportion of CMV seropositivity in graft donors (D+)	0.61	0.75
Patients receiving VGCV over 450mg	28	41
Proportion of recipients treated with cotrimoxazole	0.32	NA



**Supplemental Table 1:** List of the candidate SNP studied with consequences, frequencies in Caucasians and reported evidences of functionality

<u>GENE</u>	<u>TRANSPORTER</u>	<u>SNP and nucleotide change</u>		<u>Amino acid change</u>	<u>Allele frequency Caucasian</u>	<u>Functional effect</u>
<u>ABCB1</u>	<u>P-gp</u>	<u>rs2229109</u>	<u>G-&gt;A</u>	-	<u>2.50%</u>	<u>Increases the intracellular concentration of Tacrolimus(148)</u>
		<u>rs1128503</u>	<u>C-&gt;T</u>	-	<u>45.90%</u>	<u>Modification of nevirapine or lamivudine response in HIV patients(149)</u>
		<u>rs2032582</u>	<u>G-&gt;T</u>	-	<u>46.40%</u>	
		<u>rs1045642</u>	<u>C-&gt;T</u>	-	<u>56.10%</u>	
<u>ABCC4</u>	<u>MRP-4</u>	<u>rs11568658</u>	<u>G-&gt;T</u>	<u>G187W</u>	<u>2.50%</u>	<u>Increases intracellular AZT and PMEA levels in transfected cells(101)</u>
		<u>rs3742106</u>	<u>T-&gt;G</u>	-	<u>38.8%</u>	<u>Elevation of lamivudine-triphosphate concentrations of about 20% in variant carriers(132)</u>
		<u>rs2274407</u>	<u>G-&gt;T</u>	<u>K304N</u>	<u>8.70%</u>	<u>Higher frequency of high-grade thrombocytopenia in methotrexate treated</u>

						patients(134)
<u>ABCG2</u>	<u>BCRP</u>	<u>rs2231137</u>	<u>G-&gt;A</u>	<u>V12M</u>	<u>6.60%</u>	<u>Increases imatinib cellular concentration <i>in vitro</i> and reduces oral clearance.(150)</u>
<u>SLC22A1</u>	<u>OCT-1</u>	<u>rs34059508</u>	<u>G-&gt;A</u>	<u>G465R</u>	<u>4%</u>	<u>Higher metformin AUC, Cmax and lower volume of distribution(144)</u>
		<u>rs12208357</u>	<u>C-&gt;T</u>	<u>R61C</u>	<u>7.20%</u>	
		<u>rs35167514</u>	<u>A-&gt;-</u>	<u>420DEL</u>	<u>18.50%</u>	
		<u>rs34305973</u>				
		<u>rs35191146</u>				
<u>rs628031</u>	<u>A-&gt;G</u>	<u>M408V</u>	<u>59.8%</u>	<u>Higher incidence of poor response to imatinib(151)</u>		
<u>SLC28A2</u>	<u>CNT-2</u>	<u>rs2413775</u>	<u>A-&gt;T</u>	<u>-</u>	<u>27.50%</u>	<u><i>In vitro</i> increased expression of CNT-2(152)</u>
<u>SLC28A3</u>	<u>CNT-3</u>	<u>rs10868138</u>	<u>A-&gt;G</u>	<u>Y113C</u>	<u>8.70%</u>	<u>Reduces the decrease of hemoglobin in ribavirin therapy(153)</u>
<u>SLC29A1</u>	<u>ENT-1</u>	<u>rs747199</u>	<u>G-&gt;C</u>	<u>-</u>	<u>21%</u>	<u>Over expression of ENT-1(154)</u>

Dashes indicate “not relevant”.

**Supplemental Table 2:** List of the candidate transporters with references for evidences regarding their expression in blood cells and their capacity to carry purine analogs or GCV itself

Transporter	Gene	Blood expression	GCV or analogs transport
P-gp (MDR-1)	<i>ABCB1</i>	Cascorbi et al. 2011(155)	Park et al.2008(156)
MRP-4	<i>ABCC4</i>	Oevermann et al. 2009(157)	Adachi et al. 2002(100)
BCRP	<i>ABCG2</i>	Wang et al. 2003(158)	Wang et al. 2003(158)
hOCT-1	<i>SLC22A1</i>	Engler et al. 2011(159)	Takeda et al. 2002(160)
CNT-2	<i>SLC28A2</i>	Owen et al.2006(161)	Redell et al. 2007(162)
CNT-3	<i>SLC28A3</i>	Ritzel et al. 2001(108)	Ritzel et al. 2001(108)
ENT-1	<i>SLC29A1</i>	Hyde et al. 2001(163)	Molina-Arcas et al. 2002(164)

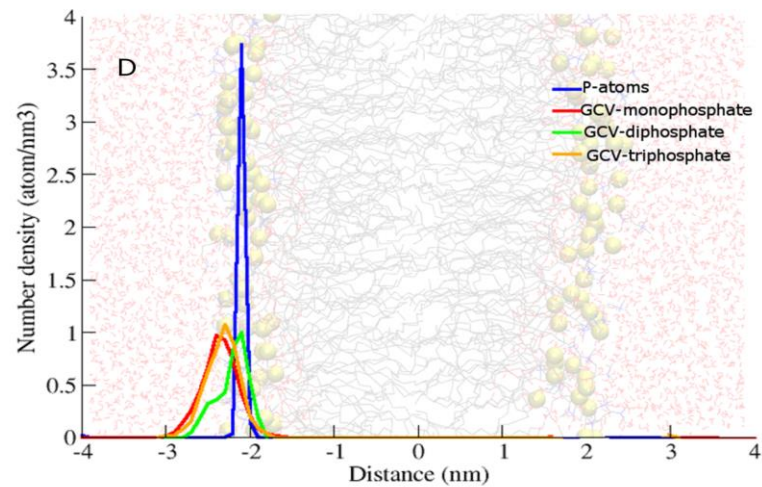
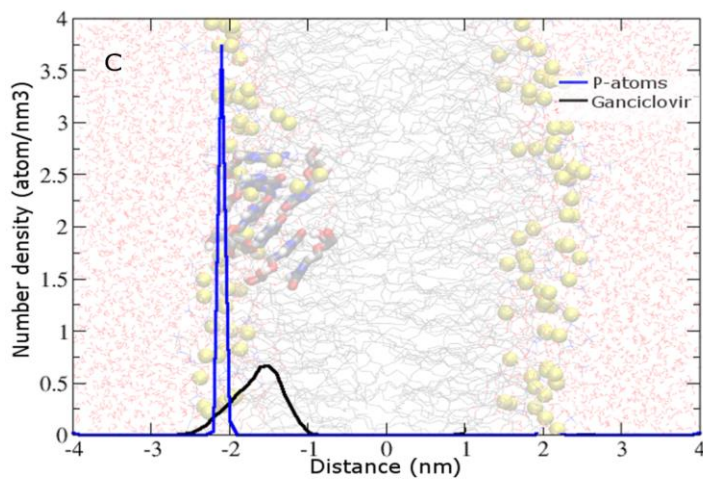
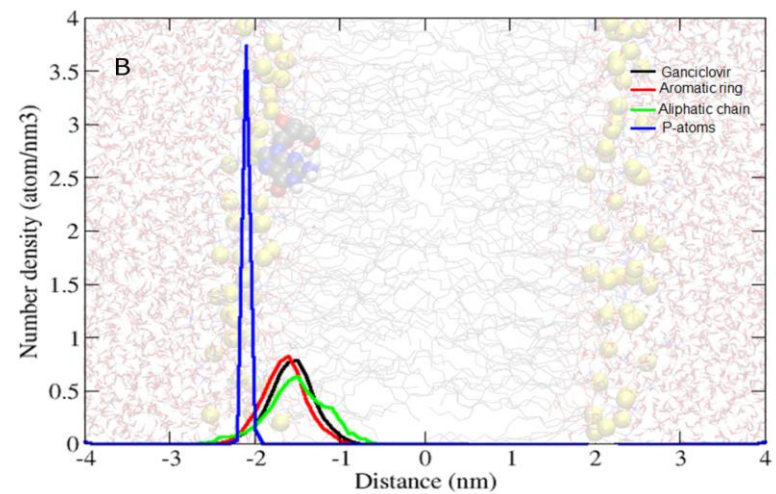
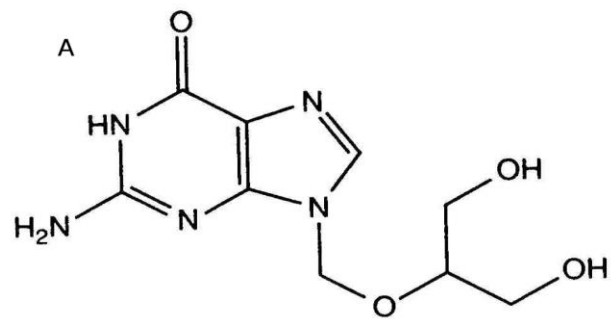


Figure 1

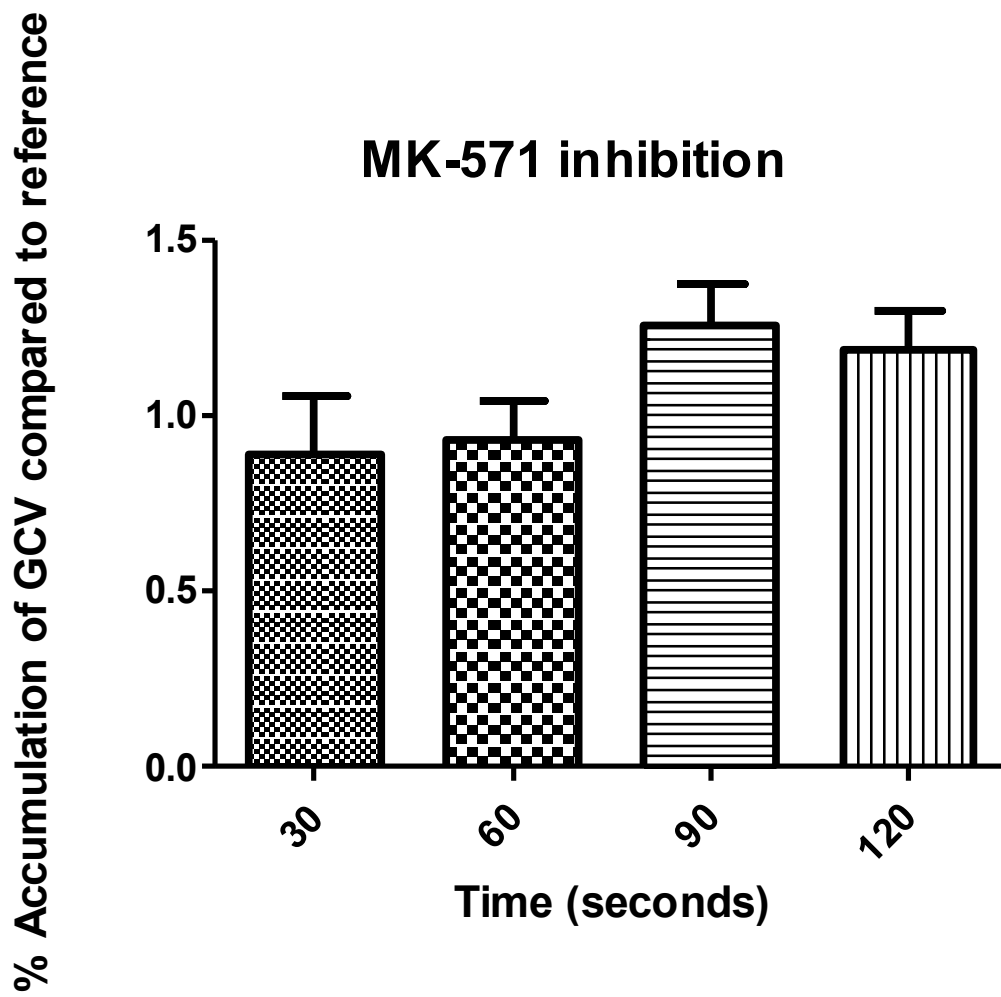
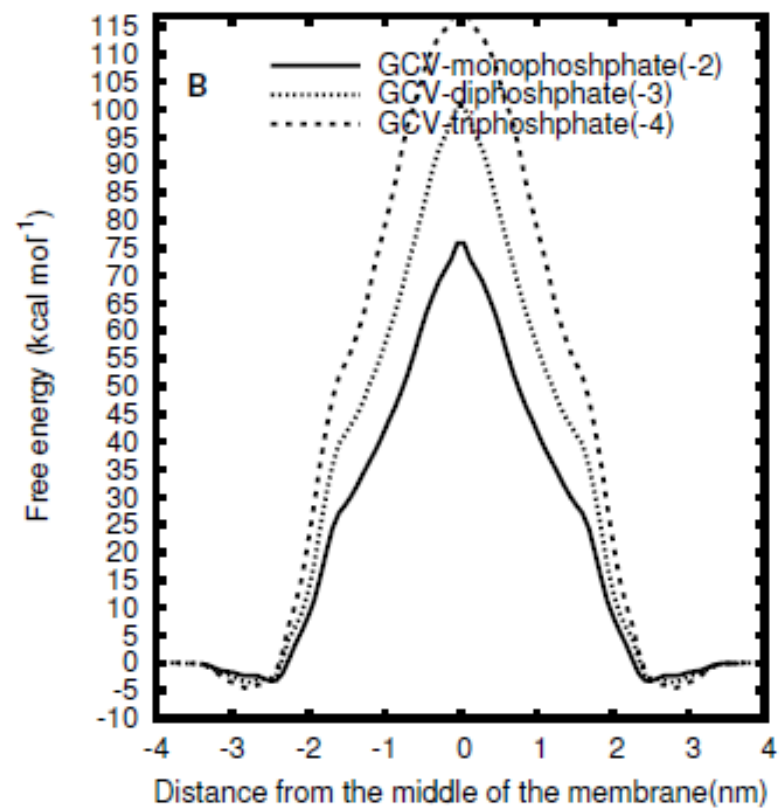
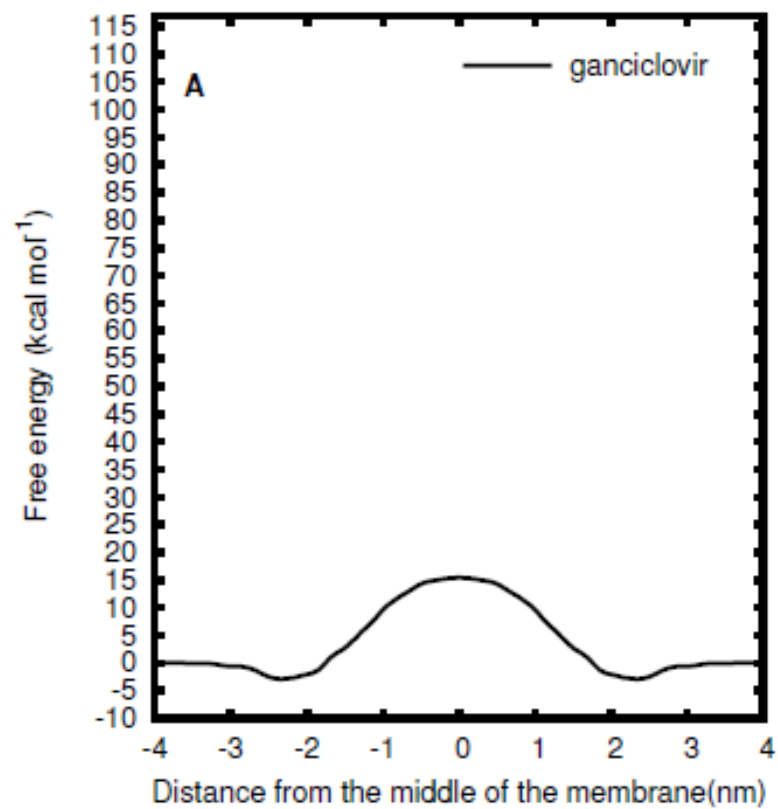
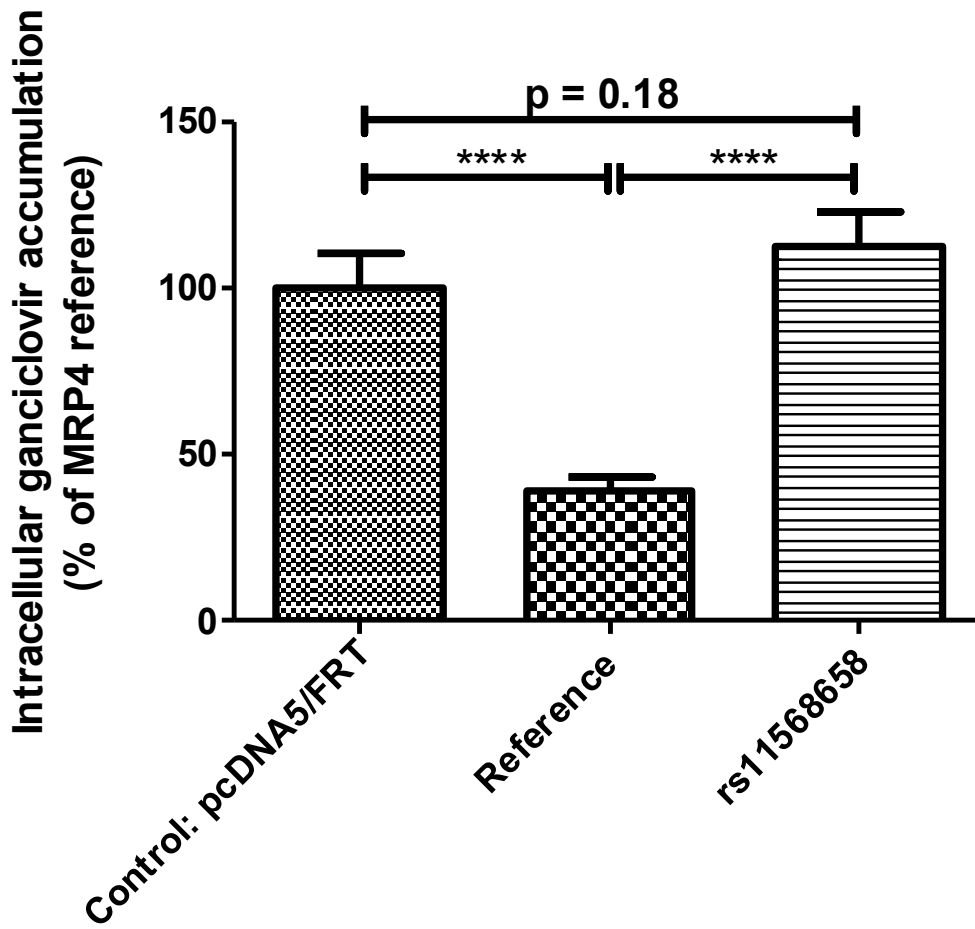


Figure 2

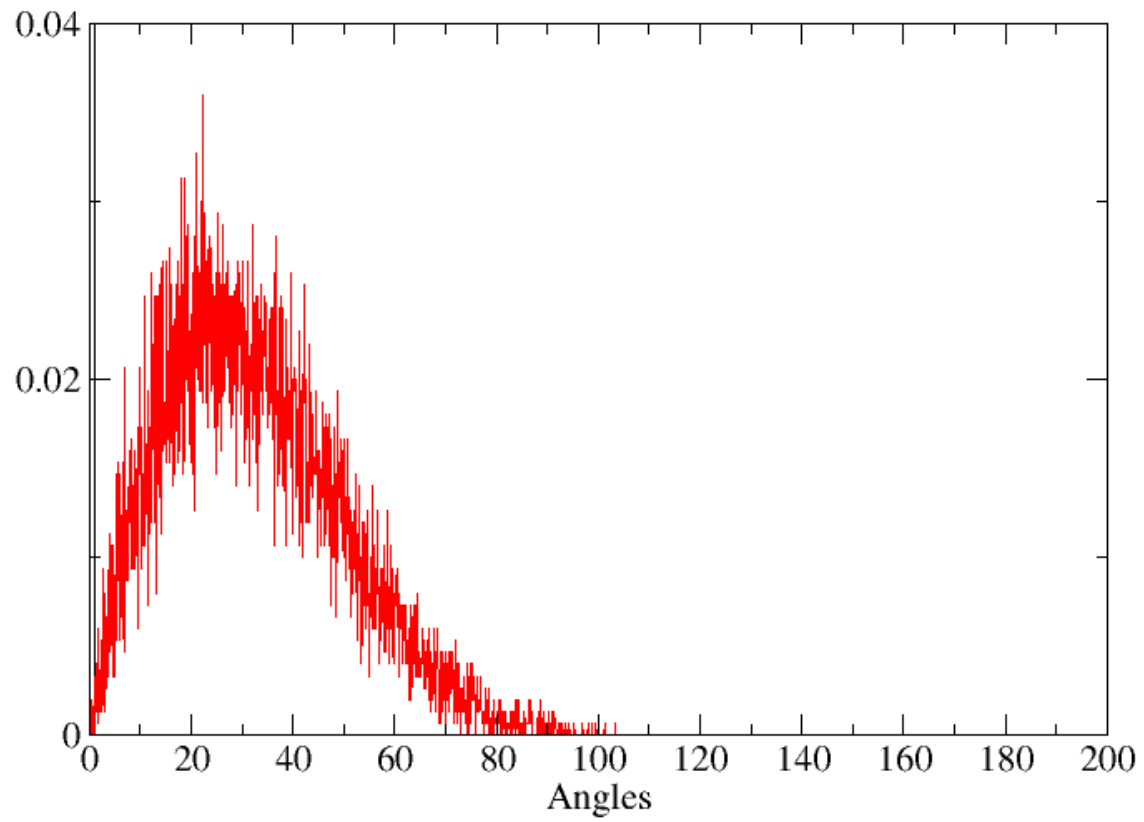


**Figure 3**



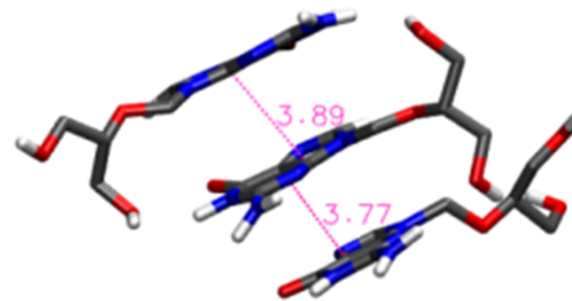
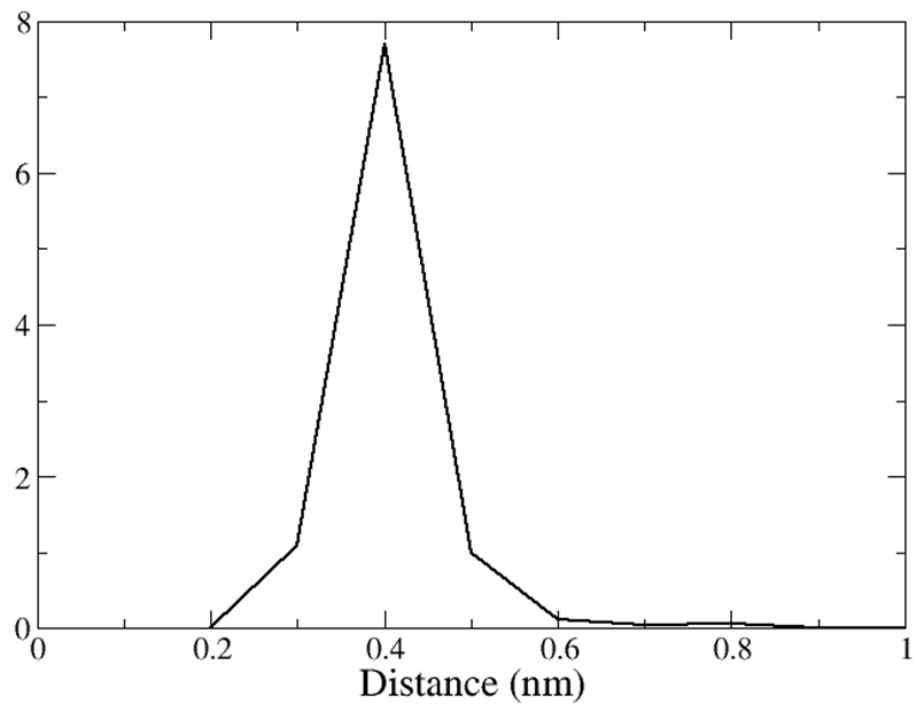
Supplemental Figure 1

## Distribution



**Supplemental Figure 2**





**Supplemental Figure 3**

Ce travail a permis de mettre en évidence pour la première fois l'effet d'un polymorphisme rs11568658 de *ABCC4* (MRP4) lors d'un traitement par GCV dans une étude clinique. Ces données ont été confirmées dans une nouvelle cohorte de patients transplantés et *in vitro* avec des modèles de cellules transfectées. L'implication de MRP4 dans l'accumulation intracellulaire de GCV et son impact clinique dans la diminution de la concentration de neutrophiles laisse suggérer qu'une exploration approfondie de ce gène et de ses autres polymorphismes pourrait expliquer une autre partie de la variabilité de l'évolution du nombre de neutrophiles.

### Chapitre III. Discussion et Perspectives

---

Nos travaux ont permis la mise au point d'une méthode permettant de mesurer les métabolites du GCV dans les cellules sanguines humaines. Celle-ci est suffisamment sensible pour mesurer les concentrations résiduelles des différents métabolites. Elle a été appliquée avec succès chez des patients prenant du VGCV comme traitement prophylactique anti-CMV.

Cette méthode est relativement longue à réaliser : une journée au cours de laquelle les patients sont prélevés et où les échantillons sont traités extemporanément pour isoler les cellules, puis une journée pour les extractions et le dosage à proprement parler. Toutefois, cela peut rester compatible avec des besoins de routine clinique. A notre connaissance, il s'agissait de la première méthode de dosage permettant de mesurer les métabolites du GCV chez des patients traités. Pour la mise au point de cette méthode, nous nous sommes inspirés de travaux réalisés pour le dosage des bases puriques et d'antirétroviraux, basés sur l'échange d'ions, décrits précédemment (165–167).

Dans notre population de patients transplantés rénaux sous VGCV, nous avons observé une importante variabilité de la PK du GCV plasmatique, avec toutefois des valeurs d'exposition comparables à celles déjà rapportées dans d'autres populations (86, 91, 93, 168). Nous avons mesuré par ailleurs, des concentrations significatives de GCV-MP et GCV-TP chez tous les patients de notre population. Or, il est décrit dans la littérature que la kinase virale est nécessaire à la synthèse de GCV-MP. La découverte de ces molécules chez des patients, soit ne manifestant pas de réactivation virale (PCR < 500 copies), soit n'ayant jamais été en contact avec le CMV, remet en cause la spécificité de ce médicament vis-à-vis des cellules infectées et suggère l'implication de kinases cellulaires humaines dans le métabolisme intracellulaire du GCV.

Nous avons pu modéliser, chez ces mêmes patients, les profils PK du GCV plasmatique et de ses formes intracellulaires. Du fait de l'absence de données de la littérature sur la PK des métabolites intracellulaires, nous n'avons pu comparer notre modèle qu'aux études ayant exploré la seule PK du GCV plasmatique. Pour cette dernière, nous avons obtenu des résultats proches de ceux déjà publiés (92, 93). La modélisation par approche non paramétrique a permis de réaliser par la suite une étude d'association entre les paramètres d'exposition au GCV et l'évolution du compte de neutrophiles chez les patients. Parmi toutes les variables testées, seule l'exposition au GCV-TP semblait être associée à une diminution significative, à 3 mois post-greffe, de la concentration en neutrophiles. Des études

ultérieures sont nécessaires pour savoir s'il peut être utilisé comme un bon biomarqueur de la toxicité ou même si il peut être prédictif d'une neutropénie.

Afin de décrire la variabilité analytique nous avons choisi de modéliser le devenir du GCV par une approche non paramétrique.

L'approche non paramétrique a été préférée à l'approche paramétrique pour 2 raisons essentielles : il était difficile d'évaluer l'hypothèse de normalité ou lognormalité des paramètres PK et surtout le risque de « shrinkage » était très important (maximisation des variances estimées du fait du faible nombre d'observations). De ce fait la modélisation non paramétrique de la distribution des effets aléatoires se caractérise par une absence d'hypothèse restrictive portant sur cette distribution. Ainsi la nature discrète de la distribution inclut un nombre de points de support (appelés vecteurs de paramètres) égal ou inférieur au nombre de sujets. Chacun de ces vecteurs est associé à une probabilité, ces couples forment la distribution non paramétrique.

Les paramètres sont estimés par maximisation de la vraisemblance. Les vecteurs de paramètres incluent les paramètres aléatoires et leur variance (incluant l'erreur analytique) et covariance ainsi que les covariables et. Une des force de cette approche est qu'elle permet de déterminer des sous-groupes de population sans avoir de connaissance au préalable d'éventuelles sous populations (ex variants génétiques (90)), ce qui est particulièrement adapté à notre cas.

L'algorithme utilisé est NPAG, il est inclus dans le logiciel Pmetrics<sup>®</sup> développé par le Laboratory of Applied Pharmacokinetics, USC (169).

Tatarinova et al. le décrivent comme étant un algorithme en grille adaptative de points de support d'où son nom de NPAG algorithm (nonparametric adaptive grid)(170). Rapidement cet algorithme construit une grille de points probables  $G_0$ . Il retire ensuite les points avec la probabilité la plus faible et construit la grille  $G_1$ . Elle procède de la même manière avec les grilles suivantes jusqu'à convergence du modèle.

Considérant que seuls les paramètres PK plasmatiques étaient connus, nous avons avancé par « tâtonnement » afin de déterminer au mieux les limites de chaque paramètre à estimer. Nous avons comparé différents modèles avec le critère d'information d'Akaike qui a pour avantage de pouvoir comparer des modèles même lorsqu'ils ne sont pas emboités. Akaike a proposé en 1973 la formule suivante (171) :

$$AIC = 2k - 2\ln(L)$$

Avec  $k$  le nombre de paramètres estimés,  $L$  le maximum de la fonction de vraisemblance du modèle. Parmi les modèles on choisit alors celui avec le critère d'information d'Akaike le plus faible.

En annexe 3 sont détaillées les valeurs et équations utilisées pour le modèle final.

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 complexifié ce traitement même si la connaissance de ces facteurs de résistance a fortement progressé sous l'influence des centres nationaux de référence du CMV.

Afin d'éviter ces résistances il est apparu nécessaire de mettre en place un suivi thérapeutique pharmacologique pour 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.

Jusqu'à présent, les études publiées concernaient uniquement la pharmacocinétique du GCV plasmatique. Les pratiques de STP proposées d'après ces données sont sujet à controverse. Il est soit proposé d'ajuster les doses de VGCV sur la clairance de la créatinine, soit de mesurer une concentration résiduelle de GCV afin de s'assurer que cette dernière est bien en adéquation avec la CI50 du virus ou n'est pas anormalement élevée (ce qui ferait courir un risque de toxicité). Pour autant, même en cas d'exposition plasmatique « adéquate », certains patients « outliers » manifestent une toxicité ou voient émerger des résistances virales, on peut alors penser que le STP sur ces patients pourrait être amélioré (83). Les sources des variabilités interindividuelles PK ne sont toujours que partiellement connues et la pharmacogénétique n'a, pour l'instant, pas été explorée.

Dans un second temps, nous avons donc cherché à identifier des marqueurs pharmacogénétiques de la variabilité inter-individuelle de toxicité au GCV. N'existant pas de liste exhaustive des transporteurs du GCV, nous avons, sur la base de la littérature, fait un recueil des gènes codant pour des protéines de transport hypothétiques du GCV. Nous nous sommes limités aux transporteurs exprimés sur les lignées sanguines et capables de transporter les bases puriques et ses analogues et idéalement le GCV. En effet, les enzymes capables de phosphoryler le GCV étaient également de bonnes cibles, malheureusement elles sont très mal renseignées, peu spécifiques et semblent également être très polymorphes. Parmi les gènes codant pour les transporteurs, nous avons identifié des polymorphismes ayant été impliqués dans un dysfonctionnement de la protéine ou une perte

de sa fonction. Pour des raisons de puissance statistique, nous nous sommes fixés un seuil de 2% de fréquence allélique mineure (MAF), dans la population caucasienne. Dans une étude de cohorte multicentrique de patients transplantés rénaux, nous avons mis en évidence un polymorphisme de protéine de transport susceptible d'influencer la pharmacocinétique intracellulaire du GCV. Ce polymorphisme rs11568658 sur le gène *ABCC4* entraîne une diminution conséquente de l'efflux du GCV par ce transporteur et une importante accumulation intracellulaire du GCV. Le dépistage de ce polymorphisme pourrait donc permettre d'expliquer des diminutions subites de neutrophiles chez les patients traités par GCV ou VGCV. Ce n'est pas la première fois que l'apport de la pharmacogénétique serait un vrai plus dans la prise en charge des traitements et de prévention des effets indésirables. Ainsi les recommandations émises par l'agence du médicament aux Etats-Unis (Food and Drug Administration) ou l'International Transporter Consortium (ITC) montrent le bienfondé de cette approche en listant notamment les transporteurs à étudier selon la nature de la molécule.

A terme, l'objectif serait de combiner les apports de la pharmacogénétique (génotypage des patients) et de la pharmacocinétique (ASC de GCV-TP) afin de permettre de prévoir une éventuelle toxicité et envisager rapidement des traitements alternatifs au GCV. La mise en place de ce type d'approche présente également un intérêt médico-économique. En effet, la prévention d'un effet indésirable grave évite un surcoût non négligeable, lié à l'hospitalisation. L'intérêt principal reste toutefois celui du patient qui recevra la dose la plus adaptée en fonction de son métabolisme intracellulaire et de son génotype..

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 du GCV (100). Il est difficile d'analyser toutes les variations de ce gène en maintenant une puissance statistique satisfaisante. Une des perspectives dans ce contexte est de modéliser MRP4 *in silico*. Ceci nous permettrait de mieux comprendre le rôle de cette protéine, son fonctionnement mais également l'influence de chacune des mutations observées dans la littérature, afin de faire une présélection pertinente des SNP avant de passer en génotypage au sein d'une cohorte de patients.

Nous n'avons pas retrouvé d'influence de polymorphismes de transporteurs d'influx du GCV sur l'évolution de la concentration des neutrophiles de patients transplantés sous traitement. Une approche inversée pourrait nous permettre dans un premier temps d'identifier des transporteurs cibles empruntés par GCV (par étude du transport du GCV dans des modèles cellulaires transfectés). Cette étude serait beaucoup plus lente que l'approche retenue dans ce travail. En effet, la conception de modèles cellulaires (clonage du gène cible et transfection des cellules) est une étape longue et plus laborieuse.

Dans ce travail nous avons fait l'hypothèse que le transport du GCV passait essentiellement par des transporteurs. De la même façon, les métabolites intracellulaires du GCV (GCV-MP, GCV-DP, GCV-TP), du fait de leurs charges négatives, ont de très faibles probabilités de franchir la bicouche lipidique par diffusion simple. Des arguments *in silico* et *in vitro* par construction de modèles de liposomes pourraient explorer la part de la diffusion passive du GCV et de ses métabolites dans la cellule (travaux en cours).

Le niveau d'exposition des patients à la forme active du GCV, étudiée sous forme d'une l'ASC<sub>0-5h</sub> de GCV-TP a été associé à un sur-risque de toxicité hématologique (diminution des neutrophiles) au 3<sup>ème</sup> mois de traitement. Afin de pouvoir l'utiliser comme biomarqueur, il serait envisageable de suivre l'évolution de l'exposition au GCV-TP au cours du traitement et sa corrélation avec l'évolution du nombre de neutrophiles le cas échéant. Si l'ASC reste constante tout au long du traitement alors une première mesure de l'ASC chez les patients en début de traitement pourrait présager du risque d'apparition de toxicité. A l'inverse, si l'ASC de GCV-TP augmente au cours du temps, dans ce cas il faudrait explorer les facteurs de cette variabilité. Ces facteurs pourraient alors également être impliqués dans la toxicité du GCV.

Nous avons pu également constater qu'il n'existe pas de corrélation entre les concentrations plasmatiques de GCV et les concentrations intracellulaires de GCV-TP. Or le GCV-TP est la forme active et semblerait également être la forme impliquée dans l'apparition de la toxicité. Cela va dans le sens des études qui montrent de faibles expositions plasmatiques peuvent conduire à une toxicité hématologique (94). L'exploration des concentrations intracellulaires de GCV-TP à travers des études POPPK semble donc nécessaire, d'autant plus que la toxicité au niveau des neutrophiles est le facteur limitant à la poursuite du traitement et favorise indirectement l'émergence des souches virales résistantes.

En conclusion, ce travail de thèse aborde différents aspects de l'individualisation thérapeutique : l'aspect pharmacogénétique pour la prévention des effets indésirables et l'aspect pharmacocinétique pour la compréhension du mécanisme toxique. Au cours de cette thèse, nous avons montré que l'accumulation de GCV sous sa forme active pourrait être liée à la toxicité au niveau des neutrophiles à trois mois chez les patients transplantés. La grande variabilité des profils PK entre les patients laisse envisager une susceptibilité génétique. En parallèle nous avons mis en évidence un polymorphisme de protéine de transport susceptible d'influencer la pharmacocinétique du GCV ainsi que l'apparition de la toxicité. Jusqu'à présent, les études publiées n'avaient concerné que les variabilités du GCV plasmatique et n'avaient, finalement, que très peu d'impact en termes de prévention des événements indésirables en routine. L'investigation des polymorphismes des transporteurs d'influx et d'efflux du GCV est une voie de recherche encore peu explorée. Ce champ de recherche devrait pouvoir mieux expliquer la variabilité inter-individuelle de la réponse au traitement. Dans l'avenir, l'association pharmacogénétique et pharmacocinétique devrait contribuer à l'amélioration de la prise en charge individuelle du transplanté rénal.



## Références bibliographiques

---

1. **Weclawiak H, Mengelle C, Ould Mohamed A, Izopet J, Rostaing L, Kamar N.** 2010. Cytomegalovirus effects in solid organ transplantation and the role of antiviral prophylaxis. *Néphrologie Thérapeutique* **6**:505–512.
2. **Bataille S, Moal V, Gaudart J, Indreies M, Purgus R, Dussol B, Zandotti C, Berland Y, Vacher-Coponat H.** 2010. Cytomegalovirus risk factors in renal transplantation with modern immunosuppression. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc* **12**:480–488.
3. **De Clercq E.** 2004. Antivirals and antiviral strategies. *Nat Rev Microbiol* **2**:704–720.
4. **Wiltshire H, Paya CV, Pescovitz MD, Humar A, Dominguez E, Washburn K, Blumberg E, Alexander B, Freeman R, Heaton N, Zuideveld KP, Valganciclovir Solid Organ Transplant Study Group.** 2005. Pharmacodynamics of oral ganciclovir and valganciclovir in solid organ transplant recipients. *Transplantation* **79**:1477–1483.
5. **Jordan MC.** 1983. Latent infection and the elusive cytomegalovirus. *Rev Infect Dis* **5**:205–215.
6. **Diamond RD, Keller R, Lee G, Finkel D.** 1977. Lysis of cytomegalovirus-infected human fibroblasts and transformed human cells by peripheral blood lymphoid cells from normal human donors. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N* **154**:259–263.
7. **Riley HD.** 1997. History of the cytomegalovirus. *South Med J* **90**:184–190.
8. 2012. Part III. The ICTV, p. 1261–1291. *In* King, AMQ, Adams, MJ, Carstens, EB, Lefkowitz, EJ (eds.), *Virus Taxonomy*. Elsevier, San Diego.
9. **Knipe DM, Howley PM.** 2007. *Fields' Virology*. Lippincott Williams & Wilkins.

10. **Wright HT, Goodheart CR, Lielausis A.** 1964. HUMAN CYTOMEGALOVIRUS. MORPHOLOGY BY NEGATIVE STAINING. *Virology* **23**:419–424.
11. **Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Chee MS, Hutchison CA, Kouzarides T, Martignetti JA, Preddie E.** 1991. The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome. *DNA Seq J DNA Seq Mapp* **2**:1–12.
12. **Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Horsnell T, Hutchison CA, Kouzarides T, Martignetti JA.** 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* **154**:125–169.
13. **Rowe WP, Hartley JW, Waterman S, Turner HC, Huebner RJ.** 1956. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N* **92**:418–424.
14. **Dolan A, Cunningham C, Hector RD, Hassan-Walker AF, Lee L, Addison C, Dargan DJ, McGeoch DJ, Gatherer D, Emery VC, Griffiths PD, Sinzger C, McSharry BP, Wilkinson GWG, Davison AJ.** 2004. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **85**:1301–1312.
15. **Sijmons S, Van Ranst M, Maes P.** 2014. Genomic and Functional Characteristics of Human Cytomegalovirus Revealed by Next-Generation Sequencing. *Viruses* **6**:1049–1072.
16. **Mocarski ES, St Pass R.** 2007. Cytomegaloviruses. *Fields Virol* **2**:2705–2710.
17. **Little E, Stuart AD, Chee MS.** 1992. Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature* **358**:160–162.

18. **Mocarski Jr. ES.** 2007. Betaherpes viral genes and their functions, p. . *In* Arvin, A, Campadelli-Fiume, G, Mocarski, E, Moore, PS, Roizman, B, Whitley, R, Yamanishi, K (eds.), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, Cambridge.
19. **Lopper M, Compton T.** 2004. Coiled-coil domains in glycoproteins B and H are involved in human cytomegalovirus membrane fusion. *J Virol* **78**:8333–8341.
20. **Döhner K, Sodeik B.** 2005. The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr Top Microbiol Immunol* **285**:67–108.
21. **Wiebusch L, Asmar J, Uecker R, Hagemeyer C.** 2003. 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.
22. **Paulus C, Krauss S, Nevels M.** 2006. A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc Natl Acad Sci U A* **103**:3840–5.
23. **Yu X, Trang P, Shah S, Atanasov I, Kim YH, Bai Y, Zhou ZH, Liu F.** 2005. Dissecting human cytomegalovirus gene function and capsid maturation by ribozyme targeting and electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci U A* **102**:7103–8.
24. **Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H.** 2009. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res* **143**:222–34.
25. **Kumar ML, Nankervis GA, Gold E.** 1973. Inapparent congenital cytomegalovirus infection. A follow-up study. *N Engl J Med* **288**:1370–2.
26. **Gold E Nankervis GA.** 1976. Cytomegalovirus, p. 143–161. *In* Press, P (ed.), *Viral infections of humans: epidemiology and control*. New York.

27. **Hecker M, Qiu D, Marquardt K, Bein G, Hackstein H.** 2004. Continuous cytomegalovirus seroconversion in a large group of healthy blood donors. *Vox Sang* **86**:41–4.
28. **Brune W.** 2011. Inhibition of programmed cell death by cytomegaloviruses. *Virus Res* **157**:144–150.
29. **Sinclair E, Tan QX, Sharp M, Girling V, Poon C, Natta MV, Jabs DA, Inokuma M, Maecker HT, Brecht B, Jacobson MA.** 2006. 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.
30. **Sweet C.** 1999. The pathogenicity of cytomegalovirus. *FEMS Microbiol Rev* **23**:457–82.
31. **McDonagh S, Maidji E, Chang HT, Pereira L.** 2006. Patterns of human cytomegalovirus infection in term placentas: a preliminary analysis. *J Clin Virol* **35**:210–5.
32. **Tu W, Potena L, Stepick-Biek P, Liu L, Dionis KY, Luikart H, Fearon WF, Holmes TH, Chin C, Cooke JP, Valantine HA, Mocarski ES, Lewis DB.** 2006. T-cell immunity to subclinical cytomegalovirus infection reduces cardiac allograft disease. *Circulation* **114**:1608–15.
33. **Smith MS, Bentz GL, Alexander JS, Yurochko AD.** 2004. Human cytomegalovirus induces monocyte differentiation and migration as a strategy for dissemination and persistence. *J Virol* **78**:4444–4453.

34. **Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, Veren DA, Page F, Alford CA.** 1986. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *Jama* **256**:1904–8.
35. **Griffiths PD, Baboonian C, Rutter D, Peckham C.** 1991. Congenital and maternal cytomegalovirus infections in a London population. *Br J Obstet Gynaecol* **98**:135–140.
36. **Casteels A, Naessens A, Gordts F, De Catte L, Bougatef A, Foulon W.** 1999. Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infections. *J Perinat Med* **27**:116–121.
37. **Barbi M, Binda S, Primache V, Clerici D.** 1998. Congenital cytomegalovirus infection in a northern Italian region. NEOCMV Group. *Eur J Epidemiol* **14**:791–796.
38. **Williamson WD, Demmler GJ, Percy AK, Catlin FI.** 1992. Progressive hearing loss in infants with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* **90**:862–866.
39. **Smithers-Sheedy H, Raynes-Greenow C, Badawi N, Khandaker G, Menzies R, Jones CA.** 2015. Cytomegalovirus-related childhood mortality in Australia 1999-2011. *J Paediatr Child Health*.
40. **Rowshani AT, Bemelman FJ, van Leeuwen EM, van Lier RA, Berge IJ ten.** 2005. Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* **79**:381–6.
41. **Fishman JA, Emery V, Freeman R, Pascual M, Rostaing L, Schlitt HJ, Sgarabotto D, Torre-Cisneros J, Uknis ME.** 2007. Cytomegalovirus in transplantation - challenging the status quo. *Clin Transpl* **21**:149–58.
42. **Atabani SF, Smith C, Atkinson C, Aldridge RW, Rodriguez-Perálvarez M, Rolando N, Harber M, Jones G, O’Riordan A, Burroughs AK, Thorburn D, O’Beirne J,**

- Milne RSB, Emery VC, Griffiths PD.** 2012. Cytomegalovirus Replication Kinetics in Solid Organ Transplant Recipients Managed by Preemptive Therapy. *Am J Transplant* **12**:2457–2464.
43. **Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, Humar A, Transplantation Society International CMV Consensus Group.** 2013. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* **96**:333–360.
44. **Noble S, Faulds D.** 1998. Ganciclovir. An update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drugs* **56**:115–46.
45. **Zimmermann A, Michel D, Pavic I, Hampl W, Luske A, Neyts J, De Clercq E, Mertens T.** 1997. Phosphorylation of aciclovir, ganciclovir, penciclovir and S2242 by the cytomegalovirus UL97 protein: a quantitative analysis using recombinant vaccinia viruses. *Antivir Res* **36**:35–42.
46. **Brestrich G, Zwinger S, Fischer A, Schmuck M, Rohmhild A, Hammer MH, Kurtz A, Uharek L, Knosalla C, Lehmkuhl H, Volk HD, Reinke P.** 2009. Adoptive T-cell therapy of a lung transplanted patient with severe CMV disease and resistance to antiviral therapy. *Am J Transpl* **9**:1679–84.
47. **Cihlar T, Chen MS.** 1996. Identification of enzymes catalyzing two-step phosphorylation of cidofovir and the effect of cytomegalovirus infection on their activities in host cells. *Mol Pharmacol* **50**:1502–1510.
48. **Compton T, Nowlin DM, Cooper NR.** 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**:834–841.

49. **Jones TR, Lee S-W, Johann SV, Razinkov V, Visalli RJ, Feld B, Bloom JD, O'Connell J.** 2004. Specific Inhibition of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B-Mediated Fusion by a Novel Thiourea Small Molecule. *J Virol* **78**:1289–1300.
50. **Biron KK, Harvey RJ, Chamberlain SC, Good SS, Smith AA, Davis MG, Talarico CL, Miller WH, Ferris R, Dornsife RE, Stanat SC, Drach JC, Townsend LB, Koszalka GW.** 2002. Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2365–2372.
51. **Hantz S, Garnier-Geoffroy F, Mazon M-C, Garrigue I, Merville P, Mengelle C, Rostaing L, Marcoux FS, Essig M, Rerolle J-P, Cotin S, Germe R, Pillet S, Lebranchu Y, Turlure P, Alain S, Herbein G, Coaquette A, Lafon ME, Garrigue I, Archimbaud C, Henquell C, Peigue-Lafeuille H, Pothier P, Bour JB, Cesaire R, Majiollah F, Morand P, Germe R, Morel-Baccard C, Signori-Schmuck A, Alain S, Hantz S, Grosjean J, Morfin-Sherpa F, Billaud G, Domenach V, Andre P, Milon MP, Segondy M, Foulongne V, Agius G, Beby-Defaux A, Pozzetto B, Pillet S, Mansuy JM, Mengelle C, Gaudio-Castelain S, Ducancelle A, Lunel F, Payan C, Gouarin S, Dewilde A, Bressolette C, Coste-Burel M, Imbert-Marcille B-M, Andreoletti L, Leveque N, Venard V, Jeulin H, Minjolle S, Gueudin M, Colimon R, Stoll-Keller F, Fafi-Kremer S, Dubois F, Gaudy C, Deny P, Vezinet FB, Houhou N, Honderlick P, Mazon MC, Leruez-Ville M, Vaghefi P, Dussaix E, Agut H, Boutolleau D, Deback C, Scieux C, Goff JL, Ducloux D, Vanlemmens C, Larosa F, Neau-Cransac M, Dromer C, Rosier E, Merville P, Douillet M, Morel D, Moreau K, Martin S, Billes M-A, Milpied N, Tabrizi R, Vigouroux S, Melot C, Deteix P, Heng A-E, Mackaya L, Casanova S, Bay J-O, Demeocq F, Duee F, Mousson C, Hillon P, Minello A, Charve P, Tanter Y, Bayle F, Janbon B, Borrel E, Boignard A, Neron L, Pison C, Saint-Raymond C, Brion JP, Cahn JY, Bordessoule D, Turlure P, Bompert F, Philippon C, Essig M, Aldigier J-C, Rerolle JP, Dickson Z, Leprivey V,**

- Roger-Rolle F, Piguet C, Marquet P, Francois B, Pouteil-Noble C, Mialou V, Mourad G, Mariat C, Cornillon J, Tavernie-Tardy E, Attal M, Huynh A, Rostaing L, Kamar N, Mencia D, Crognier L, Ligny BH de, Hazzan M, Bordigoni P, Pall-Kondolff S, Salmon A, Clement L, Chevallier P, Gouill SL, Gastinne T, Delaunay J, Ayari S, Guillaume T, Mohty M, Moreau P, Robin M-A, Houerou CL, Giral M, Papuchon E, Pattier S, Treilhaud M, Camus C, Etienne I, Moulin B, Caillard-Ohlmann S, Lioure B, Cojean N, Lutz P, Uettwiller F, Entz-Werle N, Laplace A, Buchler M, Lebranchu Y, Barbet C, Fourchy D, Stern M, Grenet D, Delahousse M, Karras A, Saliba F, Ichai P, Dhedin N, Vernant J-P, Uzunov M, Barrou B, Glotz D, Peraldi M-N, Langner N, Ribaud P. 2010. Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J Antimicrob Chemother* **65**:2628–2640.
52. **Lalezari JP, Aberg JA, Wang LH, Wire MB, Miner R, Snowden W, Talarico CL, Shaw S, Jacobson MA, Drew WL.** 2002. Phase I dose escalation trial evaluating the pharmacokinetics, anti-human cytomegalovirus (HCMV) activity, and safety of 1263W94 in human immunodeficiency virus-infected men with asymptomatic HCMV shedding. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2969–2976.
53. **Wang LH, Peck RW, Yin Y, Allanson J, Wiggs R, Wire MB.** 2003. Phase I safety and pharmacokinetic trials of 1263W94, a novel oral anti-human cytomegalovirus agent, in healthy and human immunodeficiency virus-infected subjects. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1334–1342.
54. **Marty FM, Ljungman P, Papanicolaou GA, Winston DJ, Chemaly RF, Strasfeld L, Young J-AH, Rodriguez T, Maertens J, Schmitt M, Einsele H, Ferrant A, Lipton JH, Villano SA, Chen H, Boeckh M.** 2011. Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: a phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet Infect Dis* **11**:284–292.



55. **Efferth T, Marschall M, Wang X, Huong S-M, Hauber I, Olbrich A, Kronschnabl M, Stamminger T, Huang E-S.** 2001. Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses. *J Mol Med* **80**:233–242.
56. **Efferth T, Romero MR, Wolf DG, Stamminger T, Marin JJG, Marschall M.** 2008. The antiviral activities of artemisinin and artesunate. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **47**:804–811.
57. **Sellar RS, Ward KN, Thomson KJ, Peggs KS.** 2012. Evidence for clinical activity of artesunate in multidrug-resistant herpes simplex infection following HSCT. *Bone Marrow Transplant* **47**:1482–1483.
58. **Schreiber A, Härter G, Schubert A, Bunjes D, Mertens T, Michel D.** 2009. Antiviral treatment of cytomegalovirus infection and resistant strains. *Expert Opin Pharmacother* **10**:191–209.
59. **Champier G, Couvreur A, Hantz S, Rametti A, Mazon M-C, Bouaziz S, Denis F, Alain S.** 2008. Putative functional domains of human cytomegalovirus pUL56 involved in dimerization and benzimidazole D-ribonucleoside activity. *Antivir Ther* **13**:643–654.
60. **Goldner T, Hewlett G, Ettischer N, Ruebsamen-Schaeff H, Zimmermann H, Lischka P.** 2011. The novel anticytomegalovirus compound AIC246 (Letermovir) inhibits human cytomegalovirus replication through a specific antiviral mechanism that involves the viral terminase. *J Virol* **85**:10884–10893.
61. **Chemaly RF, Ullmann AJ, Stoelben S, Richard MP, Bornhäuser M, Groth C, Einsele H, Silverman M, Mullane KM, Brown J, Nowak H, Kölling K, Stobernack HP, Lischka P, Zimmermann H, Rübsamen-Schaeff H, Champlin RE, Ehninger G.** 2014. Letermovir for Cytomegalovirus Prophylaxis in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med* **370**:1781–1789.

62. **Painter W, Robertson A, Trost LC, Godkin S, Lampert B, Painter G.** 2012. First Pharmacokinetic and Safety Study in Humans of the Novel Lipid Antiviral Conjugate CMX001, a Broad-Spectrum Oral Drug Active against Double-Stranded DNA Viruses. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:2726–2734.
63. **Hostetler KY.** 2009. Alkoxyalkyl prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates enhance oral antiviral activity and reduce toxicity: Current state of the art. *Antiviral Res* **82**:A84–A98.
64. **Aldern KA, Ciesla SL, Winegarden KL, Hostetler KY.** 2003. Increased antiviral activity of 1-O-hexadecyloxypropyl-[ 2-C-14] cidofovir in MRC-5 human lung fibroblasts is explained by unique cellular uptake and metabolism. *Mol Pharmacol* **63**:678–681.
65. **Marty FM, Winston DJ, Rowley SD, Vance E, Papanicolaou GA, Mullane KM, Brundage TM, Robertson AT, Godkin S, Momméja-Marin H, Boeckh M.** 2013. CMX001 to Prevent Cytomegalovirus Disease in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med* **369**:1227–1236.
66. **Dropulic LK, Cohen JI.** 2010. Update on New Antivirals under Development for the Treatment of Double-stranded DNA Virus Infections. *Clin Pharmacol Ther* **88**:610–619.
67. **Williams-Aziz SL, Hartline CB, Harden EA, Daily SL, Prichard MN, Kushner NL, Beadle JR, Wan WB, Hostetler KY, Kern ER.** 2005. Comparative activities of lipid esters of cidofovir and cyclic cidofovir against replication of herpesviruses in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3724–3733.
68. **Beadle JR, Hartline C, Aldern KA, Rodriguez N, Harden E, Kern ER, Hostetler KY.** 2002. Alkoxyalkyl esters of cidofovir and cyclic cidofovir exhibit multiple-log enhancement of antiviral activity against cytomegalovirus and herpesvirus replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2381–2386.

69. **Le Page AK, Jager MM, Iwasenko JM, Scott GM, Alain S, Rawlinson WD.** 2013. Clinical aspects of cytomegalovirus antiviral resistance in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **56**:1018–1029.
70. **Kuypers DRJ, Le Meur Y, Cantarovich M, Tredger MJ, Tett SE, Cattaneo D, Tönshoff B, Holt DW, Chapman J, van Gelder T, Transplantation Society (TTS) Consensus Group on TDM of MPA.** 2010. Consensus report on therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in solid organ transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN* **5**:341–358.
71. **Tett SE, Saint-Marcoux F, Staats CE, Brunet M, Vinks AA, Miura M, Marquet P, Kuypers DR, van Gelder T, Cattaneo D.** 2011. Mycophenolate, clinical pharmacokinetics, formulations, and methods for assessing drug exposure. *Transplant Rev Orlando Fla* **25**:47–57.
72. **Shuker N, van Gelder T, Hesselink DA.** 2015. Intra-patient variability in tacrolimus exposure: Causes, consequences for clinical management. *Transplant Rev Orlando Fla* **29**:78–84.
73. **Li F, Kenyon KW, Kirby KA, Fishbein DP, Boeckh M, Limaye AP.** 2007. Incidence and clinical features of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease in heart transplant recipients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **45**:439–447.
74. **Limaye AP, Raghu G, Koelle DM, Ferrenberg J, Huang M-L, Boeckh M.** 2002. High incidence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection among lung transplant recipients receiving preemptive therapy. *J Infect Dis* **185**:20–27.
75. **Limaye AP, Corey L, Koelle DM, Davis CL, Boeckh M.** 2000. Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants. *Lancet* **356**:645–649.

76. **Avery RK.** 1999. Special considerations regarding CMV in lung transplantation. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc* **1 Suppl 1**:13–18.
77. **Balthesen M, Messerle M, Reddehase MJ.** 1993. Lungs are a major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence. *J Virol* **67**:5360–5366.
78. **Chou S.** 1999. Antiviral drug resistance in human cytomegalovirus. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc* **1**:105–114.
79. **Baldanti F, Sarasini A, Silini E, Barbi M, Lazzarin A, Biron KK, Gerna G.** 1995. Four dually resistant human cytomegalovirus strains from AIDS patients: single mutations in UL97 and UL54 open reading frames are responsible for ganciclovir- and foscarnet-specific resistance, respectively. *Scand J Infect Dis Suppl* **99**:103–104.
80. **Baldanti F, Underwood MR, Stanat SC, Biron KK, Chou S, Sarasini A, Silini E, Gerna G.** 1996. Single amino acid changes in the DNA polymerase confer foscarnet resistance and slow-growth phenotype, while mutations in the UL97-encoded phosphotransferase confer ganciclovir resistance in three double-resistant human cytomegalovirus strains recovered from patients with AIDS. *J Virol* **70**:1390–1395.
81. **Cihlar T, Fuller MD, Mulato AS, Cherrington JM.** 1998. A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene selected in vitro by cidofovir confers a slow replication phenotype in cell culture. *Virology* **248**:382–393.
82. **Chou S, Wechel LCV, Marousek GI.** 2007. Cytomegalovirus UL97 kinase mutations that confer maribavir resistance. *J Infect Dis* **196**:91–94.
83. **Scott JC, Partovi N, Ensom MHH.** 2004. Ganciclovir in solid organ transplant recipients: is there a role for clinical pharmacokinetic monitoring? *Ther Drug Monit* **26**:68–77.

84. **Sullivan V, Talarico CL, Stanat SC, Davis M, Coen DM, Biron KK.** 1992. A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* **358**:162–164.
85. **Rubin RH.** 1999. Importance of CMV in the transplant population. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc* **1 Suppl 1**:3–7.
86. **Pescovitz MD, Jain A, Robson R, Mulgaonkar S, Freeman R, Bouw MR.** 2007. Establishing pharmacokinetic bioequivalence of valganciclovir oral solution versus the tablet formulation. *Transplant Proc* **39**:3111–3116.
87. **Cvetković RS, Wellington K.** 2005. Valganciclovir: a review of its use in the management of CMV infection and disease in immunocompromised patients. *Drugs* **65**:859–878.
88. **Goodrich JM, Bowden RA, Fisher L, Keller C, Schoch G, Meyers JD.** 1993. Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann Intern Med* **118**:173–178.
89. **Billat P-A, Sauvage F-L, Picard N, Tafzi N, Alain S, Essig M, Marquet P, Saint-Marcoux F.** 2015. Liquid chromatography tandem mass spectrometry quantitation of intracellular concentrations of ganciclovir and its phosphorylated forms. *Anal Bioanal Chem.*
90. **Neely MN, van Guilder MG, Yamada WM, Schumitzky A, Jelliffe RW.** 2012. Accurate detection of outliers and subpopulations with Pmetrics, a nonparametric and parametric pharmacometric modeling and simulation package for R. *Ther Drug Monit* **34**:467–476.

91. **Vezina HE, Brundage RC, Balfour HH.** 2014. Population pharmacokinetics of valganciclovir prophylaxis in paediatric and adult solid organ transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol* **78**:343–352.
92. **Manuel O, Pascual M, Perrottet N, Lamothe F, Venetz J-P, Decosterd LA, Buclin T, Meylan PR.** 2010. Ganciclovir exposure under a 450 mg daily dosage of valganciclovir for cytomegalovirus prevention in kidney transplantation: a prospective study. *Clin Transplant* **24**:794–800.
93. **Caldés A, Colom H, Armendariz Y, Garrido MJ, Troconiz IF, Gil-Vernet S, Lloberas N, Pou L, Peraire C, Grinyó JM.** 2009. Population pharmacokinetics of ganciclovir after intravenous ganciclovir and oral valganciclovir administration in solid organ transplant patients infected with cytomegalovirus. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:4816–4824.
94. **Perrottet N, Decosterd LA, Meylan P, Pascual M, Biollaz J, Buclin T.** 2009. Valganciclovir in adult solid organ transplant recipients: pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics and clinical interpretation of plasma concentration measurements. *Clin Pharmacokinet* **48**:399–418.
95. **Saint-Marcoux F.** 2012. Chapter 5 - Current Practice of Therapeutic Drug Monitoring: Dose Adjustment of Drugs using Pharmacokinetic Models, p. 103–119. *In* Dasgupta, A (ed.), *Therapeutic Drug Monitoring*. Academic Press, Boston.
96. **Rousseau A, Sabot C, Delepine N, Delepine G, Debord J, Lachâtre G, Marquet P.** 2002. Bayesian estimation of methotrexate pharmacokinetic parameters and area under the curve in children and young adults with localised osteosarcoma. *Clin Pharmacokinet* **41**:1095–1104.
97. **Mallet A.** 1986. A maximum likelihood estimation method for random coefficient regression models. *Biometrika* **73**:645–656.

98. **Smee DF, Boehme R, Chernow M, Binko BP, Matthews TR.** 1985. Intracellular metabolism and enzymatic phosphorylation of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine and acyclovir in herpes simplex virus-infected and uninfected cells. *Biochem Pharmacol* **34**:1049–1056.
99. **Halloran PJ, Fenton RG.** 1998. Irreversible G2-M Arrest and Cytoskeletal Reorganization Induced by Cytotoxic Nucleoside Analogues. *Cancer Res* **58**:3855–3865.
100. **Adachi M, Sampath J, Lan L, Sun D, Hargrove P, Flatley R, Tatum A, Edwards MZ, Wezeman M, Matherly L, Drake R, Schuetz J.** 2002. Expression of MRP4 confers resistance to ganciclovir and compromises bystander cell killing. *J Biol Chem* **277**:38998–39004.
101. **Abla N, Chinn LW, Nakamura T, Liu L, Huang CC, Johns SJ, Kawamoto M, Stryke D, Taylor TR, Ferrin TE, Giacomini KM, Kroetz DL.** 2008. The human multidrug resistance protein 4 (MRP4, ABCC4): functional analysis of a highly polymorphic gene. *J Pharmacol Exp Ther* **325**:859–868.
102. **Billat PA, Saint-Marcoux F, Woillard JB, Merville P, Rostaing L, Kamar N, Rerolle JP, Essig M, Marquet P, Picard N.** 2013. Genetic Variations in Membrane Transporters and the Decrease in Neutrophils Induced by Ganciclovir Therapy: an Exploratory Study in Renal Transplant Patients. *Ther Drug Monit* **35**:673–673.
103. 2010. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* **9**:215–236.
104. **Wilke RA, Ramsey LB, Johnson SG, Maxwell WD, McLeod HL, Voora D, Krauss RM, Roden DM, Feng Q, Cooper-Dehoff RM, Gong L, Klein TE, Wadelius M, Niemi M, Clinical Pharmacogenomics Implementation Consortium (CPIC).** 2012. The clinical pharmacogenomics implementation consortium: CPIC guideline for SLCO1B1 and simvastatin-induced myopathy. *Clin Pharmacol Ther* **92**:112–117.

105. **Sekine T, Cha SH, Endou H.** 2000. The multispecific organic anion transporter (OAT) family. *Pflugers Arch* **440**:337–50.
106. **Hagenbuch B, Gui C.** 2008. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica* **38**:778–801.
107. **Koepsell H, Lips K, Volk C.** 2007. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res* **24**:1227–51.
108. **Ritzel MW, Ng AM, Yao SY, Graham K, Loewen SK, Smith KM, Hyde RJ, Karpinski E, Cass CE, Baldwin SA, Young JD.** 2001. 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.
109. **Cano-Soldado P, Llorayoz IM, Molina-Arcas M, Casado FJ, Martinez-Picado J, Lostao MP, Pastor-Anglada M.** 2004. Interaction of nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase with the concentrative nucleoside transporter-1 (SLC28A1). *Antivir Ther* **9**:993–1002.
110. **Otsuka M, Matsumoto T, Morimoto R, Arioka S, Omote H, Moriyama Y.** 2005. A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proc Natl Acad Sci U A* **102**:17923–8.
111. **Nies AT, Koepsell H, Damme K, Schwab M.** Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. *Handb Exp Pharmacol* 105–67.



112. **Roepe PD**. 1998. The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? *J Membr Biol* **166**:71–3.
113. **Köck K, Grube M, Jedlitschky G, Oevermann L, Siegmund W, Ritter CA, Kroemer HK**. 2007. Expression of adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) drug transporters in peripheral blood cells: relevance for physiology and pharmacotherapy. *Clin Pharmacokinet* **46**:449–470.
114. **Mahony WB, Domin BA, Zimmerman TP**. 1991. Ganciclovir permeation of the human erythrocyte membrane. *Biochem Pharmacol* **41**:263–271.
115. **Biron KK, Stanat SC, Sorrell JB, Fyfe JA, Keller PM, Lambe CU, Nelson DJ**. 1985. Metabolic activation of the nucleoside analog 9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl]guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:2473–2477.
116. **Flechner SM, Avery RK, Fisher R, Mastroianni BA, Papajcik DA, O'Malley KJ, Goormastic M, Goldfarb DA, Modlin CS, Novick AC**. 1998. A randomized prospective controlled trial of oral acyclovir versus oral ganciclovir for cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant recipients. *Transplantation* **66**:1682–1688.
117. **Winston DJ, Wirin D, Shaked A, Busuttil RW**. 1995. Randomised comparison of ganciclovir and high-dose acyclovir for long-term cytomegalovirus prophylaxis in liver-transplant recipients. *Lancet* **346**:69–74.
118. **Fletcher CV, Balfour HH**. 1989. Evaluation of ganciclovir for cytomegalovirus disease. *DICP Ann Pharmacother* **23**:5–12.
119. **Fletcher C, Sawchuk R, Chinnock B, de Miranda P, Balfour HH**. 1986. Human pharmacokinetics of the antiviral drug DHPG. *Clin Pharmacol Ther* **40**:281–286.

120. **Majumdar S, Macha S, Pal D, Mitra AK.** 2004. Mechanism of ganciclovir uptake by rabbit retina and human retinal pigmented epithelium cell line ARPE-19. *Curr Eye Res* **29**:127–136.
121. **Pacifici GM.** 2005. Transfer of antivirals across the human placenta. *Early Hum Dev* **81**:647–654.
122. **Gilstrap LC, Bawdon RE, Roberts SW, Sobhi S.** 1994. The transfer of the nucleoside analog ganciclovir across the perfused human placenta. *Am J Obstet Gynecol* **170**:967–972; discussion 972–973.
123. **Kotrych K, Sulikowski T, Domański L, Białecka M, Drożdżik M.** 2007. Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in renal transplant patients treated with cyclosporin A in a Polish population. *Pharmacol Rep PR* **59**:199–205.
124. **Paloncýová M, DeVane R, Murch B, Berka K, Otyepka M.** 2014. Amphiphilic drug-like molecules accumulate in a membrane below the head group region. *J Phys Chem B* **118**:1030–1039.
125. **Matsumoto K, Shigemi A, Ikawa K, Kanazawa N, Fujisaki Y, Morikawa N, Takeda Y.** 2015. Risk Factors for Ganciclovir-Induced Thrombocytopenia and Leukopenia. *Biol Pharm Bull* **38**:235–238.
126. **Merigan TC, Renlund DG, Keay S, Bristow MR, Starnes V, O'Connell JB, Resta S, Dunn D, Gamberg P, Ratkovec RM.** 1992. A controlled trial of ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after heart transplantation. *N Engl J Med* **326**:1182–1186.
127. **Gane E, Saliba F, Valdecasas GJ, O'Grady J, Pescovitz MD, Lyman S, Robinson CA.** 1997. Randomised trial of efficacy and safety of oral ganciclovir in the prevention of cytomegalovirus disease in liver-transplant recipients. *The Oral Ganciclovir*

- International Transplantation Study Group [corrected]. *Lancet Lond Engl* **350**:1729–1733.
128. **McGavin JK, Goa KL.** 2001. Ganciclovir: an update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drugs* **61**:1153–1183.
129. **Perrottet N, Csajka C, Pascual M, Manuel O, Lamoth F, Meylan P, Aubert JD, Venetz JP, Soccac P, Decosterd LA, Biollaz J, Buclin T.** 2009. Population Pharmacokinetics of Ganciclovir in Solid-Organ Transplant Recipients Receiving Oral Valganciclovir. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:3017–3023.
130. **Chen Z-S, Lee K, Kruh GD.** 2001. Transport of Cyclic Nucleotides and Estradiol 17- $\beta$ -d-Glucuronide by Multidrug Resistance Protein 4 RESISTANCE TO 6-MERCAPTOPYRIMIDINE AND 6-THIOGUANINE. *J Biol Chem* **276**:33747–33754.
131. **Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, Paibir SG, Flynn PM, Srinivas RV, Kumar A, Fridland A.** 1999. MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat Med* **5**:1048–1051.
132. **Anderson PL, Lamba J, Aquilante CL, Schuetz E, Fletcher CV.** 2006. Pharmacogenetic characteristics of indinavir, zidovudine, and lamivudine therapy in HIV-infected adults: a pilot study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 **42**:441–449.
133. **Kiser JJ, Aquilante CL, Anderson PL, King TM, Carten ML, Fletcher CV.** 2008. Clinical and genetic determinants of intracellular tenofovir diphosphate concentrations in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 **47**:298–303.
134. **Ansari M, Sauty G, Labuda M, Gagné V, Laverdière C, Moghrabi A, Sinnott D, Krajinovic M.** 2009. Polymorphisms in multidrug resistance-associated protein gene 4 is associated with outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **114**:1383–1386.

135. **Gradhand U, Lang T, Schaeffeler E, Glaeser H, Tegude H, Klein K, Fritz P, Jedlitschky G, Kroemer HK, Bachmakov I, Anwald B, Kerb R, Zanger UM, Eichelbaum M, Schwab M, Fromm MF.** 2007. Variability in human hepatic MRP4 expression: influence of cholestasis and genotype. *Pharmacogenomics J* **8**:42–52.
136. **Woodahl EL, Crouthamel MH, Bui T, Shen DD, Ho RJY.** 2009. MDR1 (ABCB1) G1199A (Ser400Asn) polymorphism alters transepithelial permeability and sensitivity to anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol* **64**:183–188.
137. **Gréen H, Söderkvist P, Rosenberg P, Horvath G, Peterson C.** 2008. ABCB1 G1199A polymorphism and ovarian cancer response to paclitaxel. *J Pharm Sci* **97**:2045–2048.
138. **Gréen H, Falk IJ, Lotfi K, Paul E, Hermansson M, Rosenquist R, Paul C, Nahi H.** 2012. Association of ABCB1 polymorphisms with survival and in vitro cytotoxicity in de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Pharmacogenomics J* **12**:111–118.
139. **Gregers J, Gréen H, Christensen IJ, Dalhoff K, Schroeder H, Carlsen N, Rosthøj S, Lausen B, Schmiegelow K, Peterson C.** 2015. Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*.
140. **Tamura M, Kondo M, Horio M, Ando M, Saito H, Yamamoto M, Horio Y, Hasegawa Y.** 2012. Genetic polymorphisms of the adenosine triphosphate-binding cassette transporters (ABCG2, ABCB1) and gefitinib toxicity. *Nagoya J Med Sci* **74**:133–140.
141. **Chen X, Chen D, Yang S, Ma R, Pan Y, Li X, Ma S.** 2015. Impact of ABCG2 polymorphisms on the clinical outcome of TKIs therapy in Chinese advanced non-small-cell lung cancer patients. *Cancer Cell Int* **15**.

142. **Koo D-H, Ryu M-H, Ryoo B-Y, Beck MY, Na Y-S, Shin J-G, Lee SS, Kim E-Y, Kang Y-K.** 2015. Association of ABCG2 polymorphism with clinical efficacy of imatinib in patients with gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Chemother Pharmacol* **75**:173–182.
143. **Skoglund K, Boiso Moreno S, Jönsson J-I, Vikingsson S, Carlsson B, Gréen H.** 2014. Single-nucleotide polymorphisms of ABCG2 increase the efficacy of tyrosine kinase inhibitors in the K562 chronic myeloid leukemia cell line. *Pharmacogenet Genomics* **24**:52–61.
144. **Shu Y, Brown C, Castro RA, Shi RJ, Lin ET, Owen RP, Sheardown SA, Yue L, Burchard EG, Brett CM, Giacomini KM.** 2008. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1, OCT1, on metformin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* **83**:273–280.
145. **Prentice RL, Zhao LP.** 1991. Estimating equations for parameters in means and covariances of multivariate discrete and continuous responses. *Biometrics* **47**:825–839.
146. **Weiss J, Herzog M, König S, Storch CH, Ketabi-Kiyanvash N, Haefeli WE.** 2009. Induction of multiple drug transporters by efavirenz. *J Pharmacol Sci* **109**:242–250.
147. **Cheung L, Yu DMT, Neiron Z, Failes TW, Arndt GM, Fletcher JI.** 2015. Identification of new MRP4 inhibitors from a library of FDA approved drugs using a high-throughput bioluminescence screen. *Biochem Pharmacol* **93**:380–388.
148. **Dessilly G, Elens L, Panin N, Capron A, Decottignies A, Demoulin J-B, Haufroid V.** 2014. ABCB1 1199G>A genetic polymorphism (Rs2229109) influences the intracellular accumulation of tacrolimus in HEK293 and K562 recombinant cell lines. *PLoS One* **9**:e91555.

149. **Zhu P, Zhu Q, Zhang Y, Ma X, Li Z, Li J, Chen J, Luo L, Ring HZ, Ring BZ, Su L.** 2013. ABCB1 variation and treatment response in AIDS patients: initial results of the Henan cohort. *PloS One* **8**:e55197.
150. **Gardner ER, Burger H, van Schaik RH, van Oosterom AT, de Bruijn EA, Guetens G, Prenen H, de Jong FA, Baker SD, Bates SE, Figg WD, Verweij J, Sparreboom A, Nooter K.** 2006. Association of enzyme and transporter genotypes with the pharmacokinetics of imatinib. *Clin Pharmacol Ther* **80**:192–201.
151. **Koren-Michowitz M, Buzaglo Z, Ribakovsky E, Schwarz M, Pessach I, Shimoni A, Beider K, Amariglio N, le Coutre P, Nagler A.** 2014. OCT1 genetic variants are associated with long term outcomes in imatinib treated chronic myeloid leukemia patients. *Eur J Haematol* **92**:283–288.
152. **Yee SW, Shima JE, Hesselson S, Nguyen L, De Val S, Lafond RJ, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Kwok P-Y, Ferrin TE, Black BL, Gurwitz D, Ahituv N, Giacomini KM.** 2009. Identification and characterization of proximal promoter polymorphisms in the human concentrative nucleoside transporter 2 (SLC28A2). *J Pharmacol Exp Ther* **328**:699–707.
153. **Doehring A, Hofmann WP, Schlecker C, Zeuzem S, Sarrazin C, Berg T, Müller T, Herrmann E, Geisslinger G, Lötsch J.** 2011. 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**:289–296.
154. **Suzuki Y, Homma M, Abei M, Hyodo I, Kohda Y.** 2013. Impact of solute carrier family 29 member 1 (SLC29A1) single nucleotide polymorphisms on mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells. *Biol Pharm Bull* **36**:144–146.
155. **Cascorbi I.** 2011. P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. *Handb Exp Pharmacol* 261–283.

156. **Park S-Y, Lee W, Lee J, Kim I-S.** 2008. Combination gene therapy using multidrug resistance (MDR1) gene shRNA and herpes simplex virus-thymidine kinase. *Cancer Lett* **261**:205–214.
157. **Oevermann L, Scheitz J, Starke K, Köck K, Kiefer T, Dölken G, Niessen J, Greinacher A, Siegmund W, Zygmunt M, Kroemer HK, Jedlitschky G, Ritter CA.** 2009. Hematopoietic stem cell differentiation affects expression and function of MRP4 (ABCC4), a transport protein for signaling molecules and drugs. *Int J Cancer J Int Cancer* **124**:2303–2311.
158. **Wang X, Furukawa T, Nitanda T, Okamoto M, Sugimoto Y, Akiyama S-I, Baba M.** 2003. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Mol Pharmacol* **63**:65–72.
159. **Engler JR, Zannettino ACW, Bailey CG, Rasko JEJ, Hughes TP, White DL.** 2011. OCT-1 function varies with cell lineage but is not influenced by BCR-ABL. *Haematologica* **96**:213–220.
160. **Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Kobayashi Y, Yamamoto T, Cha SH, Sekine T, Endou H.** 2002. Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport. *J Pharmacol Exp Ther* **300**:918–924.
161. **Owen RP, Badagnani I, Giacomini KM.** 2006. Molecular determinants of specificity for synthetic nucleoside analogs in the concentrative nucleoside transporter, CNT2. *J Biol Chem* **281**:26675–26682.
162. **Redell MS, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Tweardy DJ.** 2007. 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**:975–985.

163. **Hyde RJ, Cass CE, Young JD, Baldwin SA.** 2001. 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.
164. **Molina-Arcas M, Bellosillo B, Casado FJ, Montserrat E, Gil J, Colomer D, Pastor-Anglada M.** 2003. Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **101**:2328–2334.
165. **Jansen RS, Rosing H, Kromdijk W, Heine R ter, Schellens JH, Beijnen JH.** 2010. Simultaneous quantification of emtricitabine and tenofovir nucleotides in peripheral blood mononuclear cells using weak anion-exchange liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **878**:621–627.
166. **Bushman LR, Kiser JJ, Rower JE, Klein B, Zheng J-H, Ray ML, Anderson PL.** 2011. Determination of nucleoside analog mono-, di-, and tri-phosphates in cellular matrix by solid phase extraction and ultra-sensitive LC-MS/MS detection. *J Pharm Biomed Anal* **56**:390–401.
167. **King T, Bushman L, Kiser J, Anderson PL, Ray M, Delahunty T, Fletcher CV.** 2006. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of tenofovir-diphosphate in human peripheral blood mononuclear cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **843**:147–156.
168. **Paya C, Humar A, Dominguez E, Washburn K, Blumberg E, Alexander B, Freeman R, Heaton N, Pescovitz MD, Valganciclovir Solid Organ Transplant Study Group.** 2004. Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* **4**:611–620.



169. **Leary R, Jelliffe R, Schumitzky A, Van Guilder M.** 2001. An adaptive grid non-parametric approach to pharmacokinetic and dynamic (PK/PD) population models, p. 389–394. *In* Fourteenth IEEE Symposium on Computer-Based Medical Systems, Proceedings. IEEE Computer Soc, Los Alamitos.
170. **Tatarinova T, Neely M, Bartroff J, van Guilder M, Yamada W, Bayard D, Jelliffe R, Leary R, Chubatiuk A, Schumitzky A.** 2013. Two general methods for population pharmacokinetic modeling: non-parametric adaptive grid and non-parametric Bayesian. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* **40**:189–199.
171. **Akaike H.** 1998. Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle, p. 199–213. *In* Parzen, E, Tanabe, K, Kitagawa, G (eds.), *Selected Papers of Hirotugu Akaike*. Springer New York.

## Annexes

Annexe 1. Synopsis de l'étude Progress.....	155
Annexe 2. Avis rendu par le comité d'éthique .....	163
Annexe 3. Paramètres du modèle final. ....	164
Annexe 4. Protocoles utilisés .....	166
Annexe 4.1. Séquençage .....	166
Annexe 4.2. Conception des amorces.....	170
Annexe 4.3. Préparation des PBMC humains.....	172

## Annexe 1. Synopsis de l'étude Progress

<b>GESTIONNAIRE</b>	<b>CHU de Limoges</b>
<b>PHARMACOLOGUE COORDONNATEUR</b>	<b>Pr Franck Saint-Marcoux Inserm UMR 850 Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance</b>
<b>RESPONSABLE SCIENTIFIQUE</b>	<b>Pierre-André BILLAT Inserm UMR 850</b>
<b>TITRE</b>	<b>Pharmacokinetics of Ganciclovir and Ganciclovir triphosphate in renal transplant patients (PrOGGRess)</b>
<b>JUSTIFICATION / CONTEXTE</b>	<p>Cytomegalovirus (CMV) infection is a major issue in all immunodepressed patients, since it is associated with high morbidity. Ganciclovir (GCV), the most employed drug against CMV, can be measured in plasma by several assays, the most used being HPLC with detection by tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). GCV Blood concentration does not seem to be directly linked with toxicity even if its hematological toxicity is dose-limiting.</p> <p>GCV triphosphate (GCV-TP) is the active form of the drug. It inhibits viral DNA synthesis through competitive inhibition of incorporation of deoxyguanosine triphosphate into DNA and through incorporation of GCV-TP into viral DNA causing termination of viral DNA elongation. Intracellular GCV-TP is trapped in the cell, which creates a different pharmacokinetic profile from that of GCV in plasma. To better understand GCV cellular pharmacodynamics in vivo, we developed a HPLC-MS/MS method allowing the determination of intracellular GCV-TP. We aim to better understand GCV and its metabolites accumulation in blood cells, to</p>

	<p>predict and prevent toxicity due to abnormal accumulation in patient cells.</p>
<b>OBJECTIFS</b>	<p><b><u>Primary objective</u></b></p> <p>To study GCV and GCV-TP pharmacokinetics (PK) parameters inside white blood cells of renal transplant patients.</p> <p><b><u>Secondary objectives :</u></b></p> <p>To perform a population pharmacokinetic study of GCV and GCV TP, that is: (i) development of a PK model describing the observed GCV and GCV TP profiles; (ii) determination of individual covariates explaining the interpatient variability); (iii) exploration of the relationships between plasmatic and intracellular concentrations.</p>
<b>SCHEMA DE LA RECHERCHE</b>	<p>This study is a monocentric pharmacokinetic study based on a biological collection (DC-2010-1074), and registered by the CNIL under number 1775949.</p> <p>Routine therapeutic drug monitoring of immunosuppressants is based on blood samples collected before drug intake and at 20 min, 1h and 3h post dose. Samples needed for the purpose of this PK study are the following: before drug intake (1h, 2h, 3h and 5h post-dose, at 3 months after the beginning of the treatment by VGCV (i.e. 3 months after transplantation). GCV and immunosuppressants are administered simultaneously. Therefore, extra samples will be drawn at 2h and 5h post-dose for the purpose of this study, according to the Code de la Santé Publique, article L1221-8-1.</p>
<b>CRITERES D'INCLUSION</b>	<p>- Renal transplant patients treated with standard doses</p>

	<p>of VGCV for prophylaxis or preemptive therapy for 3 months</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Age <math>\geq</math> 18 years</li> <li>- Patients willing to give their written informed consent for their participation to biological collection DC-2010-1074</li> </ul>
<b>CRITERES DE NON INCLUSION</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Age &lt; 18 years.</li> <li>- Renal transplant patients who have been transplanted for more than 3 months</li> <li>- Samples not in accordance with the biological collection terms</li> </ul>
<b>CRITERES DE JUGEMENT</b>	<p><b>Main criteria:</b></p> <p>Ability to measure the drug and its metabolites exposition in human blood cells.</p> <p><b>Secondary criteria:</b></p> <p>Ability of the developed popPK model to estimate the PK parameters and exposure indices to plasmatic and intracellular GCV and GCV-TP in the population.</p> <p>Ability of the popPK model to discriminate individual covariates explaining interpatient variability in the PK.</p>
<b>TAILLE D'ETUDE</b>	22 patients
<b>NOMBRE PREVU DE CENTRES</b>	1 (CHU Limoges)
<b>DUREE DE LA RECHERCHE</b>	<p>One year</p> <p>March 2014</p>
<b>ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES</b>	The answers to secondary objectives require a population pharmacokinetic analysis.

All the PK profiles (GCV in plasma and GCV, GCV-MP and GCV-TP in PBMC) obtained from the 22 renal transplant patients were analyzed using a non-parametric approach implemented in a recently released R-package called Pmetrics. The analysis was based on a four-compartment pharmacokinetic ODE model

The performances of the model were appreciated by studying its capability to estimate the individual AUC values of each GCV form. The goodness of fit was evaluated graphically. Accuracy of estimation of pharmacokinetic parameters will be directly obtained using this program.

During the same analysis, inter-individual variability (IIV) will be described using exponential models. The covariance of the parameters will be studied during the modelling process. Additive, proportional and combined (i.e., additive and proportional) error models will be tested to describe the residual variability. Accuracy of estimation of inter-individual variability and identification of covariates influencing their distributions will be performed at this stage.

The population parameters obtained during the model building step will be used as priors to compute the individual PK parameters in each of the patients using the Bayesian method.

Statistical analysis will be performed using R (version 3.1.0) (R foundation for statistical computing, <http://www.r-project.org>).

Statistical and POPPK analyses will be performed in the INSERM Unit (UMR-850) of the Pharmacology

	Department of the Limoges University Hospital.
<b>RETOMBEES ATTENDUES</b>	<p>Little is known about the intracellular pharmacokinetics of GCV in renal transplant patients.</p> <p>This study will describe for the first time the exposure to GCV and its metabolites following administration of standard doses. The obtained time-concentration curves will enrich the global knowledge of GCV pharmacodynamics providing new information such as the global time needed to get GCV-TP from GCV in human cells.</p> <p>Then, an accurate determination of GCV and its metabolites PKs in this population would be obtained by a non-parametric model. This model will also give the global exposure of metabolites (Area Under the Curve). For example it will enable to estimate the exposure of GCV-TP, the active form in each patient.</p> <p>This can help to know whether the dose of GCV has to be individualized in this population. If required, this study could lead to the development of PK tools for the dose adjustment of GCV.</p> <p>As the main issue of the treatment is blood toxicity, these PK tools could also help to minimize neutropenia events during the treatment by VGCV.</p> <p>Finally we should be able to develop a therapeutic drug monitoring strategy to adapt the dose in each patient to reduce the toxicity and improve the efficiency of the therapy.</p>
<b>RESUME</b>	L'infection par cytomégalovirus (CMV) chez le patient transplanté est un problème majeur du fait de l'augmentation très significative du risque de perte du

greffon. Le traitement antiviral le plus employé en prophylaxie et en curatif est le Ganciclovir (GCV). Celui-ci n'est pas anodin car il est hématotoxique et responsable de neutropénies survenant jusque dans 50% des cas. Il n'existe aujourd'hui qu'une méthode de dosage du GCV dans le plasma par HPLC-MS/MS or des études précédentes ont montré que la concentration plasmatique ne semble être liée ni à la toxicité ni à l'efficacité.

Nous savons également qu'un métabolite du GCV, le GCV triphosphate est la forme active du médicament, inhibant la réplication du virus. Cependant sa forme triphosphatée lui confère des charges négatives le piégeant alors ioniquement dans la cellule et créant donc une accumulation très différente de celle dans le plasma.

Dans ce contexte nous faisons l'hypothèse que ce soit l'accumulation du GCV et/ou de ses métabolites dans les cellules sanguines qui puisse être responsable de la toxicité hématologique du GCV.

Pour cela nous avons précédemment développé la première méthode de dosage du GCV et de ses métabolites intracellulaires.

L'étude que nous montons a deux objectifs :

**Objectif principal**

Mener la première étude pharmacocinétique du GCV et de ses métabolites dans les cellules sanguines de patients transplantés rénaux.

**Objectif secondaire:**

Etablir une étude de population pharmacocinétique, et plus précisément: développer un modèle



pharmacocinétique décrivant précisément l'évolution du GCV dans le plasma et du GCV et de ses métabolites dans les cellules sanguines, d'identifier les covariables expliquant les différences de profil entre les patients et enfin d'explorer les relations éventuelles entre chacune des formes du GCV entre elles et avec la survenue d'une toxicité.

Cette étude pharmacocinétique est monocentrique et basée sur une collection biologique (DC-2010-1074), enregistrée par le CPP de Limoges, le ministère de la Santé et l'ARS en respect de la réglementation en vigueur en France. La CNIL a autorisé l'étude sous la référence 1775949.

Les échantillons de sang nécessaires à cette étude sont prélevés avant administration du traitement par GCV et immunosuppresseurs puis à 1h, 2h, 3h et 5h après la prise matinale 3 mois après la transplantation. Les prélèvements pré administration, 1h et 3h coïncident avec les horaires de prélèvement dans le cadre du suivi thérapeutique pharmacologique des immunosuppresseurs. Les temps 2h et 5h ne sont en revanche prélevés que pour cette étude conformément au Code de la Santé Publique, article L1221-8-1.

Cette étude doit inclure 22 patients hospitalisés au service de Néphrologie, dialyse et transplantation du CHU de Limoges et ayant signé un consentement de participation à la collection biologique.

A terme elle devrait permettre de déterminer à quelle fréquence et dans quels cas le suivi thérapeutique du GCV doit être mis en place. De plus l'effet indésirable incontournable du traitement, à savoir la neutropénie, pourrait être prédit minimisant alors sa survenue et

	<p>facilitant la prise en charge du patient. Enfin nous pourrons développer un outil pharmacocinétique optimisant la dose de GCV selon le patient tout en garantissant l'efficacité du traitement et en réduisant sa toxicité.</p>
--	--

## Annexe 2. Avis rendu par le comité d'éthique

**CHU LIMOGES**

### **Comité d'Ethique**

Président : Docteur Gérard TERRIER

---

Avis 164-2015-01

**Etude ProGGress « Pharmacokinetics of Ganciclovir and Ganciclovir triphosphate in renal transplant patients »**, dont l'investigateur principal est Monsieur le Docteur P.A. BILLAT, service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance, CHU de Limoges.

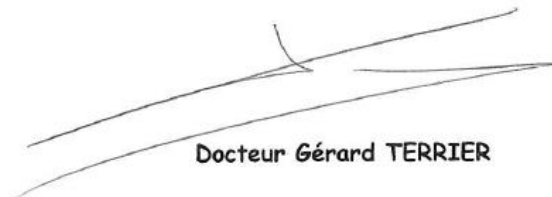
Monsieur le Docteur P.A. BILLAT, après avoir exposé les objectifs de cette étude, répond aux questions formulées par les membres du comité puis se retire.

Le Comité d'Ethique délibère et rend l'avis suivant à l'unanimité des membres présents :

Le Comité d'Ethique réuni le 12 mars 2015 n'émet aucune réserve éthique à l'étude intitulée :

**ProGGress « Pharmacokinetics of Ganciclovir and Ganciclovir triphosphate in renal transplant patients »** dont l'investigateur principal est Monsieur le Docteur P.A. BILLAT, service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance, CHU de Limoges.

Avis émis en Comité d'Ethique du 12 mars 2015 et enregistré sous le n°164-2015-01.



Docteur Gérard TERRIER

### Annexe 3. Paramètres du modèle final.

#Pri

Ka, 0.05,1

V2, 32

K20, 0.4,1.8

V3f, 37,42

K23,0.01,0.09

K32, 20,85

K34, 0.2,2.5

K40, 0.1,10

V4f, 12,25

V5f, 1,6

K45, 2,12

K54, 10,50

K50,0.1,6.5

Tlag1, 0,1

#Cov

C0E

C0I

C0M

C0T

C1Cr

#Lag

TLAG(1)=Tlag1

#Sec

C1=K20\*V2\*C1Cr/45.7

#Ini

X(2)= C0E\*V2

X(3)= C0I\*V3f

X(4)= C0M\*V4f

X(5)= C0T\*V5f

#Dif

XP(1) = -Ka\*X(1)

XP(2) = Ka\*X(1)-K20\*X(2)

XP(3) = K23\*X(2)-K32\*X(3)-K34\*X(3)

XP(4) = K34\*X(3)-K45\*X(4)+ K54\*X(5) -K40\*X(4)

XP(5) = K45\*X(4)-K50\*X(5)-K54\*X(5)

#Out

```
Y(1) = X(2) / V2  
Y(2) = X(3) / V3f  
Y(3) = X(4) / V4f  
Y(4) = X(5) / V5f
```

```
#Err
```

```
L=0
```

```
5,0.1,0,0
```

```
0.5,0.05,0,0
```

```
0.5,0.1,0,0
```

```
0.5,0.05,0,0
```

## **Annexe 4. Protocoles utilisés**

### **Annexe 4.1. Séquençage**

Cette procédure décrit le protocole à utiliser pour l'étude exploratoire d'une séquence d'ADN ou pour l'analyse de polymorphismes de type insertion/délétion.

La procédure repose sur l'amplification par PCR suivie de la purification des séquences obtenues puis à une réaction de séquençage type Sanger. Les produits de la réaction sont purifiés et analysés par un séquenceur de la plateforme du CHU de Limoges.

## **RECOMMANDATIONS PARTICULIERES**

### **1. Hygiène et sécurité**

Les ADN humains en vue de leur séquençage peuvent présenter un risque septique. Il est impératif de porter des gants et des lunettes de protection durant la manipulation de ces échantillons.

Le BET est un agent intercalant, il convient de prendre les dispositions de sécurité adaptées à la manipulation de cet agent (blouse spécifique, lunettes, gants).

### **2. Autres**

- Les étapes pré-PCR se déroulent au niveau de la salle centrale
- Une fois la PCR achevée, pour éviter tout risque de contamination, les manipulations se dérouleront en salle post-PCR.

## **MATERIEL & REACTIFS**

### **1 MATERIEL**

- MicroAmp Optical 8-tubes Strip<sup>®</sup> 0,2mL N°4316567
- MicroAmp Optical 8-cap Strip<sup>®</sup> 0,2mL N801-0535
- Hotte à flux laminaire (Holten LaminAir Thermo<sup>®</sup> ; 54250128)
- Thermocycleur (Thermalcycler 2720 Applied Biosystem<sup>®</sup> ; 4359659)
- Centrifugeuse réfrigérée
- Congélateur à -20°C
- Cryo-tubes 1mL ou tubes à bouchons vissés 1,5 mL
- Gants et lunettes de protection

### **2 REACTIFS**

#### **2.1 Kits de réactifs**

- Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (Invitrogen<sup>®</sup> ; Réf. 10966-034)

- BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Qiagen<sup>®</sup> ; Réf. 4336776)
- QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Qiagen<sup>®</sup> ; 28106)
- DyeEx 2.0<sup>®</sup> Spin Kit (Qiagen<sup>®</sup> ; 63206)

## 2.2 Autres réactifs

- Eau de qualité biologie moléculaire
- 10 mM dNTP mix (Invitrogen<sup>®</sup> ; Réf. 18427-013)
- Tampon tris-acétate-EDTA (TAE) prêt à l'emploi à 50X
- Marqueur de taille (GeneRuler<sup>®</sup> DNA ladder ou équivalent)
- Bleu de dépôt
- Solution de bromure d'éthidium (BET) 10mg/mL (Sigma E1510 ou équivalent)
- Formamide désionisé (Sigma-Aldrich ; F9037-100mL ou équivalent)
- Amorces (Cf. Protocole de conception des amorces)
- ADN (Cf. Protocole d'extraction de l'ADN)
- Agarose

## MODUS OPERANTI

### 1 PCR d'amplification

#### 1.1 Pré-mix

- Le pré-mix est réalisé en salle centrale du laboratoire Inserm UMR S-850 sous un poste de sécurité microbiologique du fait du risque important de contamination des échantillons.
- Déterminer le nombre d'échantillons à séquencer et calculer le volume de pré-mix à préparer, majoré de 10%, en procédant au mélange suivant :

Réactif	Volume par réaction
10x PCR Buffer	5 µL
10 mM dNTP	1 µL
50 mM MgSO <sub>4</sub>	1,5 µL
Platinum Taq DNA Polymerase	0,2 µL

- Si l'amplification est particulièrement délicate il convient de rajouter 5µL de 10X PCRx Enhancer Sol'n et de compléter avec 34,3 µL d'eau de qualité biologie moléculaire par échantillon. Dans les autres cas on complète avec 39,3 µL d'eau par échantillon.
- Distribuer les amorces correspondantes dans les proportions suivantes dans des microtubes pour PCR de 0,2mL.

Réactif	Volume par réaction
Pré-mix	47 $\mu$ L
Amorce sens (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
Amorce antisens (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L

- Ajouter 1 $\mu$ L d'ADN à la concentration requise dans les tubes adéquats. Pour les « Blancs » ajouter 1 $\mu$ L d'eau de qualité biologie moléculaire

### 1.2 Thermocyclage

- Incuber les tubes au thermocycleur à 95°C pendant 2 minutes pour dénaturer l'ADN.
- Procéder au thermocyclage (30-40 cycles) selon le schéma suivant :
  - 95°C pendant 30secondes
  - 55°C – 60 °C pendant 30 secondes
  - 68°C pendant 1 minute par kilobase
- Conserver les échantillons à 4°C

### 1.3 Contrôle de la PCR sur gel d'agarose

- Diluer le TAE en quantité suffisante à 1X.
- Dans un bécher ou erlenmeyer, peser la quantité d'agarose nécessaire et ajouter le volume de TAE requis:

Taille des fragments à séparer (kb)	% agarose	Quantité pour 20 mL (petit gel)	Quantité pour 40 mL (grand gel)
0,1 à 0,2	2%	0,4 g	0,8 g
0,2 à 0,3	1,5%	0,3 g	0,6 g
0,4 à 0,6	1,25%	0,25 g	0,5 g
0,5 à 1	1%	0,2 g	0,4 g
0,8 à 1,2	0,75%	0,15 g	0,3 g

- La suite de cette étape se déroule dans la salle laverie sur la pailasse « BET ».
- Chauffer le mélange au micro-onde jusqu'à dissolution complète et laisser refroidir une minute.
- Ajouter 0,5 $\mu$ L de BET pour 20mL de gel.
- Couler le gel dans une cuve munie d'un peigne adapté et laisser prendre pendant environ 15 minutes.
- Placer le gel dans la cuve de migration et ajuster le niveau de TAE.



- Déposer dans chaque puits : 10µL d'échantillon (ou 2µL de marqueur de taille) mélangé à 2µL de bleu de dépôt.
- Faire migrer à 100V jusqu'à progression optimale du front de migration.
- Révélation sur G-BOX.

## 2 Contrôle de la PCR sur gel d'agarose

Utiliser le kit de purification QIAquick PCR purification kit.

- Ajouter 5 volumes de tampon « PB » à un volume de produit de PCR et mélanger.
- Placer la colonne QIAquick sur un tube de collection de 2mL fourni.
- Déposer l'échantillon sur la colonne QIAquick et centrifuger 60 secondes à 17 900 g. Jeter l'éluat et replacer la colonne sur le même tube.
- Déposer 0,75mL de tampon « PE » sur la colonne QIAquick et centrifuger 60 secondes à 17 900 g. Jeter l'éluat et replacer la colonne sur le même tube.
- Centrifuger la colonne pendant 2 minutes à 17 900 g.
- Placer la colonne sur un microtube de 1,5 mL.
- Déposer 50µL de tampon « EB » au centre de la colonne, attendre 1 minute puis centrifuger 1 minute à 17 900 g.

## 3 Réaction de séquençage

- Etape réalisée dans la salle post-PCR de l'unité, paillasse post-PCR.
- Préparer le mélange en utilisant les volumes suivants :

Réactif	Séquence
BigDye	4µL
Amorce sens <u>OU</u> antisens (2,5 µM)	2 µL
ADN purifié	4 µL
Eau qualité BM	10 µL

- Procéder au séquençage en utilisant le programme suivant pour 25 cycles :

Température	Temps
94°C	3 minutes
94°C	10 secondes
50°C	5 secondes
60°C	4 minutes
60°C	1 minute
10°C	Infini

#### **4 Purification des produits de séquençage**

- Etape réalisée en salle post-PCR
- On utilise le kit DyeEx Spin Kit :
  - Remettre en suspension le gel des colonnes
  - Ouvrir les bouchons des colonnes d'un quart de tour et casser l'extrémité inférieure
  - Déposer les colonnes sur les tubes collecteurs fournis de 2mL
  - Centrifuger 3 minutes à 750 g
  - Placer les colonnes sur des tubes de 1,5 mL
  - Déposer les réactions de séquence sur le plan incliné du gel, sans le toucher
  - Disposer les colonnes, partie haute du gel côté extérieur
  - Centrifuger 3 minutes à 750 g
  - Transférer les ADN dans une plaque de séquençage
  - Remplir les puits vide avec 20 µL de formamide sous la hotte, boucher les puits
  - Dénaturer les échantillons au thermocycleur à 95°C pendant 5 minutes
  - Mettre la plaque dans la glace pendant au moins 5 minutes.

#### **5 Electrophorèse de séquençage**

- Effectuée à la plateforme de séquençage du CHU
- Les plaques sont déposées dans le réfrigérateur de la plateforme (étage « plaques à passer »)
- L'analyse des échantillons est effectuée par le personnel de la plateforme, les résultats sont à récupérer sur place.

#### **Annexe 4.2. Conception des amorces**

Cette procédure définit le mode opératoire à utiliser pour le design de primers et de sondes pour séquençage, essai Taqman<sup>®</sup> ou HRM.

#### **RECOMMANDATIONS PARTICULIERES**

##### **Hygiène et sécurité**

Les sondes sont très sensibles aux contaminations et aux cycles de congélation et décongélation. Il est impératif de porter des gants et des lunettes de protection durant la manipulation de ces échantillons et de limiter les congélations.

## **MATERIEL**

Ordinateur connecté à internet

Congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$

Réfrigérateur

Gants et lunettes de protection

## **METHODOLOGIE GENERALE**

- Rechercher des séquences de primer et de sonde à l'aide d'un logiciel.
- Vérifier la spécificité des amorces et de la sonde.
- Vérifier l'absence de structures secondaires gênantes.

### **1 Recherche des séquences**

- Identification du gène ou de la séquence à étudier.
- Identification du polymorphisme à étudier.
- Choix de la stratégie : Taqman<sup>®</sup>, HRM ou séquençage.
- Recherche des informations sur le gène :
- NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> rubrique « gene ». Penser à vérifier le genre et l'espèce.
- En bas de la page cliquer sur l'ADN de référence (RefSeqGene): NC\_XXXXXXX FASTA. NM correspond à la séquence d'ARN et NP à la protéine.
- Télécharger la séquence d'ADN, retirer les sauts de paragraphe.

### **2. Recherche du polymorphisme**

- NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> rubrique « SNP », entrer l'identifiant rs.
- Copier la séquence recherchée
- GenView (bouton violet) permet de visualiser les SNP environnants.
- Surligner le polymorphisme dans le fichier texte (recherche de la séquence obtenue sur NCBI).
- Masquer les polymorphismes voisins dans un intervalle d'environ 600 bases par la lettre N.
- Masquer les séquences répétées à l'aide du logiciel Repeat masker (<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>), télécharger la séquence masquée

### **3. Design des primers**

- Visiter le site Primer 3 plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) ou un logiciel équivalent.

- Coller la séquence obtenue précédemment, ajuster la taille de la séquence à conserver entre crochets selon la méthode d'analyse souhaitée.
- Cliquer sur pick primers, prendre le couple d'amorces ayant des propriétés proches, leur Tm doit être plus bas que le Tm de la séquence d'environ 10°. Eviter les séquences débutant par G (effet quencher). La composition en GC doit-être comprise entre 40-60%.
- Vérifier s'il n'existe pas d'hybridation croisée avec d'autres séquences à l'aide de Blast ([http:// blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)), onglet « Human », coller. Comparer le score (élevé) et la valeur de E (le plus faible possible) pour la séquence étudiée par rapport aux autres séquences.
- Il est possible de vérifier les auto-hybridations des amorces sur des logiciels payants.

#### **4. Commande des amorces**

- Les oligos pour PCR ou HRM sont commandés chez Eurofins®.
- Pour Taqman® s'enregistrer sur <http://www.appliedbiosystems.com> choisir l'option TaqMan® SNP Genotyping & Copy Number Assays puis TaqMan® SNP Genotyping & Copy Number Assays. Choisir Custom TaqMan® Assay Design Tool et suivre les instructions, mettre dans sample name l'identifiant rs.

#### **Annexe 4.3. Préparation des PBMC humains**

- Mettre à température ambiante le PBS et le Ficoll.
- Déposer 5 mL de Ficoll puis le sang délicatement en évitant tout mélange.
- Centrifuger 20 minutes à température ambiante à 1600rpm sans frein.
- Congeler le sérum.
- Recueillir l'anneau de PBMC.
- Laver les cellules dans le PBS 2 fois en culotant les cellules à chaque centrifugation.
- Resuspendre les cellules dans 1mL de PBS.
- Compter les cellules et les congeler/lyser.

## **Relations exposition-toxicité et pharmacogénétique du ganciclovir chez le patient transplanté**

---

Les infections par cytomégalovirus sont un problème majeur en transplantation rénale du fait de l'augmentation du risque de perte de greffon et de l'augmentation de la morbi-mortalité des patients. Toutefois la mise en place d'un traitement prophylactique par ganciclovir a significativement fait diminuer l'incidence de ces infections. Cette efficacité est toutefois limitée par une importante hématotoxicité notamment des neutropénies. La survenue de cet évènement indésirable conduit à une réduction des doses voire à un arrêt du traitement, favorisant ainsi l'émergence de résistances virales. Ces résistances sont un problème grandissant chez les personnes transplantées du fait du manque de protocole de prise en charge de celles-ci. Dans ce contexte notre objectif était de mieux comprendre la survenue et le mécanisme de cette toxicité. Dans un premier temps nous avons étudié le métabolisme intracellulaire du ganciclovir chez des patients. Nous avons remarqué qu'il y a une forte corrélation entre l'exposition à la forme active du ganciclovir et la diminution du nombre de neutrophiles au 3<sup>ème</sup> mois de traitement. Nous avons par la suite étudié l'impact de variations génétiques sur des transporteurs. Nous avons remarqué qu'un polymorphisme était fortement associé à une diminution du nombre de neutrophiles et qu'il entraînait également une augmentation de la concentration intracellulaire de ganciclovir à l'aide d'un modèle in vitro. Cette thèse fournit de nouveaux outils d'exploration du métabolisme et de l'accumulation intracellulaire du ganciclovir qui pourraient être utiles pour la prévention de la survenue de neutropénies sous ganciclovir.

---

Mots-clés : Ganciclovir, Neutropénie, pharmacogénétique, pharmacocinétique

## **Exposure-toxicity relationships and pharmacogenetics of ganciclovir in transplant patients**

---

Cytomegalovirus infection is a major issue in transplant patients as it affects the graft survival and contributes to patients' morbi-mortality. The implementation of ganciclovir prophylaxis has significantly decreased its incidence, however GCV frequently induces neutropenia. This adverse effect leads to a decrease in the ganciclovir dose or to a discontinuation of the therapy, thereby favoring viral resistance. Resistance to ganciclovir is a growing problem in solid organ transplantation because of the lack of proper data to support treatment decisions when it is encountered. In this context we aim at better understanding the factors involved in this toxicity. First we explored the intracellular metabolism of ganciclovir in patients' white blood cells. We found that the active form of ganciclovir is associated with neutrophil toxicity at month 3 of treatment. Then we explored the effect of targeted polymorphisms among transporter genes in two cohorts of renal transplant patients. We found that a single nucleotide polymorphism is strongly associated with a decrease in the neutrophil count and in ganciclovir intracellular accumulation. This thesis provides relevant tools for a deeper exploration of ganciclovir intracellular metabolism and accumulation which might be useful for the prevention of ganciclovir induced neutropenia.

---

Keywords: Ganciclovir, Neutropenia, pharmacogenetics, pharmacokinetics