



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY 1

2008

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT »

Laboratoire EA 3452

THESE

Pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI-POINCARÉ-NANCY 1

Par Audrey JANOLY-DUMENIL

Née le 19 mars 1976 à LYON 09

**OPTIMISATION DES MODALITES THERAPEUTIQUES DE
L'INFECTION
A CMV EN POST-TRANSPLANTATION DE MOELLE OSSEUSE
PEDIATRIQUE
PAR L'ETUDE *IN VITRO* DES RELATIONS PK/PD
DE L'EFFICACITE ANTIVIRALE ET DE LA TOXICITE CELLULAIRE
DU GANCICLOVIR.**

Soutenue le 13 novembre 2008

MEMBRES DU JURY

Madame le Docteur N. BLEYZAC (directeur de thèse)

Madame le Professeur M.C. SAUX (rapporteur)

Madame le Docteur M.T. ZABOT (examinateur)

Monsieur le Professeur G. AULAGNER (examinateur)

Monsieur le Professeur M. BRAZIER (rapporteur)

Monsieur le Professeur J GUITTON (examinateur)

Monsieur le Professeur C. VIGNERON (président du jury)

Madame le Docteur BLEYZAC

Nous vous remercions d'être à l'origine de ce travail. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité et votre soutien. En espérant pouvoir continuer à travailler avec vous.

Madame le Professeur SAUX

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de notre reconnaissance.

Madame le Docteur ZABOT

Nous vous remercions de nous avoir accueillis dans votre laboratoire de Biotechnologies Cellulaires et de nous avoir encadrés tout au long de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur AULAGNER

Nous vous remercions sincèrement pour vos conseils, vos encouragements et votre soutien depuis quelques années déjà. Nous vous remercions aussi pour votre aide tout au long de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur BRAZIER

Vous avez accepté de lire et juger ce travail. Recevez ici l'expression de notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur GUITTON

Nous vous remercions pour votre implication dans ce travail. Merci de nous avoir accueillis dans votre laboratoire de Pharmacologie. Veuillez trouver ici le témoignage de notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur VIGNERON

Nous vous adressons tous nos remerciements pour votre présence parmi les membres de ce jury.

Merci à toute l'équipe du laboratoire de Biotechnologies Cellulaires du Dr Zabet (Groupement Hospitalier Est) : en particulier à Isabelle Rouvet qui a largement participé à la réalisation de l'ensemble des études expérimentales aux cultures cellulaires. Un grand merci pour ton implication dans ce travail, ton encadrement, ton aide précieuse et ta gentillesse. Merci aussi aux techniciennes de laboratoire.

Merci à toute l'équipe du laboratoire de Virologie du Professeur Lina (Groupement Hospitalier Est) : Nicolas Levêque, Florence Morfin, Geneviève Billaud, Emilie Frobert... Merci aux techniciens pour leur aide précieuse, et particulièrement à Lucile qui a largement participé à la production du virus et à son analyse. Merci pour ton aide, ton implication et ta disponibilité tout au long de ce travail.

Merci à toute l'équipe du laboratoire de Pharmacologie (Biochimie, CHLS) : particulièrement à Jérôme et Sabine pour leur aide et conseils précieux en matière de spectrométrie de masse. Merci aussi aux techniciens de laboratoire et en particulier Bruno.

Merci à l'équipe médicale d'onco-hématologie pédiatrique du Pr Y Bertrand qui est à l'origine de ce travail.

Merci à Nathalie, quelle chance de t'avoir rencontrée dès ma première année d'internat. En espérant pouvoir continuer à travailler sur d'autres projets avec toi.

Merci à Mme Plauchu pour votre confiance, vos encouragements et votre soutien infaillibles depuis 3 ans.

Merci à Mme Stamm pour vos encouragements.

Merci à Vincent pour ton amour, ton soutien et ta patience

Merci à notre petite Margot

Merci à mes parents et ma famille

Merci à ma sœur Estèle

Merci à Isa et Julien

Merci à tous mes amis

**OPTIMISATION DES MODALITES THERAPEUTIQUES DE L'INFECTION
A CMV EN POST-TRANSPLANTATION DE MOELLE OSSEUSE PEDIATRIQUE
PAR L'ETUDE DES RELATIONS PK/PD
DE L'EFFICACITE ANTIVIRALE ET DE LA TOXICITE CELLULAIRE
DU GANCICLOVIR**

1. Introduction – objectifs	23
2. Analyse bibliographique	25
2.1. Cytomégalo­virus	25
2.1.1. Caractéristiques structurales du virus	25
2.1.2. Epidémiologie et pouvoir pathogène	26
2.1.3. Manifestations cliniques de l'infection	28
2.1.3.1. Infection du nouveau né	28
2.1.3.2. Sujet immunocompétent.....	29
2.1.3.3. Sujet immunodéprimé	30
2.1.3.4. Patient VIH positif.....	30
2.1.3.5. Transplantation	31
2.1.3.5.1. Organe solide	31
2.1.3.5.2. Moelle osseuse.....	32
2.1.4. Diagnostic au laboratoire.....	33
2.1.4.1. Diagnostic direct.....	33
2.1.4.1.1. Détection du virus dans le sang	33
2.1.4.1.2. Détection des antigènes et du génome.....	33
2.1.4.2. Diagnostic indirect.....	36
2.1.4.3. Interprétation des tests.....	36
2.1.5. Facteurs de risque associés à la maladie en post transplantation de moelle osseuse 37	
2.1.5.1. Statut sérologique Receveur /Donneur.....	37
2.1.5.2. Donneur non apparenté.....	37
2.1.5.3. Antigénémie et ADN viral	37
2.1.5.4. GvHD aigue.....	38
2.1.5.5. GvHD chronique.....	38
2.1.5.6. Traitements antiviraux prolongés au-delà de 100 jours	38
2.1.5.7. Immunodépression prolongée	38
2.1.5.8. Greffe déplétée en cellules T.....	38
2.1.5.9. Age des patients	39
2.1.5.10. Traitement prophylactique (de la GVHD) par ciclosporine, corticoïdes ou sérum anti-lymphocytaire.....	39
2.1.5.11. Vitesse de décroissance de la charge virale après initiation du traitement	39
2.1.5.12. HHV6 (Human herpes virus 6).....	39
2.1.6. Toxicité du CMV sur les cellules sanguines.....	39

2.1.6.1.	Etudes in vitro	39
2.1.6.2.	Etudes in vivo	40
2.2.	Ganciclovir	42
2.2.1.	Généralités.....	42
2.2.2.	Dénomination et Structure chimique	42
2.2.3.	Propriétés pharmacodynamiques.....	42
2.2.3.1.	Mécanisme d'action.....	42
2.2.3.2.	Activité antivirale	44
2.2.3.3.	Résistances au GCV	44
2.2.4.	Propriétés pharmacocinétiques (chez l'adulte).....	46
2.2.4.1.	Absorption et distribution.....	46
2.2.4.2.	Elimination.....	46
2.2.5.	Utilisation en thérapeutique.....	47
2.2.5.1.	Formes pharmaceutiques, posologies et indications dans le cadre de l'Autorisation de Mise sur le Marché (Vidal 2008)	47
2.2.5.2.	Traitement prophylactique, préemptif et curatif	50
2.2.5.3.	Posologie, voie d'administration et durée de traitement par GCV en pratique 50	
2.2.6.	Contre indications au traitement dans le cadre de l'Autorisation de Mise sur le Marché (Vidal 2008).....	51
2.2.7.	Utilisation chez l'enfant de moins de 12 ans dans le cadre de l'Autorisation de Mise sur le Marché (Vidal 2008).....	51
2.2.7.1.	Cymevan®	51
2.2.7.2.	Rovalcyte®	51
2.2.8.	Effets indésirables principaux.....	52
2.2.8.1.	Toxicité hématologique	52
2.2.8.2.	Autres effets indésirables	52
2.2.9.	Efficacité antivirale	53
2.2.9.1.	Etudes in vitro	53
2.2.9.2.	Etudes cliniques	57
2.2.9.2.1.	Transplantation de moelle osseuse adulte.....	57
2.2.9.2.2.	Transplantation d'organes solides chez l'adulte.....	60
2.2.9.2.3.	En Pédiatrie	62
2.2.10.	Toxicité cellulaire.....	63
2.2.10.1.	Etudes in vitro	63
2.2.10.1.1.	Cellules adhérentes non infectées	63

2.2.10.1.2.	Cellules hématologiques non infectées.....	64
2.2.10.1.3.	Cellules infectées ou transfectées par HSV-TK (thérapie antitumorale)	67
2.2.10.1.4.	Une explication possible de la toxicité du GCV : modalités de la perméabilité et des transports membranaires.....	72
2.2.10.2.	Manifestations clinique de la toxicité : Etudes in vivo.....	73
2.2.11.	Mesure des concentrations du GCV et de ses métabolites phosphorylés dans les milieux biologiques	77
2.2.11.1.	GCV	77
2.2.11.1.1.	Méthodes de séparation et de détection	77
2.2.11.1.2.	Durée d'analyse et sensibilité des méthodes	78
2.2.11.2.	Nucléotides endogènes et analogues nucléotidiques (métabolites phosphorylés des antirétroviraux) intracellulaires	83
2.2.11.2.1.	Préparation et conservation des cellules.....	83
2.2.11.2.2.	Nombre de cellules nécessaire au dosage.....	86
2.2.11.2.3.	Traitement de l'échantillon, séparation et détection (tableau XIV).....	88
2.2.11.3.	Métabolites mono, di et triphosphorylés du GCV.....	95
2.2.11.4.	Contraintes liées au milieu de dosage (cellules) et à la détection d'analogues nucléotidiques.....	102
2.2.11.5.	Contraintes liées à la quantification des dérivés nucléotidiques du GCV en l'absence de standards.....	102
2.2.11.6.	Intérêt de la détection par spectrométrie de masse.....	102
2.2.12.	Etudes pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du GCV.....	103
2.2.12.1.	Etudes in vitro	103
2.2.12.1.1.	Métabolisme des dérivés phosphorylés	103
2.2.12.1.2.	Inhibition compétitive de l'ADN polymérase virale	106
2.2.12.1.3.	Effet sur la synthèse d'ADN	108
2.2.12.1.4.	Effet sur la charge virale : CI 50% et relation durée d'exposition/charge virale	108
2.2.12.1.5.	Effet sur la toxicité cellulaire : comptage du nombre de cellules vivantes	110
2.2.12.2.	Etudes pharmacocinétiques et pharmacodynamiques cliniques.....	112
2.2.12.2.1.	Méthodes de détermination des paramètres pharmacocinétiques	112
2.2.12.2.2.	Pharmacocinétique clinique en transplantation d'organe solide chez l'enfant	113

2.2.12.2.3.	Pharmacocinétique clinique en transplantation de moelle osseuse pédiatrique	113
2.2.12.2.4.	Pharmacocinétique clinique chez le nouveau-né (Infection congénitale)	113
2.2.12.2.5.	Modèle PD et modèles PK-PD	117
2.2.13.	Suivi thérapeutique du traitement par GCV	119
2.2.13.1.	Contrôle des charges virales	119
2.2.13.2.	Suivi de la réponse cellulaire T CMV spécifique	120
2.2.13.3.	Adaptation des posologies à partir de la mesure des concentrations plasmatiques de GCV	120
2.2.13.3.1.	Les méthodes d'adaptation des posologies	121
2.2.13.3.2.	Suivi thérapeutique controversé en transplantation adulte	122
2.2.13.3.3.	Suivi thérapeutique controversé en pédiatrie	123
2.2.13.3.4.	Intérêt du suivi thérapeutique en pédiatrie: 2 Cas rapportés	123
2.3.	Lignée lymphoblastoïde	126
2.3.1.	Historique	126
2.3.2.	Lymphocytes B, cible de l'EBV	127
2.3.3.	Virus Epstein-Barr ou EBV	127
2.3.4.	Méthode d'obtention des lignées lymphoblastoïdes	128
2.3.5.	Propriétés des cellules transformées	128
2.3.6.	Caractéristiques et avantage de ce modèle cellulaire de culture	129
2.3.7.	Infection des cellules lymphoblastoïdes par le CMV	129
2.3.8.	Effet de l'EBV sur l'activation du GCV en GCVTP	130
3.	Travaux expérimentaux	131
3.1.	Objectifs de l'étude	131
3.2.	Matériel	132
3.2.1.	Virologie	132
3.2.1.1.	Souche de virus CMV AD169	132
3.2.1.2.	Cellules MRC5	132
3.2.1.3.	Milieu de culture	132
3.2.1.4.	Réactifs pour trypsination des cellules	132
3.2.1.5.	Extraction et préparation de l'ADN pour quantification PCR	132
3.2.1.6.	Appareil de mesure de la charge virale (PCR)	133
3.2.2.	Biotechnologies cellulaires : culture des cellules lymphoblastoïdes	134
3.2.2.1.	Cellules lymphoblastoïdes	134
3.2.2.2.	Milieu de culture	134

3.2.2.3.	Ganciclovir	134
3.2.2.4.	Compteur de cellules Beckman Coulter Z2	134
3.2.2.5.	Compteur automatique et analyse de la viabilité cellulaire : ADAM (Advanced Detection Accurate Measurement), Labtech – France)	135
3.2.2.5.1.		136
3.2.2.6.	Microscope optique	137
3.2.2.7.	Appareillage HPLC couplé détecteur UV pour étude de stabilité des concentrations de GCV extracellulaires dans le temps	137
3.2.3.	Dosage analytique des dérivés phosphorylés intracellulaire du GCV	137
3.2.3.1.	Molécules, standards et étalons internes.....	137
3.2.3.2.	Solvants et réactifs	137
3.2.3.3.	Extraction phase solide (SPE) et évaporation de l'éluat	138
3.2.3.4.	HPLC	138
3.2.3.5.	Spectromètre de masse	140
3.2.4.	Analyse statistique des données	140
3.3.	Méthodes	141
3.3.1.	Virologie et cultures cellulaires	141
3.3.1.1.	Préparation d'une souche CMV AD169 passage 28 de référence.....	141
3.3.1.2.	Production d'une souche AD169 et détermination de la charge virale par PCR (à partir de la souche AD169 passage 28)	142
3.3.1.3.	Préparation de la lignée de cellules lymphoblastoïdes	146
3.3.1.3.1.	Isolement des lymphocytes et cryopréservation.....	146
3.3.1.3.2.	Production du virus Epstein Barr (EBV)	146
3.3.1.3.3.	Immortalisation des lymphocytes	146
3.3.1.3.4.	Caractérisation des cellules immortalisées par l'EBV.....	146
3.3.1.3.5.	Culture des lignées lymphoblastoïdes.....	146
3.3.1.4.	Choix des modalités d'incubation avec le GCV	147
3.3.1.4.1.	Concentrations testées	147
3.3.1.4.2.	Durées d'incubation	147
3.3.1.4.3.	Stabilité des concentrations du milieu extracellulaire dans le temps ...	147
3.3.1.5.	Préparation du lysat cellulaire en vue du dosage intracellulaire en dérivés phosphorylés du GCV.....	148
3.3.1.5.1.	Nombre de cellules nécessaires	148
3.3.1.5.2.	Préparation de l'extrait cellulaire et conservation jusqu'à l'analyse	149
3.3.1.6.	Choix de la dose infectieuse en CMV et de la durée entre l'infection et l'exposition des cellules infectées au GCV.....	149

3.3.1.6.1.	Infection des cellules pendant 14 jours (sans exposition au GCV: ESSAI a	149
3.3.1.6.2.	Infection des cellules (2 heures de contact) suivi d'un traitement par GCV : ESSAI b.....	151
3.3.1.7.	Essais préliminaires de toxicité.....	153
3.3.1.7.1.	Etude de toxicité du GCV SEUL : Essai A	153
3.3.1.7.2.	Etude de toxicité du GCV seul : ESSAI B	155
3.3.1.8.	Essais préliminaires d'efficacité : ESSAI C.....	157
3.3.1.9.	Essais finaux de toxicité et d'efficacité : ESSAI E.....	161
3.3.1.9.1.	Objectifs	161
3.3.1.9.2.	Méthodes.....	161
3.3.2.	Mise au point du dosage intracellulaire des dérivés phosphorylés du ganciclovir	166
3.3.2.1.	Molécules d'intérêt à doser.....	166
3.3.2.2.	Extraction et conservation des cellules (jusqu'à l'analyse par HPLC/MS)	166
3.3.2.3.	Dosage indirect des formes phosphorylés du GCV	167
3.3.2.3.1.	Préparation de l'échantillon.....	168
3.3.2.3.2.	Optimisation de la séparation.....	169
3.3.2.3.3.	Optimisation de la détection.....	170
3.3.2.3.4.	Principaux essais réalisés.....	171
3.3.2.4.	Dosage direct des dérivés mono, di et triphosphate du GCV	182
3.3.2.4.1.	Molécules d'intérêt à doser	182
3.3.2.4.2.	Optimisation du nombre de cellules à analyser.....	182
3.3.2.4.3.	Choix des étalons internes.....	182
3.3.2.4.4.	Paramètres de séparation (HPLC).....	182
3.3.2.4.5.	Paramètres de détection (spectrométrie de masse).....	184
3.3.2.4.6.	Modalités d'extraction SPE (colonne Oasis HLB WAX®) et de concentration de l'échantillon	188
3.3.2.4.7.	Essais réalisés.....	189
3.4.	Résultats et Discussion	198
3.4.1.	Etude de la stabilité des concentrations en GCV dans le milieu de culture cellulaire	198
3.4.1.1.	Stabilité des concentrations sur 24 heures.....	198
3.4.1.2.	Stabilité des concentrations sur 14 jours (336 heures)	199
3.4.2.	Titration du CMV AD169 (P30) : dose infectieuse avant infection des cellules lymphoblastoïdes	200

3.4.3.	Dose infectieuse et durée de l'infection avant traitement par GCV.....	200
3.4.3.1.	Essai préliminaire pour définir la dose infectieuse optimale: Infection des cellules pendant 14 jours et sans exposition au GCV (ESSAI a)	200
3.4.3.2.	Essai préliminaire pour définir la dose infectieuse optimale : Infection des cellules (2 heures de contact) suivi d'un traitement par GCV : ESSAI b	202
3.4.4.	Essais préliminaires de toxicité	203
3.4.4.1.	Etude de toxicité du GCV seul : Essai A.....	203
3.4.4.2.	Etude de toxicité du GCV seul : Essai B.....	208
3.4.4.2.1.	Numérations cellulaires par compteur COULTER (cellules totales)	208
3.4.4.2.2.	Numération cellulaire par compteur ADAM (cellules totales et cellules vivantes) 211	
3.4.5.	Essais préliminaires d'efficacité : Essai C	220
3.4.5.1.	Numérations cellulaires (compteur COULTER)	220
3.4.5.2.	Evolution de la charge virale.....	221
3.4.6.	Essais finaux de toxicité et d'efficacité : Essai D	224
3.4.6.1.	Toxicité sur cellules lymphoblastoïdes non infectées.....	224
3.4.6.1.1.	Numération cellulaire par compteur COULTER	224
3.4.6.1.2.	Numération cellulaire et viabilité par compteur ADAM.....	230
3.4.6.1.3.	Examen microscopique des cellules	233
3.4.6.2.	Toxicité et efficacité sur cellules infectées.....	242
3.4.6.2.1.	Numération cellulaire par compteur COULTER	242
3.4.6.2.2.	Numération cellulaire et viabilité par compteur ADAM.....	246
3.4.6.2.3.	Charge virale	249
3.4.6.2.4.	Examen microscopique des cellules	251
3.4.6.3.	Conclusion	261
3.4.7.	Détermination du GCV triphosphate intracellulaire par HPLC MS	262
3.4.7.1.	Méthode de détection indirecte.....	262
3.4.7.1.1.	ESSAI 1 : Comparaison des colonnes de chromatographie pour la séparation des molécules GCVACV	262
3.4.7.1.2.	ESSAI 2 : Détection des dérivés phosphorylés par action de la phosphatase alcaline.....	264
3.4.7.1.3.	Influence de la température sur la répétabilité ESSAI 3.....	267
3.4.7.1.4.	ESSAI 4 Influence de la colonne ATLANTIS Hilic sur la qualité de la séparation et la sensibilité et comparaison des résultats avec ceux obtenus avec la colonne ATLANTIS dC 18	270
3.4.7.1.5.	Conclusions sur les essais par méthode indirecte	275

3.4.7.2.	Méthode de détection directe	275
3.4.7.2.1.	ESSAI 1	275
3.4.7.2.2.	ESSAIS 2 et 3.....	275
3.4.7.2.3.	ESSAI 4 : Détection des nucléotides marqués, nucléotides endogènes non marqués et GCV sur des culots cellulaires (non exposés au GCV) chargés...	283
3.4.7.2.4.	Conclusion sur les essais par méthode directe	289
3.4.7.2.5.	Perspectives	291
4.	Conclusions générales et Perspectives	292
5.	Bibliographie	294
6.	Annexes et Publications.....	320

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Classification des Herpes virus Humains.....	26
Figure 2 : Caractéristiques structurales du Cytomégalovirus.....	26
Figure 3 : Dissémination de l'infection par voie hématogène.....	28
Figure 4 : Manifestations cliniques dans le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). 31	
Figure 5 : Principe de la méthode PCR (polymerase chain reaction).....	35
Figure 6 : Structure chimique du Ganciclovir.....	42
Figure 7 : Phosphorylation intracellulaire du GCV en GCVTP et mécanisme d'action.....	43
Figure 8 : Principaux sites géniques de mutation du Cytomégalovirus.....	45
Figure 9 : Ganciclovir (GCV), Aciclovir (ACV) et aracytine (ARAT) : Concentrations intracellulaires des dérivés triphosphatés versus concentrations extracellulaires (Rubsam <i>et al.</i> , 1998).	103
Figure 10 : GCV Profil des concentrations intracellulaires en dérivés phosphatés en fonction de la durée d'incubation en ganciclovir- cellules transfectées (rétrovirus) exprimant le gène de la thymidine kinase de l'HSV (Rubsam <i>et al.</i> , 1998).	105
Figure 11 : Ganciclovir (BWB7559U) et aciclovir (ACV) : Profil des concentrations intracellulaires en dérivés phosphatés en fonction de la durée d'exposition au BWB7559U ou ACV - cellules infectées par le CMV (Biron <i>et al.</i> , 1985).	105
Figure 12 : Décroissance des concentration intracellulaires en ganciclovir triphosphate (GCVTP) après arrêt de l'exposition au ganciclovir (GCV) (Rubsam <i>et al.</i> , 1998).	106
Figure 13 : Représentation de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive du ganciclovir triphosphate (BWB7559U triphosphate) sur l'ADN polymérase (St Clair <i>et al.</i> , 1984)	107
Figure 14 : Relation entre la diminution de l'incorporation de la thymidine et la concentration extracellulaire en ganciclovir (Rubsam <i>et al.</i> , 1998).	108
Figure 15 : Courbe concentration-réponse de l'aciclovir (ACV) et du ganciclovir (2'NDG) sur la charge virale CMV (Tocci <i>et al.</i> , 1984) après 7 jours d'infection et d'exposition au 2'NDG ou ACV.....	109
Figure 16 : Evolution de la charge virale après infection et exposition au GCV (2' NDG) (Tocci <i>et al.</i> , 1984).	110
Figure 17 : Effet de la concentration en ganciclovir sur la cytotoxicité (Rubsam <i>et al.</i> , 1998).	111
Figure 18 : Effet de la concentration en ganciclovir (DHPG), aciclovir (ACV) et zidovudine (AZT) sur la croissance des cellules hématologiques de la lignée myélocytaire (Somadossi <i>et al.</i> , 1987).	111
Figure 19 : Réduction de la charge virale à 21 jours après l'initiation de traitement par ganciclovir (GCV) (Emery <i>et al.</i> , 1999).	118

Figure 20 Relation entre diminution de charge virale et durée de traitement par ganciclovir (GCV): exemple de 5 patients (Emery <i>et al.</i> , 1999)	118
Figure 21 : Réactifs contenus dans le kit «High Pure Viral Nucleic Acid Kit®» (Roche Diagnostics).	133
Figure 22 : ADAM (advanced detection accurate measurement) : principe de l'analyse...	136
Figure 23 : ADAM (advanced detection accurate measurement): descriptif de l'appareillage.	136
Figure 24 : Préparation d'une souche CMV AD169 passage 28.....	144
Figure 25 : Préparation d'une souche CMV AD169 (passage 30) pour infection cellules lymphoblastoïdes à partir du passage 28.	144
Figure 26 : Méthode de détermination de la charge virale de la souche CMV AD169 passage 30.....	145
Figure 27 Préparation des cellules en vue de l'analyse extracellulaire et intracellulaire du GCV : l'analyse du GCV est à la fois réalisée dans le surnageant et dans le lysat cellulaire.	148
Figure 28 : Principe de la méthode de dosage indirect des formes phosphorylées du ganciclovir (GCV).	168
Figure 29 : Structures chimiques et masses molaires du GCV et ACV (étalon interne).....	168
Figure 30 : Ionisation du GCV ($m/z = 256$) et ACV ($m/z = 226$) et formation des ions fils (mode positif, ESI).....	170
Figure 31 : Effet de la dose infectieuse initiale sur la charge virale CMV- cellules non traitées par le GCV	201
Figure 32 Effet de la dose infectieuse en CMV sur la croissance cellulaire – cellules non exposées au GCV.	201
Figure 33 Effet de la dose infectieuse en CMV et de l'exposition au GCV sur la croissance cellulaire.....	202
Figure 34 : Effet du ganciclovir (GCV) sur la croissance cellulaire.	203
Figure 35 : Nombre de cellules versus concentration en ganciclovir (GCV).	204
Figure 36 : Effet de la concentration en ganciclovir (GCV) sur la toxicité cellulaire pour des durées d'exposition de 2, 7 ou 14 jours.	205
Figure 37 : Effet de la durée d'exposition au GCV sur la toxicité cellulaire pour des concentrations croissantes en ganciclovir (GCV).	205
Figure 38 Effet du ganciclovir (GCV) sur la croissance cellulaire.	209
Figure 39 Nombre de cellules versus concentration en ganciclovir (GCV).	210
Figure 40 Effet de la concentration en ganciclovir (GCV) sur la toxicité cellulaire pour des durées d'exposition de 1, 2, 7 ou 14 jours.....	210

Figure 41 : Effet de la durée d'exposition au GCV sur la toxicité cellulaire pour des concentrations croissantes en ganciclovir (GCV).	211
Figure 42 : Nombre de cellules versus concentration en GCV après 14 jours de culture cellulaire.....	212
Figure 43 : Nombre total de cellules mesuré par COULTER versus ADAM : erreur résiduelle entre les 2 méthodes de mesure.	213
Figure 44 : Corrélacion entre le nombre total de cellules mesuré par COULTER versus ADAM.....	213
Figure 45 : Viabilité cellulaire versus nombre totale de cellules (mesures réalisées par le compteur ADAM).....	214
Figure 46 Viabilité cellulaire versus concentration en GCV (mesures réalisées par le compteur ADAM).....	215
Figure 47 Nombre de cellules vivantes versus concentration en ganciclovir (GCV)	217
Figure 48 : Effet de la concentration en GCV sur la viabilité cellulaire (exprimée en % par rapport à des cellules non traitées) après 7 jours de culture cellulaire.....	218
Figure 49 : Effet de la concentration en GCV sur la viabilité cellulaire (exprimée en % par rapport à des cellules non traitées) après 14 jours de culture cellulaire.....	218
Figure 50 Viabilité de cellules non exposées au GCV versus durée de la culture cellulaire	219
Figure 51 Effet du ganciclovir (GCV) sur la croissance cellulaire.	221
Figure 52 Effet du ganciclovir sur la charge virale CMV (nombre de copies /mL).....	223
Figure 53 Effet du ganciclovir (GCV) sur la croissance cellulaire (exprimé en nombre de cellules) – cellules non infectées par le CMV.	225
Figure 54 : Effet du ganciclovir (GCV) sur la croissance cellulaire (exprimé en % du nombre de cellules « témoin » non exposées au GCV) – cellules non infectées par le CMV.	226
Figure 55 Nombre de cellules versus concentration en ganciclovir (GCV) – cellules non infectées par le CMV.	228
Figure 56 Effet de la concentration en ganciclovir (GCV) sur la toxicité cellulaire pour des durées d'exposition de 1, 2, 7 ou 14 jours – cellules non infectées par le CMV.....	229
Figure 57 : Effet de la concentration en GCV sur la viabilité cellulaire (exprimée en % par rapport à des cellules non traitées) après 7 jours de culture cellulaire – cellules non infectées par le CMV.	230
Figure 58 : Effet de la concentration en GCV sur la viabilité cellulaire (exprimée en % par rapport à des cellules non traitées) après 14 jours de culture cellulaire – cellules non infectées par le CMV.	230
Figure 59 : Corrélacion entre le nombre total de cellules mesuré par COULTER versus ADAM- cellules non infectées par le CMV.	231

Figure 60 : Corrélation entre le nombre de cellules vivantes versus nombre total de cellules (mesurées par le compteur ADAM) – cellules non infectées par le CMV.....	232
Figure 61 Corrélation entre le nombre de cellules vivantes (mesurées par le compteur ADAM) versus nombre total de cellules (mesurées par le compteur COULTER) – cellules non infectées par le CMV.	232
Figure 62 Viabilité de cellules non exposées au GCV versus durée de la culture cellulaire – cellules non infectées par le CMV	233
Figure 63 Microscopie électronique : Photos des cellules non infectées à J7 (cellules exposées 1 jour au GCV).	235
Figure 64 Microscopie électronique : Photos des cellules non infectées à J7 (cellules exposées 2 jours au GCV).	236
Figure 65: Microscopie électronique : Photos des cellules non infectées à J7 (cellules exposées 7 jours au GCV).	237
Figure 66: Microscopie électronique : Photos des cellules non infectées à J14 (cellules exposées 1 jour au GCV).	238
Figure 67 Microscopie électronique : Photos des cellules non infectées à J14 (cellules exposées 2 jours au GCV).	239
Figure 68 : Microscopie électronique : Photos des cellules non infectées à J14 (cellules exposées 7 jours au GCV).	240
Figure 69 : Microscopie électronique : Photos des cellules non infectées à J14 (cellules exposées 14 jours au GCV).	241
Figure 70 Effet du ganciclovir (GCV) sur la croissance cellulaire - cellules infectées par le CMV.	243
Figure 71 : Effet du ganciclovir (GCV) sur la croissance cellulaire (exprimé en % du nombre de cellules « témoin » non exposées au GCV) – cellules infectées par le CMV.	244
Figure 72 : Nombre de cellules versus concentration en ganciclovir (GCV) – cellules infectées par le CMV.	245
Figure 73 : Effet de la concentration en GCV sur la viabilité cellulaire (exprimée en % par rapport à des cellules non traitées) après 7 jours de culture cellulaire – cellules infectées par le CMV.	246
Figure 74 : Effet de la concentration en GCV sur la viabilité cellulaire (exprimée en % par rapport à des cellules non traitées) après 14 jours de culture cellulaire – cellules infectées par le CMV.	247
Figure 75 : Corrélation entre le nombre total de cellules mesuré par COULTER versus ADAM- cellules infectées par le CMV.	248

Figure 76 : Corrélation entre le nombre de cellules vivantes versus nombre total de cellules (mesurées par le compteur ADAM) – cellules infectées par le CMV.....	248
Figure 77 : Corrélation entre le nombre de cellules vivantes (mesurées par le compteur ADAM) versus nombre total de cellules (mesurées par le compteur COULTER) – cellules infectées par le CMV.	249
Figure 78 : Effet du ganciclovir sur la charge virale CMV (nombre de copies /mL)a b c	250
Figure 79 : Microscopie électronique : Photos des cellules infectées à J7 (cellules exposées 1 jour au GCV).	252
Figure 80 Microscopie électronique : Photos des cellules infectées à J7 (cellules exposées 2 jours au GCV).	253
Figure 81 : Microscopie électronique : Photos des cellules infectées à J7 (cellules exposées 7 jours au GCV).	254
Figure 82 : Microscopie électronique : Photos des cellules infectées à J14 (cellules exposées 1 jour au GCV).	255
Figure 83 : Microscopie électronique : Photos des cellules infectées à J14 (cellules exposées 2 jours au GCV).	256
Figure 84 : Microscopie électronique : Photos des cellules infectées à J14 (cellules exposées 7 jours au GCV).	257
Figure 85 : Microscopie électronique : Photos des cellules infectées à J14 (cellules exposées 14 jours au GCV).	258
Figure 86. Microscopie électronique : Photos des cellules à J7 (cellules exposées pendant 7 jours à une concentration de GCV de 5 mg/L).	259
Figure 87 : Microscopie électronique : Photos des cellules à J7 (cellules non exposées au GCV).....	260
Figure 88 Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, en haut) et du ganciclovir (GCV, en bas) ; colonne X TERRA C18RP.....	262
Figure 89 Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, en haut) et du ganciclovir (GCV, en bas) ; colonne Atlantis dC18	263
Figure 90 : Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, en haut) et du ganciclovir (GCV, en bas) – traitement des échantillons par la phosphatase alcaline.....	264
Figure 91 Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, en haut) et du ganciclovir (GCV, en bas) – échantillons non traités par la phosphatase alcaline.....	265
Figure 92 : Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, à gauche) et du ganciclovir (GCV, à droite) - Température d'évaporation de 30 °C.	267
Figure 93 : Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, à gauche) et du ganciclovir (GCV, à droite) - Température d'évaporation de 40 °C.	268

Figure 94 Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, à gauche) et du ganciclovir (GCV, à droite) - Température d'évaporation de (50 °C.	269
Figure 95 : Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, en haut) et du ganciclovir (GCV, en bas) - Colonne ATLANTIS HILIC (1).	270
Figure 96 : Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, en haut) et du ganciclovir (GCV, en bas) - Colonne ATLANTIS HILIC (2).	271
Figure 97 : Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, en haut) et du ganciclovir (GCV, en bas) - Colonne ATLANTIS HILIC (3).	272
Figure 98 : Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, en haut) et du ganciclovir (GCV, en bas) - Colonne ATLANTIS HILIC (4).	272
Figure 99 Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, en haut) et du ganciclovir (GCV, en bas) - Colonne ATLANTIS HILIC (5).	273
Figure 100 : Chromatogrammes de GCV, GCVMP, GCVDP, GCVTP – cellules infectées par le CMV (MOI = 0.1) et non exposées au GCV.....	277
Figure 101 : Chromatogrammes de GCVTP, GTP, BrATP, ATP, dGTP – cellules infectées par le CMV (MOI = 0.1) et non exposées au GCV.....	278
Figure 102 : Chromatogrammes de GCV, GCVMP, GCVDP, GCVTP – cellules infectées par le CMV (MOI = 0.1) et exposées pendant 24 heures au GCV 10 mg/L.	279
Figure 103 : Chromatogrammes de GCVTP, GTP, BrATP, ATP, dGTP – cellules infectées par le CMV (MOI = 0.1) et exposées pendant 24 heures au GCV 10 mg/L.	280

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Fréquence des résistances au ganciclovir (GCV) en transplantation d'organe. (GCV= ganciclovir, ValGCV = valganciclovir, NR = non renseigné).....	46
Tableau II : Ganciclovir et Valganciclovir : forme pharmaceutiques disponibles, posologies et indications.	48
Tableau III : Etudes d'efficacité du Ganciclovir sur des modèles <i>in vitro</i>	54
Tableau IV: Traitement prophylactique par ganciclovir (GCV) en transplantation de moelle osseuse chez l'adulte : études cliniques.....	58
Tableau V : Traitement « préemptif » par Ganciclovir en transplantation de moelle osseuse chez l'adulte : études cliniques.....	59
Tableau VI: <i>Traitement</i> par Ganciclovir en transplantation d'organe solide chez l'adulte : études cliniques (GCV = ganciclovir ; NR = non renseigné ; NS = non significatif).....	61
Tableau VII: Traitement « préemptif » par Ganciclovir en pédiatrie: études cliniques. (GCV = ganciclovir ; ACV = aciclovir).....	62
Tableau VIII : Synthèse des principales études de toxicité <i>in vitro</i> du Ganciclovir (GCV) sur les cellules hématologiques non infectées.	66
Tableau IX : Synthèse des principales études de toxicité <i>in vitro</i> du Ganciclovir sur les cellules infectées ou transfectées par HSV thymidine kinase (Tk).....	68
Tableau X : Toxicité hématologique du Ganciclovir : études cliniques.....	74
Tableau XI : Méthodes analytiques de dosage du ganciclovir (GCV) dans les milieux biologiques.....	79
Tableau XII : Préparation et conservation des cellules pour le dosage des nucléotides intracellulaires. ACV=aciclovir, ACVMP=aciclovir monophosphate, ACVDP=aciclovir diphosphate, ACVTP=aciclovir triphosphate, ARV=antirétroviraux, AZTTP=azidothymidine triphosphate, CMN=cellules mononuclées du sang périphérique, ...	84
Tableau XIII : Nombre de cellules nécessaires pour le dosage des nucléotides intracellulaires.	87
Tableau XIV : Méthodes de préparation, séparation et détection des analogues nucléotidiques.	89
Tableau XV : Méthodes analytiques de dosage des dérivés phosphorylés intracellulaires du ganciclovir (GCV).	96
Tableau XVI Ganciclovir (GCV) : Etudes pharmacocinétiques cliniques en pédiatrie.	115
Tableau XVII Méthodes d'infection « <i>in vitro</i> » de cellules lymphoblastoïdes par le cytomegalovirus	129
Tableau XVIII : Liste des solvants et réactifs.....	138

Tableau XIX : Colonnes chromatographiques utilisées pour la mise au point du dosage analytique.....	139
Tableau XX : Protocole pour la détermination de la dose infectieuse optimale (pour une lignée lymphoblastoïde).....	151
Tableau XXI : Cellules lymphoblastoïdes non infectées : plan d'analyse de l'étude de toxicité (pour 1 souche) essai A.	154
Tableau XXII : Cellules lymphoblastoïdes non infectées : plan d'analyse de l'étude de toxicité essai B.	156
Tableau XXIII : Protocole de préparation et d'infection des cellules Essai C.	158
Tableau XXIV : Cellules lymphoblastoïdes infectées par le CMV : plan d'analyse de l'étude d'efficacité	160
Tableau XXV : Cellules lymphoblastoïdes non infectées : plan d'analyse de l'étude de toxicité (pour 1 souche).....	164
Tableau XXVI : Cellules lymphoblastoïdes infectées par le CMV : plan d'analyse de l'étude de toxicité et d'efficacité (pour 1 souche).	165
Tableau XXVII : Préparation de l'échantillon et conditions chromatographiques retenues (Essai I).....	172
Tableau XXVIII : Modalités du gradient d'élution.	172
Tableau XXIX : Préparation de l'échantillon et conditions chromatographiques retenues (Essai II).....	174
Tableau XXX : Caractéristiques des échantillons analysés (Essai II).	175
Tableau XXXI : Préparation de l'échantillon et conditions chromatographiques retenues (Essai III).....	177
Tableau XXXII : Caractéristiques des échantillons analysés pour l'essai d'optimisation de la température d'évaporation.....	177
Tableau XXXIII : Préparation de l'échantillon et conditions chromatographiques retenues (Essai I).....	179
Tableau XXXIV : Caractéristiques des échantillons analysés pour l'essai d'optimisation de la prise d'essai et de l'influence de l'étape d'évaporation (Essai IV).....	179
Tableau XXXV Préparation de la gamme de GCV : culots cellulaires chargés.....	181
Tableau XXXVI Détermination du pH de la phase mobile pour la séparation HPLC des nucléotides endogènes : quelques références bibliographiques.....	183
Tableau XXXVII Quelques études sur la détection de nucléotides par SM et transitions retenues.	185
Tableau XXXVIII : Transitions retenues pour la détection des nucléotides intracellulaires.	186
Tableau XXXIX : Nombre de cellules par culot (volume de 0.5 mL).	190

Tableau XL : Modalités du gradient d'élution (Essai 1).....	190
Tableau XLI : Transitions retenues et mode de détection SM (Essai 1).	190
Tableau XLII : Nombre de cellules par culot (volume de 0.5 mL) ; cellules.....	191
Tableau XLIII : Modalités du gradient d'élution (Essai 2).....	192
Tableau XLIV : Transitions retenues et mode de détection SM (Essai 2).	192
Tableau XLV : Nombre de cellules par culot cellulaires (volume de 0.5 mL), cellules exposées au GCV pendant 48 heures.....	193
Tableau XLVI : Transitions retenues et mode de détection (Essai 4).	194
Tableau XLVII : Quantité de nucléotides contenue dans la solution finale (SF).....	195
Tableau XLVIII Composition de la solution de lavage pour l'extraction SPE.....	196
Tableau L : Stabilité des concentrations en GCV (5 et 15 mg/L) pendant 24 heures dans le milieu extra-cellulaire à 37°C.....	198
Les résultats de l'étude de stabilité sur la période totale prévue de l'étude sont présentés sur le tableau LII.....	199
Tableau LII : Stabilité des concentrations en GCV (10 mg/L) pendant 14 jours dans le milieu extra-cellulaire à 37°C.	199
Tableau LIII : Comparaison des résultats obtenus avec la colonne ATLANTIS versus ATLANTIS HILIC.....	274
Tableau LIV : Surface des pics chromatographiques et temps de rétention du GCVMP, GCVDP et GCVTP dans les lavages et les éluats de la SPE – traitement des cellules pendant 24 heures.	281
Tableau LV : Surface des pics chromatographiques et temps de rétention du GCVMP, GCVDP et GCVTP dans les lavages et les éluats de la SPE – traitement des cellules pendant 48 heures.	282
Tableau LVI : Signal retrouvé dans la fraction de lavage en fonction du % de méthanol....	285
Tableau LVII : Signal retrouvé dans l'éluat en fonction du % de méthanol.	286
Tableau LVIII : Rapport des surfaces de pics Eluat /Lavage.	287
Tableau LIX : Rapports des surfaces de pics Lavage /Phase mobile.	287
Tableau LX : Rapports des surfaces de pics Eluat/Phase mobile.....	287
Tableau LXI : Calcul du rendement d'extraction de l'éluat pour 2 % méthanoliques dans la fraction de lavage.....	288
Tableau LXII : Surfaces des pics des dépôts méthanoliques surchargés pour évaluer les pertes au dépôt.	288

1. Introduction – objectifs

L'infection par le cytomégalo virus (CMV) constitue une des complications majeures de la transplantation de moelle osseuse pédiatrique. Le ganciclovir (GCV) reste aujourd'hui le traitement de choix de l'infection mais sa toxicité sur les cellules de la lignée sanguine, en particulier leucocytaires rend son utilisation délicate. Cette toxicité représente un facteur de risque de mortalité en période de post-transplantation non négligeable et peut favoriser le rejet de greffe de moelle osseuse. Bien que sur le marché depuis de nombreuses années, peu d'études pharmacocinétiques du GCV sont disponibles chez l'enfant en transplantation de moelle osseuse (TMO). En plus, la relation entre concentrations plasmatiques du GCV et son efficacité (relation PK/PD) n'a jamais été clairement mise en évidence. Notamment, aucune donnée n'est disponible concernant les relations entre les doses et les durées d'administration du GCV et d'une part son activité antivirale, et d'autre part son action sur les cellules souches hématopoïétiques, responsable de leucopénie.

La première partie du travail a consisté à rassembler les données bibliographiques concernant d'une part le CMV et sa pathogénicité, et d'autre part le GCV. En particulier, les aspects relatifs à la transplantation de moelle osseuse ont été développés tant d'un point de vue virologique que thérapeutique.

La deuxième partie regroupe le travail expérimental dont l'objectif était de déterminer l'influence de l'intensité et la durée d'exposition au GCV sur l'activité antivirale et la toxicité cellulaire à partir d'une étude *in vitro* sur cultures cellulaires lymphoblastoïdes infectées par le CMV. L'objectif étant de déterminer un nouveau schéma thérapeutique moins toxique et aussi efficace que les schémas utilisés actuellement (5 mg/kg/12 h pendant 15 jours puis 5 mg/kg/24h pendant 21 jours).

Les perspectives suite à ce travail sont de réaliser une étude clinique afin de comparer le nouveau schéma thérapeutique déterminé d'après l'étude *in vitro*. L'objectif final étant d'améliorer la prise en charge des infections à CMV chez l'enfant immunodéprimé en raccourcissant considérablement la durée du traitement et donc les coûts liés à la fois à l'administration du médicament mais aussi au suivi biologique de l'infection à CMV. La

limitation attendue de la toxicité médullaire devrait permettre d'éviter les rejets de greffe et donc les deuxièmes transplantations.

2. Analyse bibliographique

2.1. Cytomégalovirus

2.1.1. Caractéristiques structurales du virus

Le cytomégalovirus (CMV) fait partie de la famille des Herpesviridae (figure 1) et appartient à la sous famille des beta-Herpesvirinae. Ses caractéristiques structurales sont présentées sur la figure 2.

La réplication du virus comporte trois phases : « très précoce » avec synthèse de protéines activatrices, « précoce » avec synthèse de protéines enzymatiques dont une ADN polymérase virale ; et « tardive » avec synthèse de composants protéiques de la capside et des glycoprotéines d'enveloppes. La réplication de l'ADN viral sépare les phases précoces et tardives. Le virus ne possède pas de thymidine kinase (au contraire du virus de l'herpes HSV). L'ADN polymérase virale est sensible à l'acide phosphonoformique (foscarnet) et à la forme triphosphatée du GCV (GCVTP). La première phosphorylation du GCV est assurée par le produit d'un gène du CMV appelé UL 97 à fonction phosphotransférase.

Comme tout virus à enveloppe, le CMV est fragile mais peut persister quelques temps sur des objets inertes (jouets des enfants en crèche, couches). Le CMV est l'un des virus les plus doués pour le « sabotage » de nos défenses immunitaires, de par le nombre de gènes piratés au génome cellulaire et fonctionnant comme leurre des éléments du système immunitaire (Emery *et al.*, 1999).

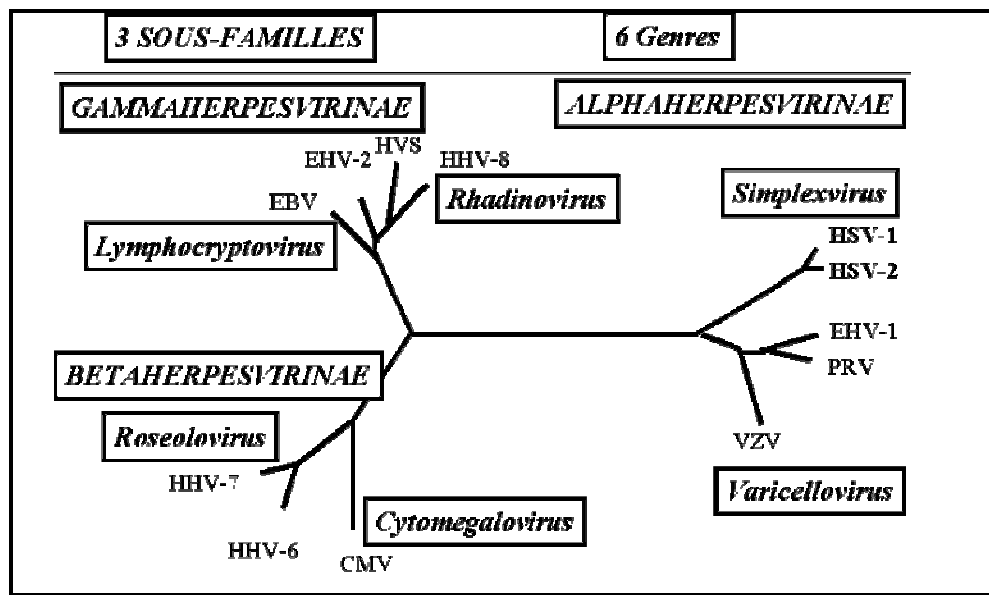


Figure 1 : Classification des Herpes virus Humains.

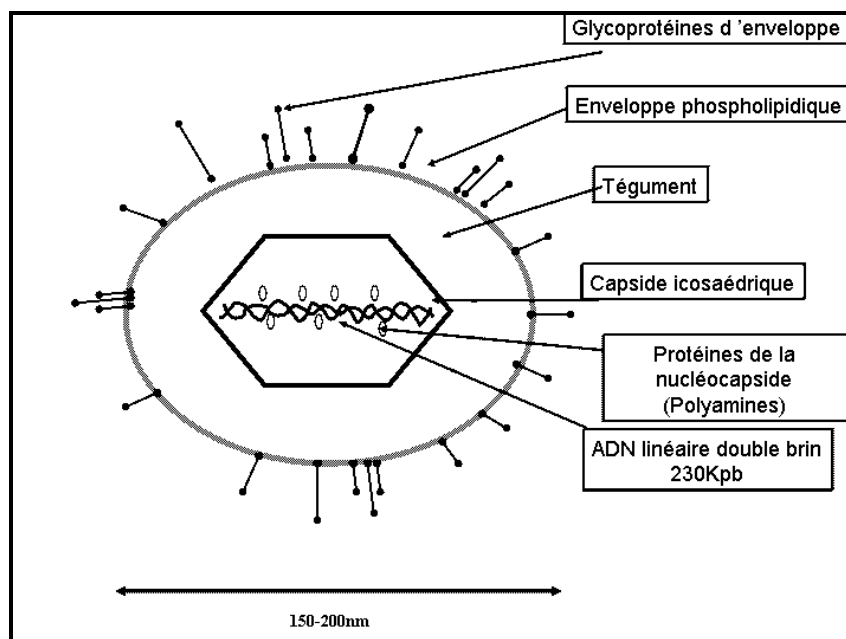


Figure 2 : Caractéristiques structurales du Cytomégalovirus.

2.1.2. Epidémiologie et pouvoir pathogène

Le virus est strictement humain, il est très ubiquitaire, et infecte dans nos pays environ la moitié de la population (près de 100 % dans le tiers monde). Il est responsable d'infections souvent asymptomatiques, mais aussi d'infections graves voire mortelles. 1%

des nouveaux nés sont infectés congénitalement et présentent une virurie. Le virus est latent dans les monocytes (il fait partie avec l'EBV et le HHV-6 des *Herpesviridae* « leucotropes ») mais aussi dans les cellules endothéliales vasculaires ; il est à l'origine de réinfection endogènes : ainsi il est présent dans les sécrétions cervicales de 1/10 à ¼ des femmes enceintes.

La transmission se fait par contacts intimes : la grossesse, l'accouchement, les soins de maternage dont l'allaitement et le changement de couches, les jeux entre enfants en crèche, les rapports sexuels. Il était transmissible par transfusion sanguine (2,5 à 5 % des dons du sang non sélectionnés étaient contaminants) mais la déleucocytation systématique du sang en France de puis 1998 a pratiquement annulé ce risque). Il est transmissible par greffe d'organe solide ou de moelle osseuse.

Le virus est excrété par les sujets infectés ou porteurs asymptomatiques de façon intermittente ou continue pendant des mois ou des années dans les urines, le sperme, les sécrétions cervico-vaginales, le lait, la salive et les larmes.

Le virus persiste toute la vie de façon latente dans les leucocytes périphériques, les cellules souches de la moelle osseuse, les cellules réticulo-endothéliales, les macrophages et les cellules épithéliales glandulaires (figure 3) (Sweet *et al.*, 1999 ; Gerna *et al.*, 2004 ; Khaiboullina *et al.*, 2004 ; Sinclair 2008).

Les réactivations symptomatiques (récurrences) ou asymptomatiques peuvent se produire s'il existe un facteur déclenchant : réactions allogéniques, atteinte du tissu réticulo-endothélial, déficit de l'immunité cellulaire ou traitement immunosuppresseur. Des réinfections sont également possibles.

Le cycle de multiplication du virus est long (96 à 120 heures). La dissémination de l'infection se fait par voie hématogène La virémie est associée à la fraction leucocytaire du sang. Le CMV infecte les lymphocytes B et T, les polynucléaires et les macrophages (Colin Jordan *et al.*, 1982 ; Minton *et al.*, 1994 ; Revello *et al.*, 1998). L'infection des cellules réticulo-endothéliales des canaux glandulaires provoque des lésions de vascularites oblitérantes et ischémiques ainsi que des foyers inflammatoires dans les tissus glandulaires.

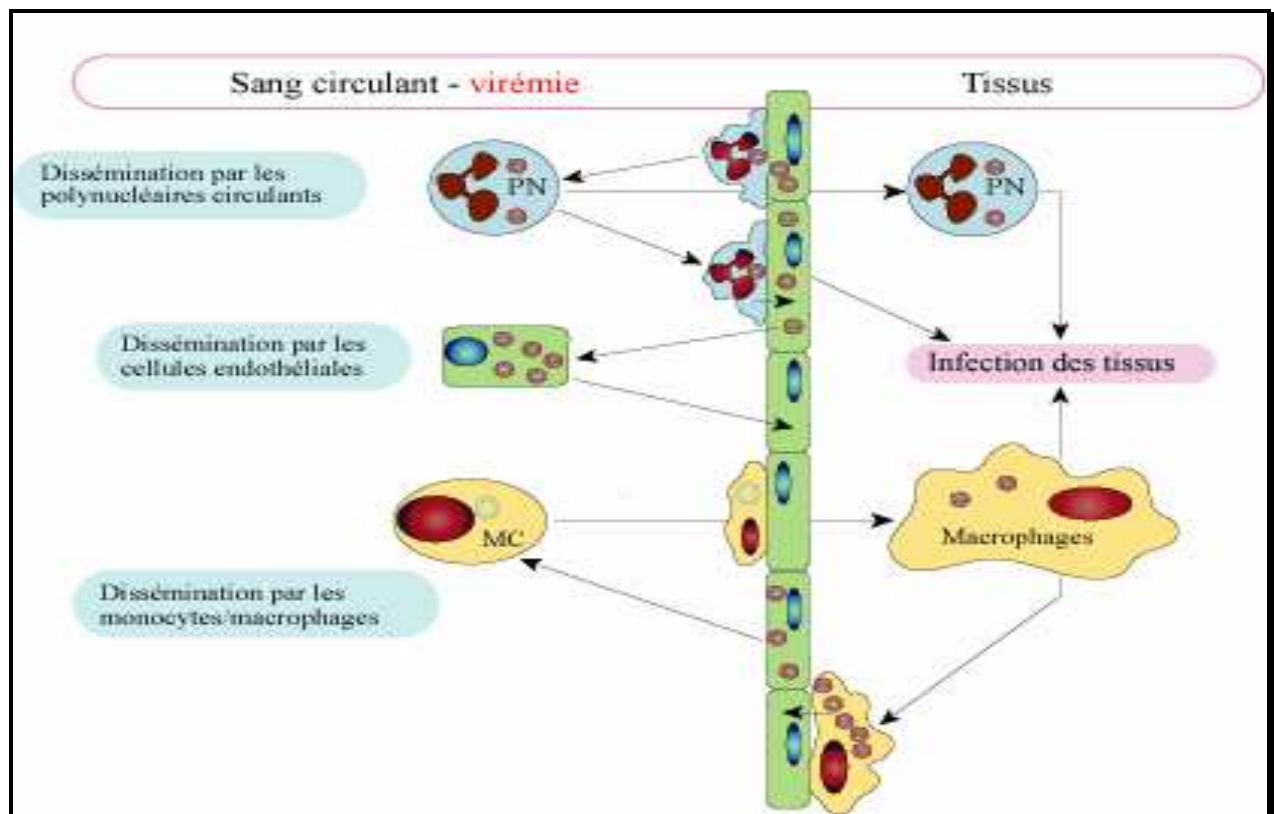


Figure 3 : Dissémination de l'infection par voie hématogène.

2.1.3. Manifestations cliniques de l'infection

2.1.3.1. Infection du nouveau né

Une infection survenant en cours de grossesse peut être transmise au fœtus et le CMV représente la cause la plus fréquente des infections congénitales dans les pays industrialisés (Casteels *et al.*, 1999). On estime la séroprévalence du CMV autour de 50 % chez les femmes enceintes en France (Grangeot-Keros *et al.*, 1998 ; Gratacap-Cavallier *et al.*, 1998). Dans ce cas, la mère, à l'occasion de la grossesse subit une réinfection endogène, qui peut être liée à l'immunodépression physiologique. Les 1/10 à 1/4 des femmes présentant du CMV au niveau du col utérin en fin de grossesse peuvent contaminer leur enfant *in utero* ou au moment de la naissance, mais ce n'est pas aussi grave qu'en cas de primo infection car l'enfant est protégé par les anticorps maternels préexistants.

Parmi les femmes séronégatives, l'incidence des primo-infections varie entre 0,6 et 1,4 % et la transmission au fœtus se fait dans 30 à 50 % des cas (Stagno *et al.*, 1986 ; Gouarin *et al.*, 2001 ;). L'infection congénitale à CMV se traduit dans environ 10 % des cas par des anomalies à la naissance, la forme la plus grave étant l'atteinte multiviscérale définie comme la maladie des inclusions cytomégaliqes ; les nouveaux nés naissent infectés, avec 2 types de symptômes graves :

- des signes d'infection générale : hépato-splénomégalie, ictère, thrombopénie, pneumonie, chez les enfants de petits poids.
- des signes d'atteinte céphalique : microcéphalie, calcifications intracérébrales périventriculaires, chorioretinite.

Il en résulte une mortalité élevée ou de lourdes séquelles psychomotrices et sensorielles : les enfants, s'ils survivent sont sourds, aveugles et infirmes moteur-cérébraux. La maladie des inclusions cytomégaliennes est retrouvée chez 2 à 5 /100000 naissances.

La majorité des enfants symptomatiques à la naissance gardent des séquelles neurosensorielles et 5 à 10 % des nouveau-nés infectés et asymptomatiques développent dans les premiers mois de vie des troubles neurosensoriels, notamment auditifs, ou de développement psychomoteur (Saigal *et al.*, 1982 ; Boppana *et al.*, 1992). L'importance des infections maternelles et congénitales à CMV reste peu documentée en France.

Le dépistage systématique ou ciblé de l'infection chez la femme enceinte n'est pas recommandé, en raison notamment de l'absence de thérapeutique anti-virale validée en prénatal, l'absence de consensus quant à la prise en charge de la primo-infection maternelle, les aspects pratiques et éthiques liés au diagnostic (anxiété, fausses couches iatrogènes liées à l'amniocentèse, interruptions de grossesse injustifiées, performances non optimales des tests diagnostiques) prédominant sur les risques de séquelles graves. Cependant, une augmentation importante du nombre de sérologies CMV a été observée entre 2001 et 2002 (Parent du Chatelet *et al.*, 2008) et la recherche systématique du virus chez le nouveau né pourrait permettre d'améliorer le traitement de la maladie (Mosca *et al.*, 2007)

2.1.3.2. *Sujet immunocompétent*

L'infection, généralement asymptomatique, peut se manifester sous forme de fièvre et/ou d'asthénie prolongée, de syndrome mononucléosidique (à différencier de la mononucléose à virus Epstein-Barr (EBV), de la primo-infection à HIV et de la toxoplasmose), de leucopénie, sous forme d'hépatite aiguë, exceptionnellement sous forme de syndrome de Guillain Barre, de pneumonie ou d'encéphalite (Gerna *et al.*, 2004).

Néanmoins un certain nombre de cas de manifestations cliniques sévères ont été retrouvés dans la littérature. Ces manifestations graves regroupent des colites, méningites, encéphalites le plus souvent. Mais aussi des anémies hémolytiques, thrombopénies, thromboses, uvéites et pneumonie avec au total 182 cas recensés (Rafailidis *et al.*, 2008).

2.1.3.3. *Sujet immunodéprimé*

Le CMV est un virus opportuniste chez les personnes immunodéprimées. Il peut s'agir d'une primo infection exogène par administration à un sujet séronégatif, essentiellement à partir d'une greffe d'organe de donneur CMV positif. Il peut aussi s'agir d'une réinfection endogène déclenchée par l'immunodépression (ou même par le rejet de la greffe). La gravité de l'infection dépend du degré de l'immunodépression.

En cas d'immunodépression légère (greffe de rein, de foie), seule la primo-infection est généralement symptomatique.

Chez les sujets profondément immunodéprimés (cas des greffes de moelle osseuse et du SIDA), primo infection et réinfection endogène sont capables de donner des infections graves : encéphalite, chorioretinite, ulcérations digestives (bouche, œsophage, colon et anus), glomérulopathie, pneumonie, pancytopenie par infection médullaire.

Il faut considérer à part la pneumonie interstitielle des greffés de moelle, en raison de sa gravité : en post transplantation de moelle osseuse, elle conduit à 87 à 93 % de mortalité (Castagnola *et al.*, 2004).

2.1.3.4. *Patient VIH positif*

L'immunodépression de type cellulaire permet la réactivation du CMV, ce qui expliquerait la fréquence des manifestations chez les sujets HIV séropositifs ; Il semble que même chez le patient immunodéprimé CMV séropositif, des réinfections exogènes à partir de souches différentes de CMV soient possibles.

Au cours du SIDA, l'infection à CMV est très fréquemment terminale (figure 4) avec un taux de lymphocytes CD4+ < 50/mm³. Il s'agit avant tout de la rétinite nécrosante uni puis rapidement bilatérale, d'atteintes digestives (ulcérations) et plus rarement de pneumopathie interstitielle, cholangite, encéphalite, myélite, nécrose ou myocardite (Gerna *et al.*, 2004).

Heureusement, grâce au développement et à la commercialisation de molécules très efficaces contre le SIDA, la survenue de maladies opportunistes sévères à CVM a diminué chez les patients VIH séropositifs (Gerna *et al.*, 2004).

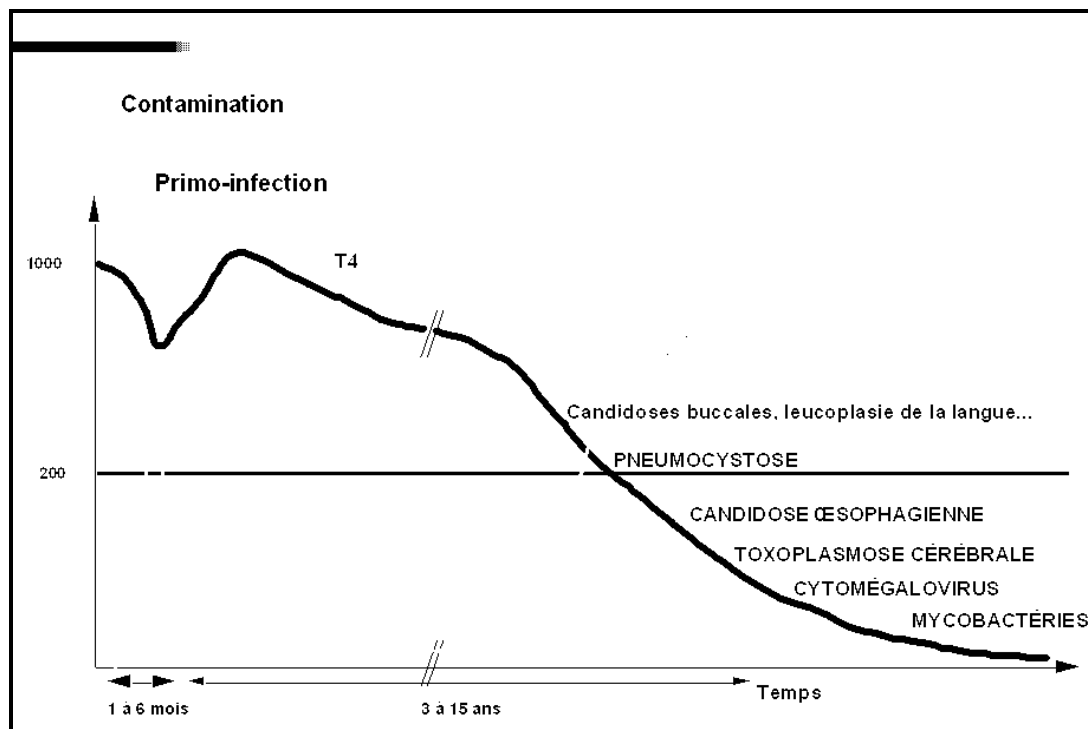


Figure 4 : Manifestations cliniques dans le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).

2.1.3.5. Transplantation

2.1.3.5.1. Organe solide

Plus de 75 % des transplantations d'organe solide conduisent à la primo infection ou réactivation du CMV chez le patient receveur. L'infection est associée aux symptômes cliniques pour une partie de ces patients. Elle entraîne une augmentation de la mortalité post-greffe. 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-) (Fishman *et al.*, 2007).

Les manifestations cliniques peuvent être de la fièvre, pneumopathie, hépatite, gastroentérite et rétinite. Les patients transplantés de foie présenteront plutôt une hépatite, alors que les patients transplantés de poumons manifesteront la pneumopathie. La destruction du tissu infecté est directement liée à la réplication virale et à la lyse cellulaire, couplée à la réponse immune de l'hôte qui entraîne la destruction des tissus qui présentent des antigènes du CMV à la surface des cellules.

Dans les effets indirects de l'infection à CMV, on retrouve une fréquence plus importante de rejet de greffe avec athérosclérose coronarienne chez les transplantés de cœur (Gerna *et al.*, 2004 ; Fishman *et al.*, 2007) et des bronchiolites oblitérantes après greffe de poumons ; ainsi que des infections bactériennes et fongiques et une diminution de la survie de la greffe et du receveur. Enfin le CMV est associé aux maladies lymphoprolifératives en période post-greffe (Fishman *et al.*, 2007).

2.1.3.5.2. Moelle osseuse

Dans de très rares cas, et chez des patients CMV séropositifs, la maladie peut apparaître avant la greffe avec un taux de mortalité associé très élevé. Pendant les 30 premiers jours post-greffe, la réactivation est due à la déplétion en cellules T de l'immunité. La déficience sévère en période post-greffe des cellules de l'immunité (en qualité et en quantité) persiste chez les patients après greffe allogénique. Pendant cette période, la maladie se déclenche chez environ 60-70% des patients séropositifs (R+/D-) ou des patients séronégatifs avec donneur séropositif (R-/D+). Sans mesure préventive, le risque de manifestations cliniques de la maladie est de 20-30%. Les manifestations sont essentiellement des pneumopathies interstitielles, des gastroentérites et des hépatites et plus rarement des encéphalites et des rétinites (Castagnola *et al.*, 2004 ; Hebart *et al.*, 2004 ; Haastrup *et al.*, 2005). Pour la pneumopathie interstitielle : elle était retrouvée dans 11 à 15% des cas avec une issue fatale dans 87 à 93% des cas avant les années 90. La survenue a lieu entre 5 à 13 semaines après la transplantation mais parfois plus tard ; en plus cette maladie est un facteur de risque significatif de développer des aspergilloses pulmonaires (Thursky *et al.*, 2004).

Chez les patients greffés de moelle autologue, la reconstitution cellulaire (lymphocyte T) est plus rapide. Le risque de maladie à CMV est significativement plus bas pour ces patients comparativement aux patients recevant une greffe de moelle allogénique (alors que la prévalence de l'infection est la même pour les 2 groupes de patients).

Le risque de développer des maladies « tardives » (à plus de 100 jours post greffe) est important (Hebart *et al.*, 2004).

2.1.4. Diagnostic au laboratoire

2.1.4.1. *Diagnostic direct*

2.1.4.1.1. Détection du virus dans le sang

Grâce à la culture sur fibroblastes embryonnaires humains, on peut voir apparaître en quelques jours à 1 mois (voire 6 semaines) un effet cytopathique (ECP) sous forme de grosses cellules rondes en foyer. On retrouve une grosse inclusion nucléaire d'où le nom de cytomégalovirus (Gerna *et al.*, 2004).

L'infection des cultures peut être mise en évidence de façon accélérée en 24 à 48 heures après l'inoculation, bien avant l'apparition de l'ECP, par examen immuno-cytologique sur la culture cellulaire elle-même en immunofluorescence (IF) ou en immuno peroxydase (IP). On utilise pour cela un anticorps monoclonal spécifique des antigènes très précoces (Gerna *et al.*, 2004)

2.1.4.1.2. Détection des antigènes et du génome

La détection et la quantification d'antigène viral directement dans le sang est plus rapide. Elle s'effectue par IF dans les noyaux des polynucléaires du sang circulant : c'est l'antigénémie CMV (Gerna *et al.*, 2004).

La recherche de séquences génomiques virales en PCR (« polymerase chain reaction ») a transformé le diagnostic des infections. Rapide, très sensible et quantifiable, elle est très utile au diagnostic d'infection active quand elle porte sur des compartiments clos comme le LCR pour le diagnostic d'encéphalite, l'humeur aqueuse pour le diagnostic de chorioretinite, le liquide amniotique pour le diagnostic d'infection congénitale à CMV. La PCR sur le sang, pour recherche et quantification d'ADN viral, tend à remplacer actuellement la recherche d'antigénémie (Gerna *et al.*, 2004).

La PCR (figure 5) amplifie le nombre de copies d'une séquence d'ADN spécifique (Amplicon) par une répétition de cycles thermiques faisant intervenir une paire d'amorces

sens et anti-sens et une ADN polymérase résistante à une température élevée. La PCR en temps réel étudie la cinétique de la réaction grâce à une sonde émettant une fluorescence lors de l'amplification de l'amplicon (le fluorochrome est écarté d'un extincteur par l'ADN polymérase). De la cinétique, c'est-à-dire du premier cycle donnant une fluorescence, on déduit la quantité d'amplicons (copies) présents au départ dans le prélèvement.

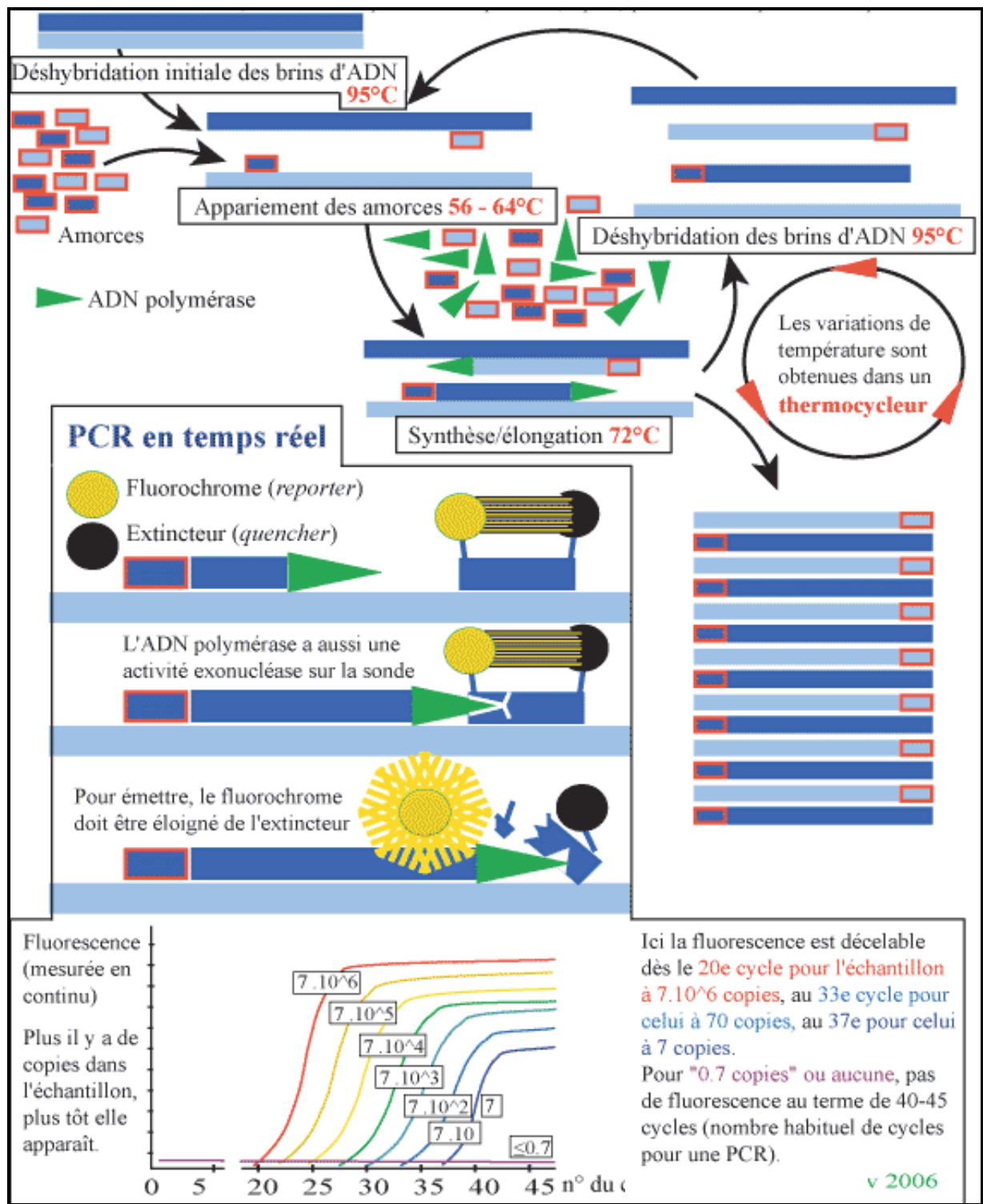


Figure 5 : Principe de la méthode PCR (polymerase chain reaction).

2.1.4.2. *Diagnostic indirect*

Il est d'intérêt limité. La réponse au test est aléatoire dans les états d'immunodépression, la présence d'IgM n'est pas spécifique de la primo-infection (synthèse d'IgM lors de la réactivation). La recherche d'IgG en technique ELISA n'est utile que pour classer les donneurs et receveurs d'organe ou de sang en séropositifs ou séronégatifs (Castagnola *et al.* , 2004), et pour dépister les femmes séronégatives avant la grossesse. La détection d'IgG spécifique en technique ELISA est un argument en faveur d'une infection actuelle active mais ce test n'est pas assez sûr pour qu'on le pratique à titre systématique chez la femme enceinte (ANAES, 2004).

2.1.4.3. *Interprétation des tests*

L'interprétation des résultats virologiques n'est pas sans difficultés car le virus est très ubiquitaire. Cette interprétation est d'autant plus importante qu'elle débouche sur des traitements antiviraux non dépourvus de toxicité.

Chez le sujet immunodéprimé, des indications existent pour des traitements « anticipés » ou encore appelés « préemptifs », c'est-à-dire administrés avant les signes d'atteinte viscérale et sur la seule détection du virus lorsque cette détection est considérée comme prédictive d'atteinte viscérale. Ainsi chez le greffé de moelle osseuse, au sortir d'aplasie, la recherche d'antigénémie est effectuée de manière systématique et très régulièrement. La seule détection d'infection dans les polynucléaires déclenche un traitement anticipé. Pour les greffés d'organe solide où le traitement immunosuppresseur est plus léger, le seuil d'intervention est plus élevé que pour les greffes de moelle osseuse.

En plus pour compliquer la situation, il arrive que l'atteinte viscérale soit due à l'association de l'infection à CMV et d'une autre infection (bactérienne ou parasitaire) favorisée par l'immunodépression que peut induire le CMV.

2.1.5. Facteurs de risque associés à la maladie en post transplantation de moelle osseuse

2.1.5.1. Statut sérologique Receveur /Donneur

Le statut sérologique du receveur et le statut sérologique du donneur si le receveur est CMV séronégatif sont des facteurs de risque de développer la maladie.

Si le statut du couple receveur/donneur est R-/D-, la probabilité de développer la maladie à CMV est nulle (Ljungman *et al.*, 1998 ; Patel *et al.*, 2005).

Castagnola *et al.* rapportent que la réactivation du CMV se produit pour 80 % des receveurs CMV+ (R+/D- ou R+/D+) versus 28% des receveurs CMV- de donneurs CMV+ (R-/D+), avec un risque associé de développer la maladie de 14% (R+/D-), 12% (R+/D+) et 5% (R-/D+). Des études ont montré que le statut du receveur (R+) est beaucoup plus significatif que le statut du donneur (D+) quant au risque de développer l'infection à CMV (Morfin *et al.*, 2004 ; Patel *et al.*, 2005).

Le statut R+/D- est plus péjoratif en terme de survenue d'infection et de maladie que le statut R+/D+ (Gratama *et al.*, 2001 ; Matthes-Martin *et al.*, 2003 ; Castagnola *et al.*, 2004 ; Patel *et al.*, 2005; Ljungman *et al.*, 2006)

2.1.5.2. Donneur non apparenté

Castagnola *et al.* ont montré un risque relatif de réactiver l'infection ou de développer la maladie de 2,4 pour des donneurs apparentés versus 4,4 pour des donneurs non apparentés (versus des patients recevant des greffes autologues). D'autres études confirment que les réactivations d'infections sont plus fréquentes lorsque la greffe est non apparentée (Atkinson *et al.*, 1995 ; Einsele *et al.*, 2000 ; Haastrup *et al.*, 2005 et Patel *et al.*, 2005).

Pour Ljungman *et al.*, et concernant des patients dont le traitement préemptif était basé sur la mesure de la charge virale (PCR), la transplantation de « greffes mismatchées » a été le seul facteur de risque significatif de décès lié au CMV.

2.1.5.3. Antigénémie et ADN viral

Lorsqu'ils persistent malgré le traitement, ils sont associés à la survenue de la maladie tardive (Boekh *et al.*, 2003).

2.1.5.4. *GvHD aigue*

Plusieurs études ont montré qu'elle représentait un facteur de risque de survenue de la maladie (Ljungman *et al.*, 1998 ; Castagnola *et al.*, 2004). Plus récemment, Ljungman *et al.* ont montré (en 2006) que la GvHD aigue stade II-IV est un facteur de risque de développer la maladie (par rapport à des patients présentant une GvHD stade 0-I).

2.1.5.5. *GvHD chronique*

Comme la GvHD aiguë, elle est un facteur de risque de développer la maladie à CMV tardive (Einsele *et al.*, 2000 ; Boekh *et al.*, 2003 ; Hebart *et al.*, 2004).

2.1.5.6. *Traitements antiviraux prolongés au-delà de 100 jours*

Le traitement antiviral par GCV lorsqu'il est prolongé au-delà de 100 jours représente à lui seul un facteur de risque de développer la maladie à CMV « tardive », de par ses effets indésirables hématologiques qui contribuent au ralentissement de la reconstitution immunologique post-greffe indispensable pour se défendre contre le virus (Einsele *et al.*, 2000 ; Hebart *et al.*, 2004).

2.1.5.7. *Immunodépression prolongée*

La déplétion en cellules T CD4+ et CD8+ ou la présence de cellules immatures ne permet pas la restauration d'une immunité active contre le CMV et aboutit aux manifestations cliniques tardives de la maladie après 100 jours post-greffe (Gratama *et al.*, 2001 ; Boekh *et al.*, 2003 ; Castagnola *et al.*, 2004 ; Hebart *et al.*, 2004 ; Avetysian *et al.*, 2006).

2.1.5.8. *Greffe déplétée en cellules T*

La déplétion du greffon en cellules T est à risque par rapport à une greffe « non manipulée » (Boekh *et al.*, 2003 ; Patel *et al.*, 2005).

2.1.5.9. Age des patients

Ce facteur de risqué a été retrouvé dans plusieurs études avec une corrélation positive entre l'âge et la réactivation d'infections ou le développement de la maladie (Ljungman *et al.*, 1998 ; Castagnola *et al.*, 2004 ; Boekh *et al.*, 2003).

2.1.5.10. Traitement prophylactique (de la GVHD) par ciclosporine, corticoïdes ou sérum anti-lymphocytaire

Ces traitements immunosuppresseurs représentent un facteur de risque de développer la maladie (Castagnola *et al.*, 2004 ; Patel *et al.*, 2005).

2.1.5.11. Vitesse de décroissance de la charge virale après initiation du traitement

Une réponse lente au traitement (avec diminution modeste de la charge virale) est un facteur de risque de développer la maladie (Humar *et al.*, 2002 ; Avetisyan *et al.*, 2006 ; Ljungman *et al.*, 2006).

2.1.5.12. HHV6 (Human herpes virus 6)

L'infection par HHV6 est un facteur de risque de développer la maladie à CMV après arrêt du traitement antiviral préventif (Razonable *et al.*, 2003)

2.1.6. Toxicité du CMV sur les cellules sanguines

2.1.6.1. Etudes in vitro

La présence du CMV perturbe les réponses immunitaires normales (Sweet *et al.*, 1999) et touche à la fois la réponse cellulaire et la réponse humorale.

Le CMV exerce une activité inhibitrice sur la croissance des cellules hématopoïétiques (Maciejewski *et al.*, 1992 ; Torok-Storb *et al.*, 1992 ; Holdberg-Peterson *et al.*, 1996 ; Movassagh *et al.*, 1996 ; Sindre *et al.*, 2000 ; Gredmark *et al.*, 2004a et b).

Cette toxicité semble d'autant plus importante sur les cellules à division rapide : elle est plus marquée sur les cellules de la moelle osseuse que sur les cellules de sang de cordon (Holdberg-Peterson *et al.*, 1996).

Torok-Storb *et al.* ont montré l'effet inhibiteur du CMV sur la croissance de progéniteurs myéloïdes (cultures de cellules de MO) avec une diminution du nombre de colonies détectées (Torok-Storb *et al.*, 1992).

L'effet peut être direct (infection des progéniteurs myéloïdes) ou indirect (infection de cellules stromales). Pour certains auteurs, la toxicité serait indépendante de la réplication virale (Sindre *et al.*, 2000), avec un rôle mineur des protéines de régulation spécifiques du virus (IE1 et IE2) dans l'inhibition de la croissance des cellules hématopoïétiques.

A l'inverse, Movassagh *et al.* ont montré que la myélosuppression est liée à la réplication virale active, avec la détection des gènes du virus dans les premières étapes de différenciations des cellules hématologiques (Movassagh *et al.*, 1996).

L'inhibition peut être aussi due à l'altération de cytokines produites par les cellules stromales (Torok-Storb *et al.*, 1992 ; Crapnell *et al.*, 2004). La diminution des transcrits du G-CSf, acteur majeur de la reconstitution hématopoïétique peut aussi expliquer en partie cette toxicité (Torok-Storb *et al.*, 1992).

Gredmark *et al.* ont montré que le CMV inhibe les cytokines responsables de la transformation des monocytes en macrophages actifs (Gredmark *et al.*, 2004 a). Cette inhibition est liée à la liaison de la particule virale à la molécule de surface CD13/aminopeptidase N; cette liaison du CMV sur les monocytes provoquant une entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule, avec pour conséquence l'inhibition de la différenciation du monocyte vers le macrophage fonctionnel (Gredmark *et al.*, 2004 b).

Si la toxicité affecte essentiellement les cellules progénitrices de la moelle osseuse, elle touche aussi, indirectement, les cellules lymphocytaires T (Giebel *et al.*, 2005).

2.1.6.2. Etudes *in vivo*

Les défenses immunitaires sont affectées *in vivo* par l'infection par le CMV (Sweet *et al.*, 1999) et ce par des mécanismes multiples. Le virus est notamment résistant à l'action des cellules NK (Sweet *et al.*, 1999).

Le CMV est aussi un des facteurs perturbateur des défenses immunitaires en période post-greffe. Cela peut conduire à un déficit en cellules CD4+ et CD8+ dont le rôle est justement de lutter contre le CMV. Ce déficit est responsable des maladies « tardives » à CMV, provoquées par une immunosuppression prolongée (Boeckh *et al.*, 2003).

Giebel *et al.* ont montré que l'activité proliférative des cellules T (incorporation de 3 HTdR après stimulation par des mitogènes) est corrélée négativement avec l'antigénémie CMV pp 65. L'infection à CMV est liée à une décroissance importante de l'activité proliférative des cellules T (en comparaison à des témoins non infectés à + 30 et à + 45 jours).

La « mauvaise » restauration de l'activité des cellules T CMV spécifiques favorise le développement de la maladie. Aussi la détection et le suivi de cette activité cellulaire seraient utiles dans l'optimisation de la prise en charge thérapeutique des patients (Boeckh *et al.*, 2003 ; Avetisyan *et al.*, 2006).

Randolph-Habecker *et al.* ont montré dans une étude rétrospective l'influence de la souche de CMV (glycoprotéine B) sur la toxicité hématologique du virus. Les souches de CMV glycoprotéines B type 3 et 4 seraient associées à la neutropénie (alors que les souches glycoprotéine B 1 et 2 ne le seraient pas). Ils montrent aussi que le risque de présenter une anémie aplasique est plus important chez les patients infectés par le CMV que chez les non infectés. De plus l'anémie aplasique est corrélée à la souche de virus (50 % de souches glycoprotéine B3).

Gratama *et al.* ont montré que chez les patients séropositifs, la maladie se développe préférentiellement chez ceux n'ayant pas eu de reconstitution en cellules T CD8+ (numération des cellules CD8+ CMV-spécifiques).

2.2. *Ganciclovir*

2.2.1. Généralités

Le GCV est commercialisé depuis 20 ans et reste aujourd'hui le traitement anti-viral de référence du CMV.

2.2.2. Dénomination et Structure chimique

Le GCV ou DHPG ou dihydroxypropoxy methylguanine (9-(1,3 dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine ou 2'nor-2'deoxyguanosine ou BWB7559U) présente une masse de 255 g/mol. Sa structure chimique est présentée sur la figure 6.

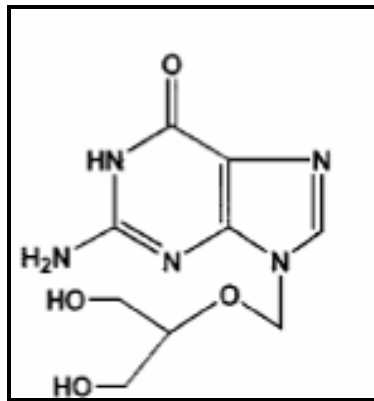


Figure 6 : Structure chimique du Ganciclovir.

2.2.3. Propriétés pharmacodynamiques

2.2.3.1. Mécanisme d'action

Le GCV est un analogue nucléosidique de la déoxyguanosine triphosphate ou dGTP (nucléotide endogène). 3 phosphorylations successives sont nécessaires pour obtenir la forme active du produit : le GCV triphosphate (GCVTP). Le GCV est préférentiellement phosphorylé en GCV monophosphate (GCVMP) dans les cellules infectées, grâce à une protéine codée par le gène viral UL97 (étape limitante). Les 2 phosphorylations suivantes sont réalisées par des kinases cellulaires (figure 7).

Le GCVTP inhibe la réplication virale par compétition avec le dGTP comme substrat pour l'ADN polymérase. Son incorporation dans l'ADN inhibe la réplication du virus (McGavin et al., 2001).

Les concentrations intracellulaires en GCVTP sont approximativement 10 fois plus importantes dans les cellules infectées par rapport aux cellules non infectées (Crumpacker et al., 1996).

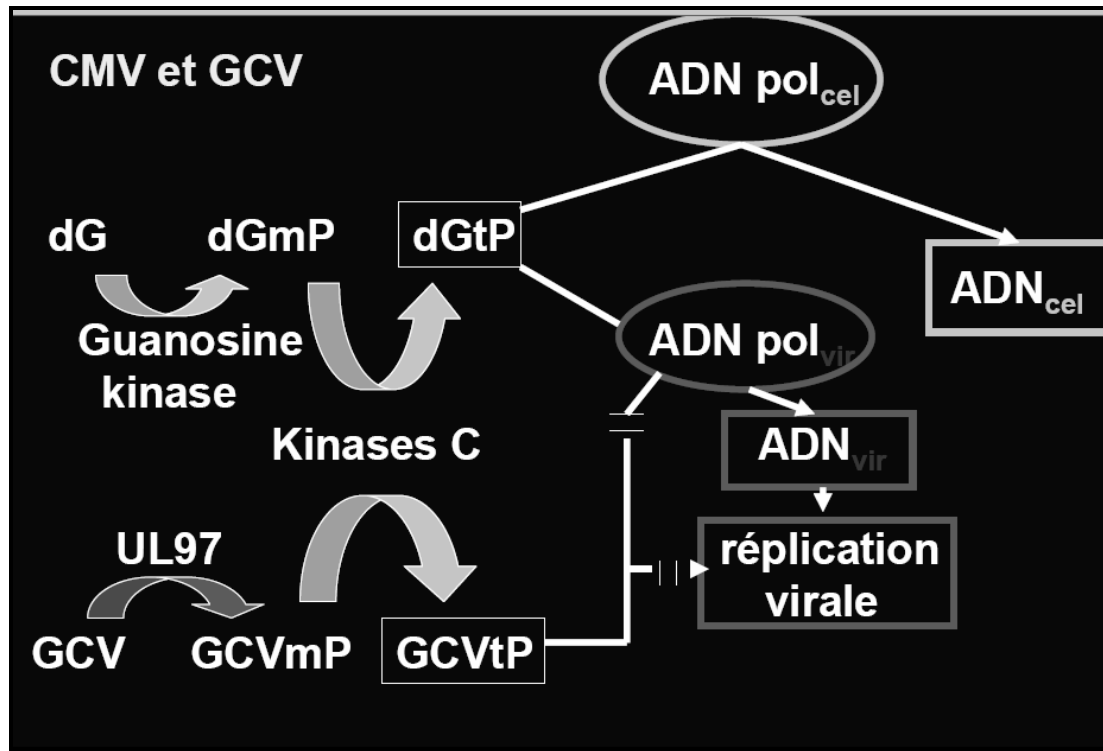


Figure 7 : Phosphorylation intracellulaire du GCV en GCVTP et mécanisme d'action.

dG = deoxyguanosine, dGmP = deoxyguanosine monophosphate, dGtP = deoxyguanosine triphosphate, ADN pol cel = ADN polymérase cellulaire, ADN pol vir = ADN polymérase virale.

2.2.3.2. *Activité antivirale*

Le GCV présente une activité antivirale puissante contre le CMV humain. La molécule a un mécanisme d'action proche de celui de l'aciclovir (ACV) mais présente une activité *in vitro* (CI50%) plus importante vis-à-vis du CMV (26 fois plus comparativement à l'ACV). Les concentrations intracellulaires en GCVTP sont 10 fois plus importantes que celles obtenues en ACVTP dans les mêmes conditions. La réplication du CMV est inhibée *in vitro* pour des concentrations médianes en GCV comprises entre 0,1 et 1,6 mg/L (McGavin *et al.*, 2001), mais nous verrons plus loin que la CI 50% est conditionnée par le type de virus et le modèle cellulaire.

Le GCV présente une activité vis-à-vis du CMV mais aussi des autres Herpes virus (par inhibition de l'ADN polymérase) : HSV1, HSV2, VZV, HHV6, HHV7, EBV (Crumpacker *et al.*, 1996).

2.2.3.3. *Résistances au GCV*

La résistance au GCV est peu fréquente (Fishman *et al.*, 2007). Lorsqu'elle est présente, elle est due à des mutations du gène UL 97 (qui code pour la première phosphorylation du GCV), et/ou de l'ADN polymérase virale (plus d'incorporation du GCVTP) (McGavin *et al.*, 2001).

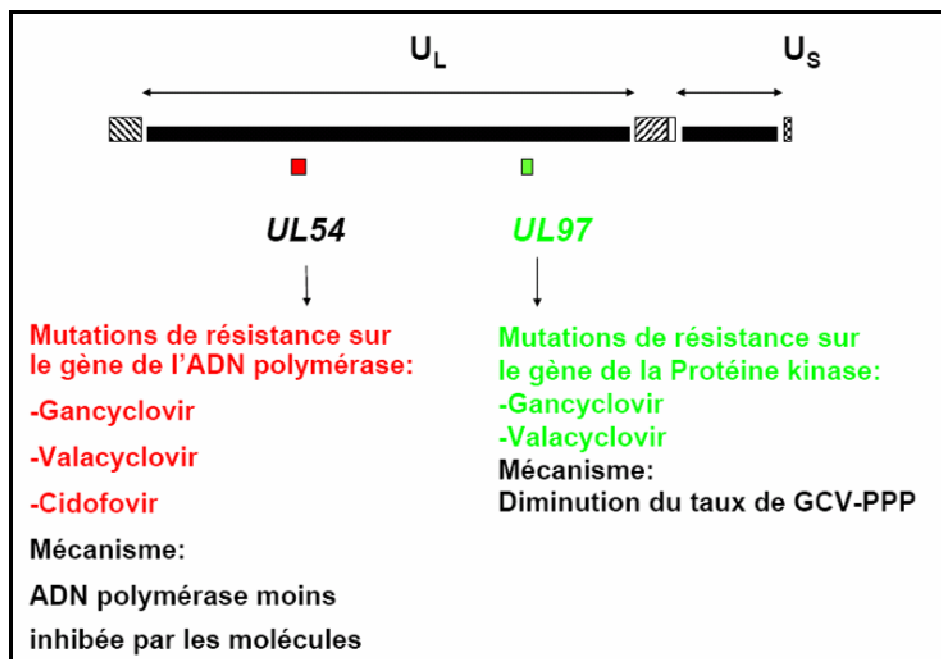


Figure 8 : Principaux sites géniques de mutation du Cytomégalovirus.

Les mutations portant sur UL97 sont les plus précoces : la résistance au GCV sera de bas niveau (avec une sensibilité conservée au foscarnet et au cidofovir) (Crumpacker *et al.*, 1996).

Les mutations portant sur UL54 sont plus tardives : elles se surajoutent fréquemment aux mutations sur UL97 (et résistance croisée au foscarnet et au cidofovir). Elles sont responsables d'une résistance de haut niveau au GCV. Le risque de résistance augmente avec la durée des traitements (Emery *et al.*, 2000 ; Mc Gavin *et al.*, 2001 ; Razonable *et al.*, 2003).

Enfin, une surexpression de la protéine MRP4 (transporteur nucléotidique d'efflux) peut conférer une résistance au GCV (Adachi *et al.*, 2002).

Les résultats d'études cliniques concernant la résistance au GCV sont présentés dans le tableau I.

Tableau I : Fréquence des résistances au ganciclovir (GCV) en transplantation d'organe. (GCV= ganciclovir, ValGCV = valganciclovir, NR = non renseigné).

Ref	Traitement	Organe	Mutants	Suivi	Nombre (%)
Limaye 2000	GCV oral	tous	UL97	1 an	5/240 (2,1)
Boivin 2004	GCV oral	tous	UL97	4 mois	2/103 (1,9)
				1 an	1/33 (6,1)
	ValGCV	tous	-	4 mois	0
Gruber 2005				1 an	0
	ValGCV	rein	-	> 1 an	0
?	GCV oral	poumon	UL97	6 mois	1/40 (2,5)
				1 an	NR
	ValGCV	poumon	UL97/UL54	6 mois	1/40 (2,5)
				1 an	1/40 (2,5)

2.2.4. Propriétés pharmacocinétiques (chez l'adulte)

2.2.4.1. Absorption et distribution

Les concentrations au pic plasmatique montrent une pharmacocinétique linéaire pour les voies orale et IV (pour des doses uniques de 1 à 6 g pour la voie orale et de 1 à 5 mg/kg pour la voir IV). La biodisponibilité orale du GCV est de 7%.

Après administration IV, la liaison aux protéines plasmatiques est minimale (1 à 2 %) (McGavin et al., 2001).

2.2.4.2. Elimination

La demi-vie d'élimination du GCV après administration orale et IV est de 9 et 6 heures respectivement chez l'adulte. L'élimination est essentiellement rénale (McGavin et al., 2001).

2.2.5. Utilisation en thérapeutique

2.2.5.1. Formes pharmaceutiques, posologies et indications dans le cadre de l'Autorisation de Mise sur le Marché (Vidal 2008)

Il existe 2 formes pharmaceutiques disponibles en France pour le GCV : la poudre pour perfusion intraveineuse, et le gel ophtalmique pour le traitement local de la rétinite due au virus Herpes simplex. Plus récemment, la mise à disposition du valganciclovir (valGCV, ester du GCV) a permis d'améliorer la biodisponibilité orale très médiocre du GCV. Le valGCV est commercialisé en France sous la forme de comprimés. L'équivalence des doses GCV IV- valGCV oral est la suivante :

valGCV 900 mg 2 fois par jour = GCV 5mg/kg 2 fois par jour

Les posologies et indications dans le cadre de l'Autorisation de Mise sur le Marché sont présentées dans le tableau II.

Tableau II : Ganciclovir et Valganciclovir : forme pharmaceutiques disponibles, posologies et indications.

Nom commercial	Dénomination commune internationale	Forme pharmaceutique	Dosage	Indications	Posologie
CYMEVAN®	ganciclovir	Poudre pour perfusion IV	250 mg 500 mg	SIDA : manifestations rétinienne, pulmonaires et encéphaliques	5 mg/kg en perfusion d'1 heure X 2/jour (traitement d'attaque) 5 mg/kg en perfusion d'1 heure X 1/jour (traitement d'entretien)*
				Transplantation solide et moelle osseuse : traitement curatif	5 mg/kg en perfusion d'1 heure X 2/jour pendant 14 à 21 jours*
				Transplantation moelle osseuse : traitement préemptif (si excrétion virale de CMV)	5 mg/kg en perfusion d'1 heure X 2/jour pendant 7 jours puis 5 mg/kg en perfusion d'1 heure X 1/jour jusqu'à J100 ou J120 post-greffe*
				Transplantation : traitement prophylactique (transplantation cardiaque surtout)	5 mg/kg en perfusion d'1 heure X 2/jour pendant 14 jours puis 6 mg/kg en perfusion d'1 heure X 1/jour et 5jours /7 pendant 14 jours*
VIRGAN®	ganciclovir	Gel ophtalmologique	1,5 mg/g	Kératites superficielles dues au virus Herpes Simplex	1 goutte x5 /jour jusqu'à complète réépithélialisation cornéenne puis 1goutte x 3/jour pendant 7jours NON INDIQUE DANS LE TRAITEMENT DES RETINITES DUES AU CMV
ROVALCYTE®	valganciclovir	Comprimé	450 mg	Rétinite traitement d'attaque	900 mg x2 par jour pendant 21 jours**
				Rétinite traitement d'entretien	900 mg x1 par jour**
				Prophylaxie en transplantation d'organe solide	900 mg x1 par jour à partir de J10 post greffe et jusqu'à J100**

* adaptation des posologies de ganciclovir en cas d'Insuffisance rénale comme suit :

Si clairance de la créatinine ≥ 50 ml/min : 5 mg/kg toutes les 12 heures

Si clairance de la créatinine entre 25-49 ml/min : 2,5 mg/kg toutes les 12 heures

Si clairance de la créatinine entre 10-24 ml/min : 2,5 mg/kg toutes les 24 heures

Si clairance de la créatinine entre 0-9 ml/min: 1,25 mg/kg toutes les 24 heures

** adaptation des posologies de valganciclovir en cas d'Insuffisance rénale comme suit :

Si clairance de la créatinine ≥ 60 ml/min : 900 mg 2 fois/jour en traitement d'attaque

Si clairance de la créatinine ≥ 60 ml/min : 900 mg 1 fois/jour en traitement d'entretien ou prophylaxie

Si clairance de la créatinine entre 40-59 ml/min : 450 mg 2 fois/jour en traitement d'attaque

Si clairance de la créatinine entre 40-59 ml/min : 450 mg 1 fois/jour en traitement d'entretien ou prophylaxie

Si clairance de la créatinine entre 25-39 ml/min: 450 mg 1 fois/jour en traitement d'attaque

Si clairance de la créatinine entre 25-39 ml/min: 450 mg 1 fois/2 jours en traitement d'entretien ou prophylaxie

Si clairance de la créatinine entre 10-24 ml/min: 450 mg 1 fois/2 jours en traitement d'attaque

Si clairance de la créatinine entre 10-24 ml/min: 450 mg 2 fois/semaine en traitement d'entretien ou prophylaxie

2.2.5.2. *Traitement prophylactique, préemptif et curatif*

La stratégie prophylactique consiste à appliquer un traitement à tout patient recevant une transplantation de moelle osseuse. Cette stratégie est de moins en moins utilisée actuellement. Le traitement prophylactique peut aussi être ciblé sur des patients à haut risque d'infection. Le traitement prophylactique est surtout réalisé avec l'acyclovir (molécule moins efficace mais moins toxique que le GCV).

Le problème majeur de cette stratégie de traitement est le risque d'apparition de souches résistantes (traitement prolongé à faible dose) et le risque d'émergence de maladies à CMV tardives (Forman *et al.*, 1994).

Le traitement « préemptif » ou anticipé est initié dès l'apparition d'une infection asymptomatique (positivation de l'antigénémie pp65 ou PCR) sans manifestations cliniques de l'infection (McGavin *et al.*, 2001, Singh *et al.*, 2006). Il nécessite une surveillance virologique étroite avec prise en charge thérapeutique de tous les patients développant l'infection (Meijer *et al.*, 2003). Il est donc nécessaire de disposer d'outils virologiques ayant une forte sensibilité et une bonne valeur prédictive positive (avec définition d'un seuil de charge virale annonciateur d'évolution de la maladie) car sinon le risque est de traiter en excès les patients avec une molécule toxique (Forman *et al.*, 1994 ; Meijer *et al.*, 2003).

La comparaison de ces 2 types de stratégies de traitement (prophylactique et préemptif) montre le peu d'intérêt de la stratégie prophylactique en terme de réduction de la maladie et de la mortalité (McGavin *et al.*, 2001 ; Meijer *et al.*, 2003). L'intérêt de la stratégie préemptive/prophylactique est de réduire la toxicité hématologique (Forman *et al.*, 1994 ; Goodrich *et al.*, 1994 ; Castagnola *et al.*, 2004),).

Le traitement curatif est finalement mis en place si échec du traitement prophylactique et /ou préemptif.

2.2.5.3. *Posologie, voie d'administration et durée de traitement par GCV en pratique*

Les posologies recommandées en traitement préemptif ou anticipé (voie IV) sont de 5 mg/kg toutes les 12 heures pendant 7 à 14 jours, suivis de 5 mg/kg une fois par jour. En pratique la durée du traitement est très variable et dépend du degré d'immunosuppression. Une réduction des doses est recommandée pour les patients présentant une altération rénale, une neutropénie, anémie et /ou thrombocytopénie (MC Gavin *et al.*, 2001).

2.2.6. Contre indications au traitement dans le cadre de l'Autorisation de Mise sur le Marché (Vidal 2008)

Les contre indications absolues au traitement sont les suivantes :

- Hypersensibilité au GCV ou à l'ACV
- Taux de polynucléaires neutrophiles inférieur ou égal à $500/\text{mm}^3$
- Taux de plaquettes inférieur à $25\,000/\text{mm}^3$
- Femme en période d'activité génitale en l'absence de moyen efficace de contraception
- Patient de sexe masculin sans moyen contraceptif pendant le traitement et les 90 jours suivant l'arrêt

Les contre indications relatives au traitement sont les suivantes :

- Femme enceinte ou qui allaite
- Didanosine (molécule antirétrovirale)

2.2.7. Utilisation chez l'enfant de moins de 12 ans dans le cadre de l'Autorisation de Mise sur le Marché (Vidal 2008)

2.2.7.1. Cymevan[®]

L'expérience clinique du traitement des affections à CMV chez les patients en dessous de 12 ans est limitée. La prévalence des effets secondaires est plus élevée chez l'enfant que chez l'adulte en ce qui concerne la thrombopénie, les effets urogénitaux, les cauchemars, les rashes cutanés et tous les effets secondaires cutanés. L'utilisation chez l'enfant ne doit être envisagée qu'en cas de nécessité absolue en raison de ses effets oncogènes à long terme et de ses effets toxiques sur la reproduction.

Cymévan[®] n'est pas indiqué pour le traitement des infections à CMV congénitales ou néonatales.

2.2.7.2. Rovalcyte[®]

L'utilisation chez l'enfant et chez l'adolescent n'est pas recommandée, les caractéristiques pharmacocinétiques n'ayant pas été établies dans ces populations

2.2.8. Effets indésirables principaux

2.2.8.1. Toxicité hématologique

C'est l'effet indésirable majeur du traitement. Il s'agit essentiellement de leuco-neutropénie, thrombocytopénie et anémie.

Cette toxicité hématologique peut être diminuée par réduction des doses ou arrêt du traitement. Cependant une neutropénie prolongée ou irréversible peut entraîner l'apparition de maladies infectieuses (bactériennes ou fongiques) fatales.

La toxicité hématologique est plus fréquente en post transplantation de moelle osseuse (comparativement aux transplantations d'organe solide). Une hyperbilirubinémie à l'instauration du traitement par GCV, une créatinine plasmatique élevée, une moelle osseuse pauvre, sont des facteurs de risque de développer une neutropénie lors du traitement par GCV (Goodrich *et al.*, 1991 ; Forman *et al.*, 1998 ; Mc Gavin *et al.*, 2001).

La neutropénie induite par le GCV peut ensuite favoriser l'émergence de maladies fongiques ; le traitement par GCV est considéré comme facteur de risque de développer une aspergillose invasive en post TMO (Thursky *et al.*, 2004).

2.2.8.2. Autres effets indésirables

La toxicité rénale nécessite une surveillance accrue notamment pour les patients recevant d'autres médicaments néphrotoxiques.

Des effets neurologiques ont aussi été retrouvés. (McGavin *et al.*, 2001 ; Peyrière *et al.*, 2006).

2.2.9. Efficacité antivirale

2.2.9.1. *Etudes in vitro*

Le GCV est un analogue de l'ACV, molécule utilisée pour lutter contre les infections virales dues aux herpes virus. L'efficacité du GCV a d'abord été testée vis-à-vis de cellules infectées par HSV. L'activité anti-CMV a été étudiée dans un second temps. C'est pour cette raison que les études les plus anciennes montrent l'efficacité sur des modèles cellulaires infectées par HSV plutôt que par HCMV (Germershausen *et al.*, 1983 ; Cheng *et al.*, 1984 ; St Clair *et al.*, 1984 ; Collins *et al.*, 1985 ; Smee *et al.*, 1985)

Il a été démontré par plusieurs travaux que le GCV est plus efficace que l'ACV sur les 2 types de virus (HSV et CMV), non pas par un effet inhibiteur plus puissant sur les ADN polymérases virales, mais grâce à une synthèse plus importante du dérivé GCVTP /ACVTP et par une rétention plus importante dans les cellules (pendant plusieurs jours) avec une dégradation plus lente par rapport à l'ACVTP (Biron *et al.*, 1985 ; Smee *et al.*, 1985).

L'activité du GCV est en moyenne 100 fois plus importante sur les modèles cellulaires infectés par rapport à des modèles non infectés (Biron *et al.*, 1985). La concentration en GCV qui inhibe 50 % de la croissance virale (CI 50%) du CMV varie de 1.7 μ M à 13 μ M en fonction des souches virales étudiées et des modèles cellulaires (Mar *et al.*, 1983 ; Biron *et al.*, 1985 ; Duke *et al.*, 1986 ; Freitas *et al.*, 1986 ; Manischewitz *et al.*, 1990)

Le GCV inhibe préférentiellement l'ADN polymérase virale par rapport à l'ADN polymérase cellulaire (Germershausen *et al.*, 1983 ; St Clair *et al.*, 1987).

Une étude sur des virus mutants, montre que les enzymes responsables de l'activation du GCV ne sont pas des kinases cellulaires car leur synthèse n'est pas altérée par le mutant/souche sauvage du virus (Biron *et al.*, 1986).

Les principales études d'efficacité *in vitro* sont rassemblées dans le tableau III. Pour chaque référence, sont précisés le type cellulaire, l'agent infectieux utilisé, les paramètres d'efficacité étudiés et les résultats obtenus en termes d'efficacité.

Tableau III : Etudes d'efficacité du Ganciclovir sur des modèles *in vitro*.

GCV = ganciclovir, ACV = aciclovir, GCVTP = ganciclovir triphosphate, ACVTP = aciclovir triphosphate, Ki=constante d'inhibition, CI=concentration inhibitrice, HPLC=high performance liquid chromatography.

Ref	Cellule	Agent infectieux	Paramètres étudiés	Résultats
Germershausen 1983	REIN	HSV1 (10 pfu/cel)	- phosphorylation enzymatique - ADN polymérase virale - ADN polymerase cellulaire (étude comparative GCV versus ACV)	- GCVTP 7 fois> ACVTP - GCVTP est plus sélectif vis à vis des ADN polymérases virales/cellulaires que l'ACVTP - Pas d'inhibition significative des ADN polymérases cellulaires (pour GCVTP et ACVTP)
Mar 1983	MRC5	HCMV (différentes souches)	- CI50% (µM) - synthèse de polypeptides viraux - synthèse d'ADN	-1 à 5 (fonction des souches de CMV) - inhibition 96 heures après l'infection -inhibition
Cheng 1984	HeLa	HSV1 et 2	- effet du GCV sur la synthèse d'ADN - effet du GCV sur le pool des nucléotides endogènes -synthèse d'ARN viral	- inhibition dose-dépendante - augmentation du pool de nucléotides endogène - pas d'effet
Franck 1984	-	Production GCVTP avec HSV1 thymidine kinase	- incorporation du dGTP - synthèse d'ADN - ADN polymérases virales (souches résistantes <i>in vivo</i>)	- inhibition compétitive - inhibition - pas de corrélation entre résistance <i>in vivo</i> et Ki des ADN polymérases
St Clair 1984	Vero HeLa	HSV1	- ADN polymérase virale - ADN polymérase cellulaire	- inhibition - Ki pour ADN polymérase cellulaire 35 à 50 fois supérieur /ADN polymérase virale
Tocci 1984	HEL MRC5	Souches HCMV HSV1 et 2	- CI 50% - charge virale - incorporation de la thymidine [³ H]	- 0,4 à 6,3 µM - indétectable (après exposition à 10µg/ml) - diminution de 50%/contrôle (après exposition à 10µg/ml)

Ref	Cellule	Agent infectieux	Paramètres étudiés	Résultats
Biron 1985	MRC5	CMV AD169 ($<0,05$ pfu/cel)	- activité antivirale - inhibition de l'ADN polymérase virale - analyse HPLC des dérivés phosphate du GCV - taux de phosphorylation cellules infectées/non infectées - persistance de la forme GCVTP dans les cellules infectées (comparaison ACV)	- meilleure/ACV (CI50%= $1,7\mu\text{M}$ versus $108\mu\text{M}$) - ACV= inhibiteur plus efficace/GCV - GCVTP 10 FOIS>ACVTP - GCVTP 100 fois> dans cellules infectées versus cellules non infectées. - persistance pendant plusieurs jours (+longtemps/ACV) dans les cellules infectées et non infectées.
Collins 1985	Vero B2 Vero H RK13 BHK21 HELA MRC5 3T3 LM	HSV1	-CI50% (μM)	Vero B2: 0,05 Vero H: 0,47 RK13: 0,03 BHK21: 0,3 HELA: 0,12 MRC5: 1,04 3T3: 0,004 LM: 0,001
Freitas 1985	MRC5	HCMV AD169 HCMV Davis Monkey CMV Rodent CMV	- CI 50 %	- GCV plus efficace /ACV ; CI50 % de 5 à $13\mu\text{M}$
Smee 1985	Vero HeLa	HSV1 et 2	- métabolisme intracellulaire - phosphorylation enzymatique - inhibition ADN polymérase (comparaison GCV/ACV)	- taux de GCVTP X 2 /ACVTP - Elimination plus lente du GCVTP/ACVTP - phosphorylation +rapide du GCV/:ACV - ACVTP inhibiteur plus puissant des ADN polymérases cellulaires et virales

Ref	Cellule	Agent infectieux	Paramètres étudiés	Résultats
Biron 1986	MRC5	HCMV résistant (0,5 pfu/cel)	- taux de phosphorylation cellules infectées virus mutant/virus sauvage - effet sur les kinases cellulaires	- 1/10 GCVTP (virus mutant/virus sauvage) - pas d'effet (pas de différence avec la souche sauvage)
Duke 1986	MRC5	HCMV (différentes souches) (0,005 pfu/cel)	- CI50% (μM) - Ki (μM) ADN polymérase virale (HCMV AD169)	- 4,5 à 6,2 - 1,7 (pour GCVTP)
Manischewitz 1990	MRC5	CMV (souche clinique) CMV AD169	- IC50 - phosphorylation du GCV cellules infectées/non infectées - ADN polymérase virale - phosphorylation GCVTP/thymidine kinase	- 9 μM pour CMV, 11,8 μM pour CMVAD169 - phosphorylation cellules infectées>>> non infectées - inhibition - pas de corrélation (implique un autre mécanisme pour la phosphorylation du GCV)

2.2.9.2. Etudes cliniques

2.2.9.2.1. Transplantation de moelle osseuse adulte

L'efficacité des traitements prophylactiques a été montrée en terme de réduction de l'infection et de développement de la maladie (Goodrich *et al.*, 1993 ; Winston *et al.*, 1993), cependant cette stratégie expose à la toxicité et à la résistance au traitement (Goodrich *et al.*, 1994).

Les traitements préemptifs ou « anticipés » (par GCV ou valGCV) sont basés sur la détection biologique précoce de l'infection. Leur efficacité a été montrée dans de nombreuses études cliniques (Goodrich *et al.*, 1991 ; Schmidt *et al.*, 1991 ; Ljungman *et al.*, 1998 ; Reddy *et al.*, 1999 ; Vij *et al.*, 2003 ; Ayala *et al.*, 2006 ; Van der Heiden *et al.*, 2006 ; Busca *et al.*, 2007).

Ils sont largement utilisés, les stratégies de traitement prophylactique n'apportant pas de bénéfice additionnel (Ljungman *et al.*, 1998). Pour ce qui concerne les schémas posologiques du traitement préemptif, Maltazou *et al.* (1999) ont montré la supériorité en terme d'efficacité d'un schéma préemptif en 5 jours /7 par rapport à un traitement en 3 jours /7.

Les principales études cliniques concernant le traitement prophylactique et le traitement préemptif par GCV en TMO chez l'adulte sont rassemblées dans les tableaux IV et V respectivement.

Tableau IV: Traitement prophylactique par ganciclovir (GCV) en transplantation de moelle osseuse chez l'adulte : études cliniques.

Ref	Critère principal	Groupe GCV	Groupe PLACEBO	p
Goodrich 1993	Infection (%)	3	45	<0,001
	Maladie (%)	0	26	<0,01
Winston 1993	Infection (%)	20	56	<0,001
	Maladie (%)	10	24	NS

Tableau V : Traitement « préemptif » par Ganciclovir en transplantation de moelle osseuse chez l'adulte : études cliniques.

GCV = ganciclovir ;valGCV = valganciclovir ;NS = non significatif

Ref	Nombre de patients	Critère d'évaluation de l'efficacité	Groupe GCV	Groupe Placebo/ autre traitement	p
Goodrich 1991	72	Survie à 180 jours	4/37 (11%)	11/35 (31%)	0,027
		Maladie	1/37 (2%)	15/35 (43%)	<0,001
Schmidt 1991	40	Maladie	5/20 (25%)	14/20 (70%)	0,01
Reddy 1999	55	Maladie	3/16 (19%)	3/39 (8%) Mais patients non à risque	Etude non comparative
Vij 2003	58	Récurrence de virémie (2 ^{ème} épisode)	19/58 (33%)	-	Etude non comparative
		Récurrence de virémie (3 ^{ème} épisode)	5/58 (9%)	-	Etude non comparative
		Maladie	5/58 (9%)	-	Etude non comparative
Ayala 2006	43	Négativisation de la charge virale	11/13 (85%)	ValGCV 28/30 (93%)	NS
V Heiden 2006	57	Négativisation de la charge virale	28/37 (76%)	ValGCV 16/20 (80%)	NS
Busca 2007	15	Négativisation de la charge virale (après 28 jours de traitement)	ValGCV 15/15 (100%)	-	Etude non comparative
		Récurrence de l'infection après arrêt du traitement	6/15 (40%) (résolution pour 5/6 patients après 2 ^{ème} cure)	-	Etude non comparative
		Survie à 272 jours	12/15 (80%)	-	Etude non comparative

2.2.9.2.2. Transplantation d'organes solides chez l'adulte

Le traitement prophylactique par GCV chez le transplanté d'organe solide réduit la mortalité globale de 40% (méta-analyse de 34 études, Hodson *et al.*, 2005) et réduit le risque d'infection à CMV de 60%, quelque soit le type d'organe greffé et quelque soit le statut sérologique du couple donneur/receveur. Les principales études cliniques (traitements prophylactique, préemptif et curatif) sont présentées dans le tableau VI. Il est à noter que l'étude comparative GCV versus valGCV réalisée par Paya *et al.* en 2004 n'a pas montré de différence statistiquement significative entre les 2 types de traitements, concernant d'une part le risque de développer la maladie et d'autre part la résolution de l'infection (diminution de la charge virale). L'intérêt de l'association GCV et Foscarnet en traitement préemptif a été étudié par Mattes *et al.* (2004) et ne montre pas l'avantage de l'association versus la monothérapie par GCV sur l'évolution de l'infection (négativisation de la charge virale).

Tableau VI: *Traitement* par Ganciclovir en transplantation d'organe solide chez l'adulte : études cliniques (GCV = ganciclovir ; NR = non renseigné ; NS = non significatif)

Ref	Nombre de patients	Critère principal	Stratégie de traitement	GCV	Traitement comparatif	p
Boivin 1997	26	Diminution de la charge virale (après 10 jours de traitement)	curatif	p<0,001	-	Etude non comparative
Loginov 2003	20	Positivité charge virale	prophylaxie	14/20 (70%)	-	Etude non comparative
		Maladie	prophylaxie	4/14 (29%)	-	Etude non comparative
Razonable 2003	57	Positivité charge virale	prophylaxie	GCV per os 2/29 (7%)	Placebo 7/29 (24%)	NR
Mattes 2004	48	Négativité de la charge virale	préemptif	GCV pleine dose 17/24 (71%)	GCV 1/2 dose + Foscarnet 1/2 dose 12/24 (50%)	NS
Paya 2004	364	Maladie à 6 mois	prophylaxie	GCV per os 19/125 (15%)	ValGCVr 29/239 (12%)	NS
		Maladie à 12 mois	Prophylaxie	23/125 (18%)	41/239 (17%)	NS
		Charge virale pendant traitement	Prophylaxie	13/125 (10%)	7/239 (3%)	0,001
		Charge virale à 12 mois	Prophylaxie	14/42 (33%)	43/87 (49%)	NS

2.2.9.2.3. En Pédiatrie

Les principales études d'efficacité clinique pédiatriques sont rassemblées dans le tableau VII. Elles concernent la TMO, la transplantation d'organes solides, et l'infection chez le patient immunocompétent.

Les études pour la plupart sont non comparatives car il était éthiquement difficile de ne pas traiter l'ensemble des patients pouvant bénéficier de la thérapeutique (études versus placebo). Une étude comparant la monothérapie GCV à l'association GCV/ACV montre un bénéfice au profit de la monothérapie (Green *et al.*, 1997).

Tableau VII: Traitement « préemptif » par Ganciclovir en pédiatrie: études cliniques. (GCV = ganciclovir ; ACV = aciclovir)

Ref	Nombre caractéristiques patients	et des	Critères d'évaluation de l'efficacité	GCV	Placebo/ autre Traitement	p
Green 1997	48 Transplantés hépatiques		Maladie	GCV IV 2/24 (8%)	GCV IV + ACV per os 7/24 (29%)	0,048
Matthes-Martin 2002	125 Transplantés moelle osseuse	de	Maladie	12/30 (40%)	-	Etude non comparative
			Mortalité	9/30 (30%)	-	Etude non comparative
Avilla 2003	49 Immunocompétents		Négativisation de la charge virale à la fin du traitement	19/30 (63%)	-	Etude non comparative
Patel 2005	108 Transplantés moelle osseuse	de	Maladie	2/41 (5%)	-	Etude non comparative

2.2.10. Toxicité cellulaire

2.2.10.1. Etudes in vitro

La toxicité hématologique représente l'effet indésirable majeur des traitements par GCV. Des études *in vitro* ont évalué cette toxicité. Pour comparer la sensibilité des différents modèles cellulaires, nous aborderons d'abord les études réalisées sur des cellules adhérentes (non hématologiques), puis celles concernant des modèles de cellules hématologiques. Enfin nous aborderons la toxicité recherchée sur les modèles cellulaires transfectés par le gène viral de la thymidine kinase de l'HSV.

2.2.10.1.1. Cellules adhérentes non infectées

Les études de toxicité réalisées avant commercialisation du GCV ont essentiellement porté sur des cellules adhérentes: cellules fibroblastiques (Biron *et al.*, 1985 ; Freitas *et al.*, 1985), cellules HeLa et Vero (St Clair *et al.*, 1984 ; Smee *et al.*, 1985). Ces études ont consisté essentiellement à mettre en évidence la très faible formation de GCVTP dans les cellules non infectées par le CMV ou HSV par rapport aux cellules infectées. Ce ne sont donc pas exactement des études de toxicité même s'il est reconnu que c'est la forme triphosphorylée du GCV qui est responsable (au moins en partie) de sa toxicité.

St Clair *et al.* (1987) ont rapporté des taux indétectables de GCVTP dans les cellules non infectées même à des expositions fortes en GCV (25 mg/L). D'autres auteurs ont montré des taux 100 fois plus importants dans les cellules infectées versus cellules non infectées (Smee *et al.*, 1985).

Biron *et al.* ont observé une quantité équivalente en GCVTP pendant les 48 premières heures puis 10 fois plus dans les cellules infectées, durant une exposition au GCV à 12,5 mg/L. Freitas *et al.* ont eux aussi montré à une concentration en GCV à 2,5mg/L, une concentration en GCVTP 10 fois plus importante dans les cellules infectées/cellules non infectées. Finalement, ces modèles cellulaires semblent peu sensibles à la toxicité du GCV.

De la même manière, l'ACV, de structure voisine ne présente pas de toxicité sur les cellules adhérentes non infectées (St Clair *et al.*, 1980 ; Davidson *et al.*, 1981 ; Furman *et al.*, 1981) avec une phosphorylation limitée dans les cellules non infectées et une affinité faible pour l'ADN polymérase cellulaire comparativement à l'ADN polymérase virale (St Clair *et al.*, 1980).

2.2.10.1.2. Cellules hématologiques non infectées

Les études de toxicité sur cellules hématologiques saines sont rares. Les modèles cellulaires utilisés sont des lignées monocyttaire/macrophagiques, lignées érythrocytaire ou des PBMC (Somadossi *et al.*, 1987 ; Heagy *et al.*, 1991 ; Dornsife *et al.*, 1993).

Somadossi *et al.* ont montré que le GCV a un effet toxique direct et dose dépendant : effet inhibiteur sur les cellules progénitrices myéloïdes et érythrocytaires pour des expositions faibles (0,8 mg/L) en GCV. Ces expositions correspondant aux CI50% efficaces. Heagy *et al.* ont montré une inhibition de l'incorporation de la thymidine dans les PBMC à des concentrations d'exposition proches (1mg/L).

Différentes hypothèses peuvent expliquer cette différence entre toxicité sur cellules « classiques » et hématologiques : une métabolisation enzymatique en GCVTP possible en l'absence des kinases virales spécifiques (1^{ère} phosphorylation du GCV en GCVMP : étape limitante) et en l'absence d'ADN polymérase virale. Cette phosphorylation a été retrouvée sur cellules adhérentes par Biron *et al.* En plus, la rapidité de multiplication des cellules hématologiques par rapport aux autres cellules avec une large fraction des cellules en phase S du cycle cellulaire pourrait augmenter cette phosphorylation (Somadossi *et al.*, 1987 ; Heagy *et al.*, 1991). Enfin une déplétion en nucléotides endogènes provoquée par le GCV pourrait participer à la toxicité (Heagy *et al.*, 1991).

Les études de toxicité sur cellules hématologiques saines sont présentées sur le tableau VIII.

L'ACV ne présente pas de toxicité hématologique *in vitro* aux concentrations « efficaces » (Mc Guffin *et al.*, 1980 ; Parker *et al.*, 1982 ; Tucker *et al.*, 1982). Même si cette différence importante de toxicité entre les 2 molécules n'est pas totalement expliquée, plusieurs hypothèses pourraient être proposées : l'ACV se comporte comme « chain terminator » sur l'ADN (ne comporte qu'un groupement hydroxyle), alors que le GCV s'intercale en provoquant des erreurs de réplication n'entraînant donc pas les mêmes phénomènes toxiques. L'affinité de l'ACV et son passage dans les cellules hématologiques pourraient être

moins marqués que pour le GCV, ou encore la phosphorylation dans des cellules hématologiques non infectées pourrait être limitée.

Le GCV, une fois phosphorylé est éliminé plus lentement de la cellule que l'ACV (Biron *et al.*, 1985 ; Smees *et al.*, 1985) ce qui pourrait aussi expliquer une toxicité plus importante par une activité maintenue dans le temps.

Tableau VIII : Synthèse des principales études de toxicité in vitro du Ganciclovir (GCV) sur les cellules hématologiques non infectées.

ACV=aciclovir, ARV : antirétroviraux, AZT : zidovudine, BFUE=progeniteurs erythroïdes, CFUGM= progeniteurs granulo-macrophagiques, CI=concentration inhibitrice, CMN= cellules mononucléées du sang périphérique, ddC=zalcitabine, ddl=didanosine, MO=moelle osseuse, NR=non renseigné.

REF	Cellules	Molécules	[c] milieu extracellulaire	[c] intracel (produit mesuré)	Protocole d'incubation	Temps de prélèvement et mesures réalisées
Sommadossi 1987	CFU-GM	GCV et AZT	Non détaillé A priori de 0,5 à 10 mg/L (au vu des résultats)	Non mesuré	Incubation pendant 14 jours en continu	Nombre de cellules CFU-GM viables à J14 CI 50% : 0,7 mg/L
Snoeck 1990	CFU-GM	GCV et ARV	0 à 50 mg/L	Non mesuré	Mesure de la CI 50 % sur cellules non infectées	CI 50% : 10 mg/L
Heagy 1991	CMN	GCV et ARV	4 à 400 µM (1 à 100 mg/L)	Non mesuré	NR	Mesure de l'incorporation de la thymidine dans les cellules : diminution sauf avec ACV et ddl
Dornsife 1996	Progéniteurs de la MO	GCV et ARV	Range de [c] non précisé	Non mesuré	NR	GCV CI 50% : 15µM (pour CFUGM) et 39µM (pour BFU-E) Et corrélation toxicité <i>in vitro/in vivo</i> (CI50%/AUC « neutropéniantes »)
Viora 1997	CMN	AZT et ddC	0,1 ; 1 et 10 µM (0.0256, 0.256 à 2.56 mg/L)	Non mesuré	0,1 ; 1 et 10 µM en début de culture	Comptage de cellules viables par cytométrie de flux à 24, 48 et 72 heures. (Exposition aux drogues pendant 24, 48 72 heures sans lavage).
Battiwalla 2007	Lymphocytes T	GCV	0 à 50 mg/L	Non mesuré	NR	Mesure de l'incorporation de la thymidine et de la bromodeoxyuridine Diminution à des concentrations en GCV de 10 mg/L Pas d'induction de l'apoptose des lymphocytes T

2.2.10.1.3. Cellules infectées ou transfectées par HSV-TK (thérapie antitumorale)

La toxicité cellulaire, non souhaitable sur des cellules hématologiques saines est mise à profit pour la thérapie génique des cancers. La thérapeutique consisterait à transférer un gène dans la cellule cancéreuse pour la rendre sensible au médicament substrat du gène transfecté. Depuis quelques années, sont en développement des techniques de transfection de cellules cancéreuses par le gène de la thymine kinase du virus HSV1 (par un rétrovirus ou plasmide) qui permet l'expression par les cellules cancéreuses de cette enzyme. Ensuite, l'ajout du GCV qui est un substrat spécifique de la thymidine kinase (qui permet la première phosphorylation du GCV en GCVMP) permet la destruction des cellules cancéreuses. Une des caractéristiques majeures de ce système est la présence d'un effet dit « bystander » (Hamel et al, 1996 ; Haberkorn et al, 1997 ; Nishihara et al 1997 ; Cho et al, 2004) qui permet la destruction des cellules cancéreuses non transfectées par le gène hsv1-tk mais se trouvant dans le voisinage de cellules qui le sont. On retrouve en effet une quantité beaucoup plus importante de cellules mortes que de cellules transfectées. Plusieurs explications sont possibles pour ce phénomène : le GCV sous sa forme monophosphate pourrait passer d'une cellule à l'autre via les jonctions intercellulaires (« gap-junction » ou connexines) (Hamel et al., 1996 ; Haberkorn et al., 1997 ; Nishihara et al., 1997 ; Cho et al., 2004), la transmission d'un signal apoptotique, des mécanismes immunologiques (accroissement de l'expression des cytokines et infiltration par des cellules présentatrices de l'antigènes et par des lymphocytes T des tumeurs. Des résultats probants de ce type de systèmes ont été obtenus à la fois *in vitro* et *in vivo*. L'efficacité du système hsv1-tk/GCV a été mise en évidence à la fois *in vitro* et *in vivo*, en utilisant plusieurs types de vecteurs de transfection : les rétrovirus ou les plasmides.

Les études de toxicité sur cellules infectées ou transfectées par HSV tk sont rassemblées dans le tableau IX.

Tableau IX : Synthèse des principales études de toxicité in vitro du Ganciclovir sur les cellules infectées ou transfectées par HSV thymidine kinase (Tk).

AraT=aracytine, GCV=ganciclovir, 5FU=5 fluorouracile, ACV=aciclovir, GCVMP=ganciclovir monophosphate, GCVTP=ganciclovir triphosphate, HPLC=high performance liquid chromatography,

Ref	Origine des Cellules	Virus ou gène de transformation	Molécules	[c] milieu extracellulaire	[c] intracel (produit mesuré)	Protocole d'incubation	Temps de prélèvement et mesures réalisées
Marmer 1983	carcinome gastrique infectées	EBV	GCV + 5-FU, cis-platine (inducteurs de phase lytique de l' EBV)	GCV : 40µM (10 mg/L)	Non mesuré	Non détaillé	J8 : comptage cellulaire
	-LM -LM déficientes en TK (LMTK-) -LM + gène de l'HSV-Tk (LH7)	HSV-TK 1 type de cellules (LH7)	GCV et ACV	- 10 mg/L pour détermination du GCVTP - 0 à 50 mg/L pour les mesures de croissance cellulaire - 2,5 mg/L pour l'inhibition de la synthèse d'ADN.	GCVTP - Cellule LM : 0,83 pmol/10 ⁶ cel - Cellule LMTK- : 0,97 pmol/10 ⁶ cel - Cellule LH7 : 53,9 pmol/10 ⁶ cel	- Incubation pendant 7 h (détermination GCVTP) - Ou incubation pendant 76 h	H7 : mesure du GCVTP intracellulaire H67 : mesure du nombre de cellules viables (et à différentes concentrations d'incubation en GCV) H0 à H70 : mesure de l'effet du GCV sur la synthèse d'ADN
St Clair 1987	gliome	Gène de l'HSV-Tk	GCV	GCV : 1µM (2,5 mg/L)	Non mesuré	Incubation pendant 2, 4 et 6 jours	Numération des cellules (bleu de trypan) Analyse cytologique des cellules Apoptose par « bystander effect » à partir de 10 heures d'exposition au GCV
	hépatome	Gène de l'HSV-Tk (vecteur: plasmide)	GCV	GCV : 0,5 ; 5 ou 25 µM (0,13, 1,3 ou 6,4 mg/L)	Non mesuré	Incubation pendant 1, 2, 4, 24, 48 heures et mesure du % de cellules vivantes aux différents temps	Mesure de l'incorporation de la thymidine et numération cellulaire Mesure de l'effet « bystander »

Ref	Origine des Cellules	Virus ou gène de transformation	Molécules	[c] milieu extracellulaire	[c] intracel (produit mesuré)	Protocole d'incubation	Temps de prélèvement et mesures réalisées
Nishihara 1997 Haberkorn 1998 Rubsam 1998	carcinome	Gène de l'HSV-Tk (vecteur: retrovirus)	GCV	GCV : 1 et 30 mg/L	Non mesuré	Incubation pendant 4 jours	Apoptose analysée par microscopie fluorescente: différence significative du % de cellules apoptotiques entre les cellules traitées par GCV et non traitées. Numération des cellules vivantes par comptage (bleu de tryptan) Effet « bystander » pour des cellules cultivées non transfectées (diminution du nombre de cellules vivantes)
	carcinome mammaire	Gène de l'HSV-Tk (vecteur: plasmide)	GCV	GCV : 5 µM (1,3 mg/L)	GCV et GCVMP intracellulaires	Incubation pendant 1, 2, 4, 24, 48 heures	Numération cellulaire : inhibition de la croissance dépendante de l'incorporation en GCV Mesure du GCV intracellulaire et de la fraction GCVMP/GCV par HPLC
	glioblastome humain U251	Gène de l'HSV-Tk (vecteur: retrovirus)	GCV AraT ACV	GCV 0,01 à 1000 µM (0,00256 à 256 mg/L)	GCVTP Pour 0,1 µM et à 24h: 100 pmol/10 ⁷ cel	Incubation pendant 24 heures et mesure du % de cellules vivantes après 24 h Analyse du cycle cellulaire après 24 heures d'incubation avec le GCV après lavage (à 12, 24, 48, 72, 96 et 144 heures)	Mesure de la croissance cellulaire par comptage Analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux Mesure du GCVTP

Ref	Origine des Cellules	Virus ou gène de transformation	Molécules	[c] milieu extracellulaire	[c] intracel (produit mesuré)	Protocole d'incubation	Temps de prélèvement et mesures réalisées
Beltinger 1999	neuroblastome	Gène de l'HSV-Tk (vecteur: retrovirus)	GCV	GCV : 1µM (2,5 mg/L)	Non mesuré	Incubation pendant 24 heures avec GCV	Apoptose. Accumulation de p53 et augmentation de l'expression de CD95 et du récepteur du TNF
Rubsam 1999	glioblastome humain U251	Gène de l'HSV-Tk (vecteur: retrovirus)	GCV	GCV 0,01 à 1000 µM (0,00256 à 256 mg/L)	GCV TP Pour 10 µM et à 24h: 250 pmol/10 ⁶ cel (mesures toutes les 6 heures)	1, 3, et 10µM pendant 24h (non répété) et mesure du GCVTP intracellulaire	Mesure du GCVTP pendant la durée d'incubation avec le GCV (5 mesures en 24 heures) HPLC et détection UV du GCVTP
Tominic 2002	CHO	Gène de l'HSV-Tk (vecteur: retrovirus)	GCV	GCV : 1µM (0,25 mg/L)	NON mesuré	Après transfection exposition au GCV pendant 60 heures	Mesure d'apoptose : arrêt en S et G2/M Diminution du taux de Bcl2 et activation de la capsase 9 par GCV
Cho 2004	neuroblastome	Gène de l'HSV-Tk (vecteur: retrovirus)	GCV	GCV :10 mg/L	Non mesuré	Mélange de cellules transfectées et de cellules non transfectées pour mesure du "bystander effect" du GCV 100% TK 50%TK 10%TK 5%TK 0%TK	Comptage des cellules vivantes (par coloration au bleu tryptan) Si mélange de cellules transfectées et non transfectées, toxicité du GCV sur les cellules non transfectées mais à proximité : diminution du nombre de cellules
Feng 2004	lymphocytes B	EBV	GCV + 5-FU, cis-platine etc....(inducteurs de phase lytique de l' EBV)	GCV : 40 µM (10 mg/L)	Non mesuré	NR	J8 : comptage cellulaire

Ref	Origine des Cellules	Virus ou gène de transformation	Molécules	[c] milieu extracellulaire	[c] intracel (produit mesuré)	Protocole d'incubation	Temps de prélèvement et mesures réalisées
Gentry 2005	U251 glioblastome HeLa	de Gène de l'HSV-Tk (vecteur: rétrovirus)	GCV	GCV : 0,01 à 1000 µM (mg/L)	GCVTP à 24 heures d'incubation (25 mg/L) : 1700 pmol/10 ⁶ cel GCVTP 25 heures après le lavage : 1000 pmol/10 ⁶ cel	Exposition pendant 24 heures puis lavage et culture poursuivie	Numération compteur coulter : diminution du nombre de cellules Analyse du GCVTP par HPLC d'échange d'ions

2.2.10.1.4. Une explication possible de la toxicité du GCV : modalités de la perméabilité et des transports membranaires

Les mécanismes de la perméabilité membranaire et du transport du GCV pourraient aussi avoir un rôle important dans sa toxicité et pourraient expliquer en partie la différence de profil de toxicité entre l'ACV (peu toxique) et le GCV (très toxique). Il a été démontré que le transport du GCV au niveau des hématies (Mahoni *et al.*, 1991) est à la fois médié par les transporteurs des nucléobases (comme pour l'ACV) et de nucléosides (transporteur commun avec la thymidine) : cela pourrait expliquer en partie la différence de toxicité hématologique entre ces 2 molécules. Haberkorn *et al.* ont montré aussi l'implication de transporteurs nucléosidiques (Haberkorn *et al.*, 1997 et 1998) au niveau des cellules de carcinome mammaire. Parallèlement, Majumdar *et al.* ont mis en évidence un transport préférentiellement passif au niveau des cellules de la rétine, malgré la présence de transporteurs de nucléotides et nucléosides (Majumdar *et al.*, 2004).

De plus et comme vu plus haut, un effet « bystander » a été montré sur des cellules tumorales avec le passage du GCV phosphorylé d'une cellule à l'autre par des connexines ou jonctions « gap ». Il semblerait qu'après phosphorylation en métabolite actif dans une cellule infectée par le CMV le GCV puisse passer dans une cellule voisine par effet « bystander » et donc exercer sa toxicité cellulaire sur cette cellule voisine non infectée (Hamel *et al.*, 1996 ; Haberkorn *et al.*, 1997 ; Nishihara *et al.*, 1997 ; Cho *et al.*, 2004,).

Le mécanisme du transport du GCV n'est pas encore totalement élucidé, et comme pour les autres analogues nucléosidiques, plusieurs types de transporteurs sont impliqués (Domin *et al.*, 1993 ; Takeda *et al.*, 2002 ; Mahoni *et al.*, 2005 ; Pastor-Anglada *et al.*, 2005).

En plus de ceux déjà cités, les pompes d'efflux liées au gène MRP4 participent aux phénomènes d'élimination du GCV. En effet, Adachi *et al.* (2002) ont montré qu'une surexpression cellulaire du gène MRP4 conférait une résistance à la toxicité du GCV (lignée cellulaire hématologique transfectée par HSV-Tk)

A notre connaissance, aucune étude concernant la caractérisation des transporteurs du GCV dans les leucocytes et cellules neutrophiles du sang périphérique n'a été publiée à ce jour.

2.2.10.2. Manifestations clinique de la toxicité : Etudes in vivo

Les facteurs de risque principaux de toxicité hématologique au cours des traitements par GCV (chez les patients transplantés) sont essentiellement la durée du traitement, la survenue d'une GVH et les traitements immunosuppresseurs concomitants (Einsele *et al.*, 2000).

D'autres facteurs comme une hyperbilirubinémie durant les 20 jours suivant la greffe, une cellularité médullaire pauvre, et une créatinémie élevée sont également à prendre en compte dans le risque de développer des effets indésirables hématologiques sous GCV (Salzberg *et al.*, 1997).

La toxicité hématologique est retrouvée systématiquement dans les études cliniques. Elle est plus importante dans les TMO que dans les transplantations de cellules de sang de cordon (Tomonari *et al.*, 2004) et peut être reliée au métabolisme plus important retrouvé dans les cellules de moelle osseuse (avec donc une augmentation de la phosphorylation du GCV en GCVTP).

Les effets toxiques du valGCV sont les mêmes que ceux du GCV (Paya *et al.*, 2004 ; Van Heiden *et al.*, 2006 ; Busca *et al.*, 2007 ;)

Les principales études de la toxicité clinique du GCV sont rassemblées sur le tableau X.

Tableau X : Toxicité hématologique du Ganciclovir : études cliniques.

GCV=ganciclovir, ANC= absolut neutrophil count, valGCV=valganciclovir, NE : non évalué, NS : non significatif.

Ref	Nombre de patients	Critères d'évaluation de la toxicité hématologiques	Groupe 1	Groupe 2	Statistiques p
Goodrich 1991	72	Neutropénie (arrêt de traitement)	GCV 11/37 (11%)	Placebo 1/35 (3%)	0,003
Goodrich 1993	64	ANC<750/ μ L (neutropénie)	GCV 10/33 (30%)	Placebo 0/31	0,001
Winston 1993	130	ANC<1000/ μ L (neutropénie)	GCV 24/43 (58%)	Placebo 13/47 (28%)	0,005
Einsele 1995	71	ANC<500/ μ L (neutropénie)	Monitoring PCR 2/37 (5%)	par Monitoring par culture 8/34 (23%)	0,02
		Durée de la neutropénie (ANC<500/ μ L)	1.5 j	5 j	0,04
Salzberg 1997	278	ANC<1000/ μ L	112/278 (40%)	-	Etude non comparative
		ANC<500/ μ L	56/278 (20%)	-	Etude non comparative
		Décès (pendant la neutropénie)	19/278 (7%)	-	Etude non comparative
Ghosh 1999	1 cas	Inclusions intranucleaires type I et II (neutrophiles)	-	-	Etude non comparative
Reddy 1999	55	Neutropénie	6/16 (38%)	-	Etude non comparative
Einsele 2000	57	ANC<1000/ μ L (neutropénie)	7/57 (18%)	-	Etude non comparative
Kennedy 2002	5 cas	Disgranulopoïèse	GCV mycophenolate mofetil 5/5	+ -	Etude non comparative
		ANC<1000/ μ L (neutropénie)	3/5	-	Etude non comparative

Ref	Nombre de patients	Critères d'évaluation de la toxicité hématologiques	Groupe 1	Groupe 2	Statistiques p
Mori 2002	39	ANC<1000/ μ L (neutropénie)	3/30 (10%)	-	Etude non comparative
Vij 2003	58	ANC<1000/ μ L	2/58 (3%)	-	Etude non comparative
		Recours à des facteurs de croissance hématopoïétique	0/58 (0%)	-	Etude non comparative
Paya 2004	364	Leucopénie	GCV per os 9/125 (7%)	ValGCV 36/239 (15%)	NS
		Neutropénie	4/125 (3%)	19/239 (8%)	NS
Tomonari 2004	37	ANC<1000/ μ L (neutropénie)	GCV et transplantation de sang de cordon 9/17 (53%)	GCV et transplantation de MO 18/20 (90%)	0,015
		ANC<500/ μ L (neutropénie)	2/15 (13%)	10/18 (56%)	0,014
		ANC<250/ μ L (neutropénie)	1/15 (7%)	8/18 (44%)	0,014
Taegtmeyer 2005	2 cas	Dysplasie des neutrophiles	2/2	-	Etude non comparative
Ayala 2006	43	Comptage globules blancs	NE	Diminution de 50% à la fin de la cure p=0,07	NE

Ref	Nombre de patients	Critères d'évaluation de la toxicité hématologiques	Groupe 1	Groupe 2	Statistiques p
V Heiden 2006	57	Leucocytes (ratio)	GCV 1,16	valGCV 1,55	NS
		Transfusion de globules rouges	15/37 (41%)	4/20 (20%)	NS
		Transfusion de Plaquettes	6/37 (15%)	3/20 (13,5%)	NS
Busca 2007	15	Neutropénie	ValGCV 6/15 (40%)	-	Etude non comparative

2.2.11. Mesure des concentrations du GCV et de ses métabolites phosphorylés dans les milieux biologiques

2.2.11.1. GCV

De nombreuses méthodes analytiques ont été développées. Le matériel nécessaire et la durée d'analyse sont compatibles avec un suivi thérapeutique (TDM). Le facteur critique est la dégradation du GCV si l'échantillon sanguin est conservé à température ambiante. Donc les prélèvements biologiques en vue du dosage doivent être conservés dans la glace et la préparation de l'échantillon doit être rapide.

Le GCV n'étant qu'un précurseur de la molécule « active » (GCVTP), la concentration mesurée n'est pas toujours un bon reflet de la concentration efficace (qui dépend aussi du site de l'infection) (Scott *et al.*, 2004 ; Greanya *et al.*, 2005). Aussi le dosage de la forme non active de la molécule peut présenter dans certains cas un intérêt limité (site d'infection profond par exemple).

2.2.11.1.1. Méthodes de séparation et de détection

Les méthodes de dosage analytique publiées sont essentiellement basées sur des méthodes de séparation par chromatographie liquide haute performance (Boulieu *et al.*, 1991 ; Campanero *et al.*, 1998 ; Rubsam *et al.*, 1998 et 1999 ; Merodio *et al.*, 2000 ; Xu *et al.*, 2000, Tsuchies *et al.*, 2001 ; Alcorn *et al.*, 2002 ; Kischino *et al.*, 2002 ; Teschima *et al.*, 2003).

Elles diffèrent par le type de colonne de séparation utilisée et la méthode de détection et quantification du signal.

Loregian *et al.* ont réalisé en 2001 la revue des méthodes de séparation de l'ACV et de ses dérivés. Concernant le GCV, les méthodes analytiques faisaient essentiellement appel à des colonnes de chromatographie type RP C18 ou C8. Des conditions de températures ambiantes sont généralement retenues pour l'analyse. La phase mobile est composée essentiellement par un tampon acqueux (pH variant de 2,1 à 6,6). Le débit moyen de la phase mobile varie de 1 à 1,75 ml/min. La détection est essentiellement réalisée par spectrométrie UV ($\lambda = 254\text{nm}$) ou par fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}} = 278\text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 380\text{ nm}$).

Les méthodes les plus récentes utilisent la détection par spectrométrie de masse (Xu *et al.*, 2000 ; Brown *et al.*, 2002), qui présente un intérêt pour les dosages dans des milieux

biologiques complexes et lorsque une très bonne sensibilité est recherchée (détection de quantités faibles).

Pour les colonnes de séparation, les dernières études publiées font part de l'intérêt de l'utilisation de colonnes « HILIC » (hydrophilic interaction liquid chromatography) : ces colonnes présentent un greffage hydrophile sur la silice, ce qui améliore la rétention des composés très polaires (par rapport aux phases inverses classiques qui les retiennent peu et qui nécessitent l'ajout d'un agent ionique dans la phase mobile)

Elles peuvent permettre une optimisation de la séparation des petites molécules polaires (Olsen *et al.*, 2001 ; Brown *et al.*, 2002 ; Naidong *et al.*, 2004 ; Guo *et al.*, 2005) là où les techniques avec les colonnes classiques échouent.

Les principales méthodes de dosage du GCV dans les milieux biologiques sont rassemblées sur le tableau XI.

2.2.11.1.2. Durée d'analyse et sensibilité des méthodes

Selon les conditions de séparation chromatographique retenues (phase mobile, débit, phase stationnaire de la colonne), le GCV est décroché de la colonne de séparation entre 2 et 10 minutes.

Les méthodes permettent une détection de 10 ng/ml avec des volumes de prélèvement variant de 0,250 ml à 1 ml.

Tableau XI : Méthodes analytiques de dosage du ganciclovir (GCV) dans les milieux biologiques.

ACV=aciclovir, ACVMP=aciclovir monophosphate, ACVDP=aciclovir diphosphate, ACVTP=aciclovir triphosphate, AraT=aracytine, GCVMP=ganciclovir monophosphate, GCVDP=ganciclovir diphosphate, GCVTP=ganciclovir triphosphate, HPLC=high performance liquid chromatography, LDD=limite de détection, LDQ=limite de quantification, TEA=triethylamine, Tr=temps de rétention.

Ref	Molécules dosées	Milieu analysé	Méthode utilisée	Résultats et commentaires
Cheng et al 1983	GCV	Cellules Hela	Traitement de l'échantillon : non renseigné <u>HPLC</u> : séparation par échange d'ions sur colonne PARTISIL 10 SAX (Watman) Gradient d'élution, tampon phosphate de potassium (pH 6,6) de 0,03 à 0,15 M	Pas de résultats de validation analytique Standard : GCVMP (Syntex) Standards GCVDP et GCVTP : synthèse de ces dérivés (synthèse enzymatique érythrocytaire à partir du GCVMP et en présence d'ATP) [c]extrac de 5 µM
	GCV, ACV GCVMP GCVDP GCVTP ACVMP ACVDP ACVTP	Cellules Vero	<u>Traitement de l'échantillon</u> : extrait cellulaire non traité (non renseigné) <u>HPLC</u> : séparation sur colonne PARTISIL PXS 10/25 SAX (Whatman) Débit de 1ml /min Phase mobile : KH ₂ PO ₄ (0,01 à 1M) (pH 3,5) avec gradient d'élution linéaire <u>Détection</u> : radioactivité des différentes fractions d'élution <u>Standard</u> : GCVMP et ACVMP (Syntex) Sinon synthèse enzymatique pour GCVDP et GCVTP.	Pas de résultats de validation analytique Tr GCV : GCVMP : 11 min GCVDP : 19 min GCVTP : 32 min ACVMP : 11 min ACVDP: 21min ACVTP : 35 min
Boulieu 1991	GCV	Plasma sanguin	<u>Traitement de l'échantillon</u> : 250 µL de plasma + 25 µl d'acide perchlorique à 35% (précipitation), vortex 1 minute puis centrifugation et injection de 20 µl de surnageant. Pas d'étalon interne. <u>HPLC</u> : séparation sur colonne HYPERSIL ODS (150 mm X 4,6 mm, 3 µm) Phase mobile : Solvant A : tampon phosphate de potassium 0,02 mM pH 3,5. Elution isocratique. <u>Détection</u> UV à 254 nm	Range de concentrations : 1-20mg/L Justesse CV<10% Répétabilité CV<10% LDD : 20 µg/L Tr : 7 minutes

Ref	Molécules dosées	Milieu analysé	Méthode utilisée	Résultats et commentaires
Balzarini et al 1998	GCV, GCMV, GCVDP, GCVTP	Cellules HSVTK+ Cellules HSVTK-	Traitement de l'échantillon Après centrifugation du culot cellulaire, surnageant récolté et : <u>HPLC</u> : colonne partisphère –SAX (Whatman) - Phase mobile : tampon A :5 mM (NH ₄)H ₂ PO ₄ , pH5 tampon B:500 mM (NH ₄)H ₂ PO ₄ , pH 5 - gradient linéaire: 5 min 100% A, 15 min gradient linéaire jusqu'à 10% B, 15 min gradient linéaire jusqu'à 100% B, 10 min 100% B, 5 min de gradient linéaire jusqu'à 100%A et 5 min d'équilibre à 100% A Durée de l'analyse : 55 minutes - <u>Détection</u> de la radioactivité	Pas de validation analytique de la méthode. Tr: GCV: 2-3 min GCMV: 9-10 min GCVDP: 16-17 min GCVTP: 27-28min
Campanero et al 1998	GCV et ACV (Etalon interne)	Plasma sanguin	Traitement de l'échantillon 1ml de plasma + acide trichloroacétique 50 %. Surnageant neutralisé avec NaOH 2 M et purifié avec du chloroforme. 80 µl de la phase aqueuse est injectée. <u>HPLC</u> : <u>séparation sur colonne</u> Hypersil ODS C18 (100 X 4,6, 3 µM) Phase mobile: TEA 0,04M + NaH ₂ PO ₄ 0,1 M (pH 6,6) Débit de 1 ml /min, élution isocratique. <u>Détection</u> UV à 254 nm	Range de concentrations 0,050-10 µg/ml Justesse CV<7% Répétabilité CV<7% LDD: 10 ng/ml
Rubsam et al 1998 et 1999	GCV, ACV, AraT et dérivés P + nucléotides endogènes	Cellules de gliolastome humain	Traitement de l'échantillon : Centrifugation des extraits cellulaires et injection du surnageant. <u>HPLC</u> : séparation par échange d'ions sur colonne Partisphère SAX (250 x 4,6 mm ; 5µm) Gradient linéaire d'élution de 0,15 à 0,60 M (Ph2.8 à Ph3,7) <u>Détection</u> UV : pour chaque nucleotide détection entre 200 et 355 nm. Quantification à 254 et 281 nm	Pas de résultats de validation analytique
Merodio et al 2000	GCV et ACV (Etalon interne)	Nanoparticules d'albumine et échantillons biologiques	<u>HPLC</u> : <u>séparation sur colonne</u> Lichrospher select B C8 (250 X 4, 5 µM) Phase mobile élution isocratique : ACN + 0,05M d'acétate d'ammonium (pH 6,5) (2/98 ; v/v) Détection UV à 254 nm Cf Campanero 1998	Range de concentrations 0,050-10 µg/ml Justesse CV<5% Répétabilité CV<5% LDQ: 50 ng/ml

Ref	Molécules dosées	Milieu analysé	Méthode utilisée	Résultats et commentaires
Xu et al 2000	GCV et ACV (étalon interne)	Plasma sanguin	<u>Traitement de l'échantillon</u> : 50 µL de plasma + 25 µl d'EI; précipitation par 200 µl de méthanol vortex puis centrifugation , surnageant filtré sur filtre microcentrifuge 0,2 µm Costar spin X HPLC ; puis séché sous azote , reprise par 250 µl d'eau et injection de 70 µl HPLC Pré colonne + Colonne ODS-AQ 150 mm X 4,6 mm X 5 µm Phase mobile gradient : Solvant A : 5 mM acétate d'ammonium dans eau/méthanol (95/5) pH non précisé Solvant B : 5 mM acétate d'ammonium dans méthanol pur Débit de 1 ml /min Détection SM : mode positif	Range de concentration: 0,010-10 µg/ml (GCV) Justesse CV<10% Répétabilité CV<7% LDD G: 10 ng/ml Tr: 2,99 (GCV) et 3,36 (ACV)
	GCV et ACV	Plasma sanguin	<u>Traitement de l'échantillon</u> Extraction SPE : 0,250 ml de prise ; + 0,010 ml d'IS ; colonne Oasis (conditionnée avec 1 ml de méthanol et 1 ml d'eau, rincée avec 0, 2 ml d'eau, élués avec 0,750 ml de méthanol 10%). Evaporation sous vide et reprise avec 0,1 ml d'eau. Dérivation avec le fluorescent et injection de 10 µl HPLC Séparation sur colonne Develosil RPAQUEOUS RP (150 X 4,6 , 5 µm) Elution isocratique avec acétonitrile/tampon phosphate 1mM (pH 6.2, 18/82) Débit de 1 ml/min <u>Détection</u> du dérivé fluorescent (GCV + phenylglyoxal) avec spectrofluorimètre	Range 0,020-8,000 µg/ml (GCV et ACV) Justesse CV<8 % Répétabilité CV <5% LDD GCV: 5 ng/ml Tr : GCV : 7,4 min ACV : 10,7 min
Tsuchie 2001				

Ref	Molécules dosées	Milieu analysé	Méthode utilisée	Résultats et commentaires
Alcorn 2002	GCV ACV ZDV	Plasma sanguin et lait	<u>Traitement de l'échantillon</u> : Extraction SPE : 0,250 ml de prise + 0,010 ml d'EI; colonne Oasis (conditionnée avec 1 ml de méthanol et 1 ml d'eau, rincée avec 0,2 ml d'eau, élués avec 0,750 ml de méthanol 10%). Evaporation sous vide et reprise avec 0,1 ml d'eau. Dérivation avec le fluorescent et injection de 10 µl <u>HPLC</u> : séparation sur colonne Lichrosorb 5 RP18, (125 mm X 4 mm). Elution isocratique à 1 ml/min avec 0,5% acétonitrile/ 99,5% 10mM tampon phosphate d'ammonium (pH 6.8). Détection UV à 250 nm	Pas de résultats de validation analytique
Brown S.D. 2002	ACV et GCV (GCV est l'étalon interne)	Plasma et tissu	<u>Traitement de l'échantillon</u> : 50 µL de plasma ou tissu + 150 µl d'ACN (précipitation), vortex puis centrifugation , surnageant évaporé et repris par 50µL de phase mobile et injection de 10 µl. <u>HPLC</u> : Séparation sur colonne Brownlee silica (100 mm X 4,6 mm, 5 µm). Phase mobile: Solvant A : Acétonitrile Solvant B : tampon formate (80/20) pH 3 Débit de 0,7 ml /min et élution isocratique.Détection MS : mode positif.	Pas de résultats de validation analytique pour GCV (étalon interne)
Kischino 2002	GCV ACV	et Plasma sanguin	<u>Traitement de l'échantillon</u> : 0,5 ml de prise (plasma). <u>SPE</u> sur Sep pack C18, puis évaporation et reprise par phase mobile et injection. <u>HPLC</u> : séparation en phase inverse sue colonne ERC-ODS1161 (250mm X 6mm) Colonne chauffée à 55°C Phase mobile : KH ₂ PO ₄ 20 mM Débit : 1ml/min. <u>Détection</u> ampérométrie pulsée	Range de concentrations 0,05-10 µg/ml (GCV) Range de concentrations 0,1 - 20 µg/ml (ACV) Justesse CV<5% Répétabilité CV<7% LDD GCV: 10 ng/ml LDD ACV : 50 ng/ml Tr : GCV : 6,3 min ACV : 8,3 min
Teshima 2003	GCV ACV	et Plasma sanguin	<u>Traitement de l'échantillon</u> : 0,1 ml de plasma et 0,04 ml d'acide perchlorique 6%; vortex 1 min puis centrifugation puis 50 µl injecté <u>HPLC</u> : <u>séparation sur colonne</u> TSK gel ODS-80 Tm (4,6mm X 150 mm, 5µm) avec pré colonne. Phase mobile : Acétonitrile/ tampon phosphate (20 mM, pH 3).Débit de 0,6 ml/min <u>Détection</u> UV à 254 nm	Range de concentrations : 0,063-2,080 µg/ml (GCV et ACV) Justesse CV<5% Répétabilité CV < 7% LDD GCV: 10 ng/ml LDD ACV : 10 ng/ml Tr: GCV : 8,4 min ACV : 10,9 min

2.2.11.2. Nucléotides endogènes et analogues nucléotidiques (métabolites phosphorylés des antirétroviraux) intracellulaires

2.2.11.2.1. Préparation et conservation des cellules

La préparation des cellules en vue du dosage de nucléotides intracellulaire constitue une étape délicate de la préparation de l'échantillon en vue du dosage analytique. Elle doit prévenir la dégradation et la lyse des liaisons pyrophosphate des nucléotides synthétiques et des nucléotides endogènes (par des phosphatases). Les conditions et durée de conservation des cellules avant analyse doivent elles aussi être optimisées de manière à préserver le pool de nucléotides à doser.

Une synthèse bibliographique des méthodes de préparation et conservation des cellules en vue du dosage des nucléotides est présentée dans le tableau XII.

Tableau XII : Préparation et conservation des cellules pour le dosage des nucléotides intracellulaires. ACV=aciclovir, ACVMP=aciclovir monophosphate, ACVDP=aciclovir diphosphate, ACVTP=aciclovir triphosphate, ARV=antirétroviraux, AZTTP=azidothymidine triphosphate, CMN=cellules mononucléées du sang périphérique, GCVMP=ganciclovir monophosphate, GCVDP=ganciclovir diphosphate, GCVTP=ganciclovir triphosphate.

Ref	Cellules	Méthode de lyse cellulaire et conservation avant analyse	Molécule(s) dosée(s)
St Clair 1984	Vero	◇ Extraction acide perchlorique 3,5%, analyse HPLC extemporanée	GCVTP
Biron 1985	HFF (Fibroblastes humain)	◇ Extraction acide perchlorique 0,5M puis neutralisation	GCVTP ACVTP
Freitas 1985	Cellules adhérentes	◇ Extrait sec conservés à -80°C avant analyse ◇ Extraction des nucléotides par acide perchlorique 3,5% 30 min à 4°C ◇ Neutralisation avec 1N KOH	GCVMP, GCVDP, GCVTP et nucléotides endogènes
Smee 1985	Vero	◇ Extraits cellulaires secs conservés à -80°C avant analyse Jour de l'analyse ◇ Précipitation avec acide perchlorique 3,5% pendant 30 min à 4°C puis neutralisation avec KOH	GCVMP, GCVDP, GCVTP ACVMP, ACVDP, ACVTP
Biron 1986	HFF et MRC5	◇ Extraction acide perchlorique 0,5M puis neutralisation	GCVTP, CTP, UTP, ATP, GTP, dCTP, dTTP, dATP, dGTP
Balzarini 1987	L1210 (Cellules leucémie) murin	◇ Lavage Tampon sel phosphate froid ◇ Extraction : acide trichloroacétique 10% ◇ Neutralisé par tri-n-octylamine /freon (1/4)	Analogue nucléotidique et nucléotides endogènes
Bleyzac 1994	Tissu cardiaque	◇ Tissu myocardique congelé dans azote liquide (pour protéger le pool de nucléotides) et conservé à -80°C Jour de l'analyse ◇ Acide perchlorique (precooled in ice water) puis homogénéisation puis centri 15 min à + 4°C (2000g) puis surnageant ajusté à Ph7-8 ◇ Evaporation/concentration (reprise dans phase mobile) et analyse HPLC	GCVMP, GCVDP, GCVTP par méthode indirecte (GCV avant et après digestion par une phosphatase)
Balzarini 1998	FM3 (Cellules carcinome du sein) murin	◇ Centrifugation 200 g ◇ Rinçage 2 fois avec du milieu froid ◇ Extraction au méthanol 66% froid ◇ Centrifugation 3 minutes à 10000 g puis analyse	GCV GCVMP GCVDP GCVTP
Haberkorn 1998	MCF7 (Cellules de carcinome de sein) humain	◇ Rinçage 2 fois avec du PBS froid ◇ Lyse cellulaire avec acide perchlorique 0,5M ◇ Lysat conservé dans la glace pendant 30 minute puis vortexé et centrifugé à 1500g pendant 5 minutes (T ambiante)	GCVMP

Ref	Cellules	Méthode de lyse cellulaire et conservation avant analyse	Molécule(s) dosée(s)
Talarico 1999	MRC5	◇ Lavage PBS froid ◇ Extraction acétonitrile 80% froid ◇ Centrifugation ◇ Evaporation ◇ Analyse (rien sur la conservation avant analyse)	GCVMP GCVDP GCVTP ACVMP ACVDP ACVTP
Moore 2000	CMN	◇ Méthanol froid 60% ◇ Congélation à -80°immédiate ◇ Décongélation et aliquots conservés dans la glace ◇ Température ambiante à partir de l'évaporation	Analogues nucléotidiques (ARV)
Agbaria 2001	MC38 (cancer colon murin)	◇ Cellules lavées avec NaCl 0,9% ◇ Extraction avec Méthanol 60% chauffé pendant 2 min à 95° ◇ Centrifugation et surnageant évaporé et repris dans eau et immédiatement analysé	GCVMP, GCVDP, GCVTP
Fung 2001	CMN	◇ Lavage PBS froid ◇ Extraction acétonitrile 80% froid ◇ Incubation 5 minutes ◇ Centrifugation 10 min 2000 g 4°C ◇ Evaporation ◇ Résidu sec repris par 500 µL d'eau déionisée et congélation jusqu'à analyse	Analogue nucléotidique (ARV)
Pruvost 2001 Beche 2002 a et b	CMN	◇ Cellules lavées avec NaCl 0,9% ◇ Centrifugation puis culot « sec » conservé à - 20°C jusqu'à l'analyse. Jour de l'analyse ◇ Cellules ramenées à + 4 °C, lysées avec tampon tris HCl (0,05M, Ph 7,4)/méthanol 30/70 (v/v) ◇ Vortex et centrifugation 30 minutes (18000 g à +4°C) ◇ Surnageants évaporés et analysés	AZTTP Analogues nucléotidiques (ARV) + nucléotides endogènes
De Bolle 2002	Cellules T molt 3	◇ Lavage 2 fois avec milieu froid ◇ Extraction au méthanol 66% froid ◇ Centrifugation 5 minutes à 23000 g ◇ Puis congélation à -20°C avant analyse	GCVMP GCVDP GCVTP

2.2.11.2.2. Nombre de cellules nécessaire au dosage

Le nombre de cellules doit être suffisant pour détecter les molécules d'intérêt. Cependant un nombre de cellule trop important majore « le bruit de fond » car la matrice cellulaire est un milieu complexe et chargé en molécules endogènes de structure proche des molécules d'intérêt. Le nombre de cellule nécessaire doit donc être choisi pour obtenir un rapport signal/bruit optimal.

D'après la revue bibliographique (cf tableau XIII) le nombre de cellules nécessaire pour le dosage est très variable d'une étude à l'autre et d'un type cellulaire à un autre. Il est donc nécessaire et d'optimiser ce paramètre car l'extrapolation à partir de la littérature semble délicate.

Tableau XIII : Nombre de cellules nécessaires pour le dosage des nucléotides intracellulaires.

ACV=aciclovir, ACVMP=aciclovir monophosphate, ACVDP=aciclovir diphosphate, ACVTP=aciclovir triphosphate, ARV=antirétroviraux, AZTTP=zidovudine triphosphate, CMN=cellules mononuclées du sang périphérique, GCVMP=ganciclovir monophosphate, GCVDP=ganciclovir diphosphate, GCVTP=ganciclovir triphosphate.

Ref	Type de cellules et agent infectieux	Nbre de cellules nécessaires pour analyse des nucléotides	Molécule(s) dosée (s)
Cheng 1984	Cellules HELA HSV	4×10^6	GCVTP et nucléotides endogènes
St Clair 1984	Vero HSV TK	10^6	GCVTP
Biron 1985	MRC5 CMV	10^6	GCVTP ACVTP
Freitas 1985	Cellules adhérentes CMV	2×10^6	GCVMP, GCVDP, GCVTP et nucléotides endogènes
Smee 1985	Vero Infection HSV	2×10^6	GCVMP, GCVDP, GCVTP ACVMP, ACVDP, ACVTP
Biron 1986	MRC5 CMV	10^6	GCVTP, CTP, UTP, ATP, GTP, dCTP, dTTP, dATP, dGTP
Balzarini 1987	L1210 Cellules leucémie (murines)	10^6	Analogues nucléotidiques et nucléotides endogènes
Bleyzac 1994	Tissu cardiaque CMV	Non exprimé en nombre de cellules	GCVMP, GCVDP, GCVTP par méthode indirecte (GCV avant et après digestion par une phosphatase)
Balzarini 1998	FM3 Cellules carcinome du sein HSV TK	5×10^4	GCV GCVMP GCVDP GCVTP
Haberkorn 1998	MCF7 Cellules de carcinome de sein HSV TK	8×10^4	GCVMP
Talarico 1999	Cellules MRC5 CMV	10^6	GCVMP, GCVDP, GCVTP ACVMP, ACVDP, ACVTP
Moore 2000	CMN	500×10^6	Analogues nucléotidiques (ARV)
Agbaria 2001	MC38 cellules cancer colon HSV TK	10^6	GCVMP, GCVDP, GCVTP
Fung 2001	CMN	50×10^6	Analogues nucléotidiques (ARV)
Pruvost 2001 Becher 2002	CMN HSV TK	14×10^6	AZTTP Analogues nucléotidiques (ARV) + nucléotides endogènes
De Bolle 2002	Cellules T molt 3 HHV6	10^7	GCVMP GCVDP GCVTP

2.2.11.2.3. Traitement de l'échantillon, séparation et détection (tableau XIV)

Certaines méthodes font appel à des étapes d'extraction sur phase solide ou SPE ce qui permet de s'affranchir de molécules interférentes de la matrice cellulaire complexe. Elles sont très souvent suivies d'une étape d'évaporation puis de reprise du résidu sec par un volume inférieur au volume de dépôt initial, de manière à concentrer l'échantillon et donc à améliorer la détection du signal. Cependant, le risque est de concentrer également tous les nucléotides endogènes de l'extrait cellulaire avec un rapport signal /bruit difficile à maîtriser. L'extraction SPE représente aussi une étape longue et délicate par rapport à une extraction liquide-liquide simple.

St Claire *et al.* ont montré une disparition totale du signal en HPLC pour un échantillon non extrait (SPE) par rapport à un échantillon extrait. Ils expliquent cette extinction du signal par la présence de molécules ionisées contenues dans le milieu intracellulaire et agissant par compétition en perturbant l'équilibre de la paire d'ions nucleotide-tetrabutylammonium.

Certains ne réalisent pas de traitement particulier avant injection, mais placent une pré colonne en amont de la colonne de séparation de manière à retenir le maximum de molécules interférant avec la (les) molécule(s) d'intérêt. On peut reprocher à ce type de méthodes d'entraîner une usure rapide du système de séparation avec un changement plus fréquent des colonnes de séparation et des contaminations au niveau du détecteur.

La synthèse des principales méthodes de dosage des nucléotides (endogènes ou de synthèse) est présentée tableau XIV.

Tableau XIV : Méthodes de préparation, séparation et détection des analogues nucléotidiques.

ACV=aciclovir, ACVMP=aciclovir monophosphate, ACVDP=aciclovir diphosphate, ACVTP=aciclovir triphosphate, ARV=antirétroviraux, AZT=zidovudine, AZTMP=zidovudine monophosphate, AZTDP=zidovudine diphosphate, AZTTP=zidovudine triphosphate, CMN=cellules mononuclées du sang périphérique, CV=coefficient de variation, DdCTP= dideoxy cytidine triphosphate, d4T= stavudine, d4TMP : stavudine monophosphate, d4TDP=stavudine diphosphate, d4TTP=stavudine triphosphate, FTCTP=emtricitabine triphosphate, GCVMP=ganciclovir monophosphate, GCVDP=ganciclovir diphosphate, GCVTP=ganciclovir triphosphate, HPLC= high performance liquid chromatography, LDD=limite de détection, LDQ=limite de quantification, MS=mass spectrometry ; RIA=radioimmuno assay, Tr= temps de rétention, 3TC=lamivudine, 3TCTP=lamivudine triphosphate, SPE= solid phase extraction.

Ref	Molécules dosées	Milieu analysé	Méthode utilisée	Résultats (LDD, LDQ, reproductibilité, répétabilité, durée d'analyse)
Balzarini 1987	2',3' dideoxycytidine	L1210 (cellules leucémiques)	Extraction des métabolites avec acide trichloroacétique 10% puis centrifugation. Chromatographie d'échange d'ions (colonne Partisil 10 sax) Phase mobile : phosphate d'ammonium avec gradient d'élution. Détection RIA	Pas de validation analytique de la méthode
Slusher 1992	AZT AZTMP AZTDP AZTTP	CMN et Molt 4	Extraction des nucleotides par 3ml de méthanol 60% puis extraits cellulaires secs conservés à – 80°C jusqu'à analyse . HPLC échange d'ions (colonne Partisil 10 SAX) Phase mobile Gradient de tampon phosphate pH 4,6 avec un débit de 0,5 ml/min. Détection RIA	Rendement > 70% Tr AZT = 11 min AZTMP = 44 min AZTDP = 59 min AZTTP = 78 min
Shewach 1994	Difluorode oxycytidine et NTP endogènes	Cellules humaines de carcinome colorectal	Extraction des nucléotides avec acide perchlorique (0.4N) et neutralisation par KOH (10 N) HPLC : échange d'anions sur colonne Partisphère SAX (110 x 4.7 mm ; 5µm) Gradient linéaire d'élution de 0,15 à 0,60 M de tampon phosphate d'ammonium (pH2.8 à pH3.7) Détection UV : pour chaque nucleotide détection à 254, 281, 292 nm. Standards des nucléotides	LDD : 20 pmol Répétabilité CV<20% Justesse CV<20%

Ref	Molécules dosées	Milieu analysé	Méthode utilisée	Résultats (LDD, LDQ, reproductibilité, répétabilité, durée d'analyse)
Peter K 1996	AZT et métabolites P	CMN	<u>Extraction</u> des nucleotides par 3ml de méthanol 60% puis extraits cellulaires secs conservés à – 80°C jusqu'à analyse . Reconstitution des extraits secs dans phase mobile puis injection de 130µl. HPLC Colonne C18 Novapak (phase inverse) 3,9 mm * 300 mm (waters) + précolonne Phase mobile : NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (140 mM) et tetrabutylammonium H₂PO₄ (1M) pH 7,5 et acétonitrile (957,5/7.5/35) Débit 1 ml/min Fractions récupérées en fonction du Tr du composé. <u>Puis SPE cartouches C18</u> pour chaque fraction récupérée après HPLC et après déphosphorylation par une phosphatase : méthode indirecte. Donc la SPE ne se fait pas sur les métabolites phosphorylés Détection RIA	Range de concentrations : 0,3 ng/ml à 8 ng/ml Tr AZTMP = 14,64 min AZT = 20,40 min AZTDP = 25, 83 min AZTTP = 43,76 min Rendement = 93% LDQ = 0,21 ng/ml Répétabilité et reproductibilité : CV<10% Rendement : 90%
Robbins 1996	AZT et dérivés P	CMN	Extraction SPE (échange d'anions) Détection RIA de chaque fraction éluée	Répétabilité CV< 13% pour AZTMP et< 32% pour AZTTP Reproductibilité <20% LDQ : 0,08 pmol/10⁶ cel
Hoggard 1997	Dérives de d4T	P CMN	Extraction des nucléotides avec méthanol 60% puis évaporation et conservation à -20°C. Reconstitution des extraits cellulaires dans phase mobile. HPLC : échange d'anions sur colonne PARTISIL 10 SAX (250 x 4.6 mm) Phase mobile : tampon A :15 mM (NH₄)H₂PO₄, pH3.8/méthanol (7%) tampon B: 480 mM (NH₄)H₂PO₄, pH 3.8/méthanol (7%) Gradient d'élution et débits de 0.75 à 1.5ml/min Durée d'analyse : 45 min Détection de la radioactivité des différentes fractions d'élution. Standards des dérivés P	LDQ pour d4T : 0.02 pmol/10⁶ cel Répétabilité <10% Tr : d4T : 8 min d4TMP : 20 min d4TDP : 24 min d4TTP :36 min

Ref	Molécules dosées	Milieu analysé	Méthode utilisée	Résultats (LDD, LDQ, reproductibilité, répétabilité, durée d'analyse)
Solas 1998	3TC (ARV)	CMN	<u>SPE</u> échange d'anions (SEP PACK VAC) Gradient de KCl: 100 mmol KCl (MP), 120 mmol KCl (DP), 400 mmol KCl (TP) Puis digestion enzymatique sur chaque portion recueillie (non P, MP, DP et TP) Détection UV Validation croisée avec une méthode d'analyse préexistante HPLC RIA	LDQ < 1ng (en quantité déposée sur la colonne) Répétabilité : 0,8 à 18 % Justesse : -14,8 à 19,0%
Moore 2000	3TCTP, AZTTP, d4TTP	cellules hématologiques (globules blancs humains)	Préparation de l'échantillon : SPE échange d'ions puis digestion enzymatique (phosphatases alcalines) sur chaque fraction (mono di et triphosphate) : obtention des formes nucléosidiques des nucléotides d'intérêt HPLC : phase inverse sur colonne C18 pH de la phase mobile non précisé Détection : MS MS : (triple quadrupole) Mesure "indirecte" (mesure des nucléosides)	Range de concentrations : 50-45000 pg. Justesse : CV<11 % Rendement: > 79% LDD: 5, 25, 25 pg LDQ: 5, 25, 25 pg (avec des CV < 15%)
St Claire 2000	DdCTP, FTCTP	CMN	Extraction des nucléotides cellulaires par MeOH puis SPE (paire d'ions) HPLC surcolonne XTERRA RP 18 et XTERRA MS (100 mm X 1 mm, 3,5 µm) Phase mobile: phosphate ammonium 10 mM pH 6,4+ 2 mM TBAH et acétonitrile 15% Débit : 50 µl /min Durée de l'analyse : 10 min Détection MS en mode positif	Range de concentrations : 0,083 à 83 pmol/10 ⁶ cel Répétabilité CV< 3% Justesse CV< 8%
Fung 2001	Ziagen, carbovir mono, di et triP	CMN	HPLC (paire d'ions) Colonne phase inverse : Luna C8, (5 µm), (50 X 2 mm) Phase mobile : 20 mM DMHA (A). méthanol/eau (80/20) (B) à pH 7 Volume injecté : 10 µl Détection par MS en mode positif (tandem MS MS triple quadripôle) Transitions : Ziagen : 287-191, ZIAGEN monoP : 367-191, carbovir MP : 328-152, carbovir DP : 408-152, carbovir TP : 488-152	Range de concentrations : 25 nM à 5 µM LDD : < 25 nM Justesse: <15% Répétabilité: < 10% Tr < 10min pour toutes les molécules dosées

Ref	Molécules dosées	Milieu analysé	Méthode utilisée	Résultats (LDD, LDQ, reproductibilité, répétabilité, durée d'analyse)
Pruvost 2001	Dérivé de la stavudine d4TMP d4TDP d4TTP + dTTP	CMN	Pas de SPE 500 µL de Tris HCl/Methanol (30/70) puis centrifugation et évaporation du surnageant. Injection de 40µL HPLC Colonne SMT-C18 (150 X 2,1 mm, 5 µm) Phase mobile gradient d'élution et débit de 0,3 ml/min tampon A :DMH (10mM) et formate d'ammonium (3mM) Ph11,5 tampon B: DMH (20mM) et formate d'ammonium (6mM)/acétonitrile durée d'analyse : 26 min Détection MS MS : mode ion négatif.	Range de concentrations D4TMP = 300 à 10000 fmol D4TDP = 200 à 1000 fmol D4TTP = 100 à 4000 fmol Justesse CV <10% Répétabilité CV <15% LDD D4TMP = 0,30 pmol/14 X 10 ⁶ cel D4TDP = 0,24 pmol/14 X 10 ⁶ cel D4TTP = 0,14 pmol/14 X 10 ⁶ cel Tr: D4TMP = 4,0 min D4TDP = 9,5 min D4TTP = 12 min DTTP = 10 min
Pruvost 2001	Dérives de la stavudine ou d4T (ARV)	CMN	Lyse cellulaire par tampon tris/MeOH puis injection directe HPLC MS Phase mobile pH 11,5 Détection MS : electrospray en mode négatif Transitions : d4TMP : 303-125, d4TDP : 383-159, d4TTP : 463-159 (159 correspond à 2 groupements phosphates, le dérivé MP ne perd pas le P mais se fragmente au niveau de la base)	LDQ : 138 fmol/7 ml ou 9,8 fmol/10 ⁶ cel Répétabilité et reproductibilité, CV<15% Tr d4TMP = 4,0 min d4TDP = 9,5 min d4TTP = 12 min
Becher 2002	Dérivé de la zidovudine (AZTTP)	CMN	IAE (immunoaffinity extraction et HPLC MS-MS Mesure directe (la déphosphorylation des TP n'est pas nécessaire, pas d'interférence avec les nucléotides endogènes) HPLC/MS : Transition (mode ion negatif) AZTTP : 506-159 (correspond à 2P en mode négatif)	LDQ : 9.3 fmol/10(6) cellules (à partir de 7 ml de sang de patient) Répétabilité et reproductibilité <15 % Justesse : 87 à 112%

Ref	Molécules dosées	Milieu analysé	Méthode utilisée	Résultats (LDD, CV, reproductibilité, répétabilité, durée d'analyse)
Becher et al ,2002	Dérivés triP d'ARV	CMN	Pas de SPE HPLC Colonne Supelcogel ODP-50 Colonne microbore (150 X 0.32 mm) Phase mobile, pH 11,5 à 0,3 ml/min Détection MS MS : mode ion négatif. Transitions (uniquement des dérivés TP) : X-159 (correspond à 2P en mode négatif).	Pas de validation analytique de la méthode Comparaison entre différentes colonnes d'HPLC
Czarnecka 2005	Nucléotides et nucleosides	Liquide cephalo-rachidien	Centrifugation et congélation du surnageant à -80°C Extraction SPE et évaporation. Injection de 20µL. HPLC : séparatino sur colonne Supelcosil LC-18-DB (250 mm x 4 mm) + précolonne ; Phase mobile : tampon phosphate pH 6 élution isocratique à 1 ml/min Détection UV à 260nm.	Range de concentrations : 0 à 500 pmol LDD : 0,1 pmol Tr ATP = 15,3min ADP = 10,6min AMP = 7,3min GTP = 6,3min GDP = 5,7min
Compain 2007	AZT (MP et TP) dTTP d4T	CMN	Extraits cellulaires secs conservés à – 80°C Pas d'extraction SPE Evaporation et reprise échantillon puis injection (40µL) HPLC Colonne Supelcogel ODP 50 5 µm, 50 x 2,1 mm Détection MS en mode négatif	Range de concentrations : 150 à 5000 fmol Tr : AZTMP = 1,5 min dTTP = 5,8 min d4T-TP = 5,9 min AZT-TP = 6, 4 min LDQ AZTMP = 300 fmol dTTP = 299 fmol d4T-TP = 63 fmol AZT-TP = 150 fmol Répétabilité CV < 17% Reproductibilité CV<15% Justesse CV <7% Rendement > 80%

Ref	Molécules dosées	Milieu analysé	Méthode utilisée	Résultats (LDD, LDQ, reproductibilité, répétabilité, durée d'analyse)
Lefebvre 2007	AZTMP AZTTP	Origine cellulaire non renseignée	SPE couplée à HPLC (en ligne) Extrait cellulaire directement injecté sur une précolonne RP (paire d'ions avec phase mobile) et rétention dans la précolonne Puis par augmentation de la force éluante, décrochage des molécules vers la colonne analytique (RP, Symmetry C18 50 mm x 2,1 mm, 3,5 µm) Gradient d'élution linéaire pendant 20 minutes. (débit à 0,3 ml/min) Détection UV à 266 nm	Range de concentrations : 0,5-100µg/ml Tr : AZTMP : 11,3 min AZTTP : 15 min Justesse, CV<10% Répétabilité, CV<12% LDQ : 0,5µg/ml
Lorenzetti 2007	GMP, AMP GMP cyclique et AMP cyclique	thrombocytes	Pas d'extraction SPE HPLC Colonne C18 (100 mm x 2,1 mm, 4 µm) Jones + précolonne Phase mobile : A (eau + acide formique à 10mM) et B (acétonitrile + acide formique 10 Mm) et gradient d'élution avec débit de 0,35 ml/min. Durée d'analyse : 10 minutes Détection MS mode positif	Range de concentrations : 0,25 à 15,0 ng/ml LDQ : 0,25 ng/ml
Vela 2007	Adefovir et dérivés P + dATP	Hep G2	Pas d'extraction SPE Centrifugation du culot cellulaire /évaporation Reprise dans 80 mM de TBAH + 4 mM ammonium phosphate (phase mobile) à 1 x 10 ⁵ cellules/10 µl HPLC : chromatographie paire d'ions sur colonne Xterra MS, C18, 3,5 µm 1 mm * 100 mm (Waters) Et phenomenex Luna C18, 3µm, 1 mm x 100 mm (Phenomenex) Détection MS : mode positif	Justesse, CV <20% Répétabilité, CV <10% LDQ : 25 fmol pour adefovir LDQ : 50 fmol pour dérivés P Tr dATP : 16 min adefovir : 10min adefovir MP: 16 min adefovir DP: 18 min

2.2.11.3. Métabolites mono, di et triphosphorylés du GCV

La synthèse des méthodes analytiques de dosage des dérivés phosphorylés du GCV est présentée dans le tableau XV.

Il est à noter que les auteurs présentent rarement des résultats de la validation des méthodes analytiques.

Les méthodes de détection font le plus souvent appel à la quantification de la radioactivité (Biron *et al.*, 1985 ; Freitas *et al.*, 1985, Smee *et al.*, 1985 ; Okleberry *et al.*, 1997 ; Balzarini *et al.*, 1998 ; Haberkorn *et al.*, 1998 ; De Bolle *et al.*, 2002 ; Kee Bae, 2006)

Certaines passent par la synthèse des dérivés phosphorylés du GCV pour pallier à l'absence de standards commercialisés (Cheng *et al.*, 1983 ; Frank *et al.*, 1984 ; Smee *et al.*, 1985)

La seule publication présentant les résultats de validation analytique est celle de Bleyzac *et al.* (1994), qui quantifie indirectement les dérivés phosphorylés (mono, di et tri phosphate) par ajout d'une phosphatase alcaline ; la validation de la méthode est donc réalisée sur le GCV (après digestion enzymatique des métabolites phosphorylés). Cette méthode même si elle ne quantifie pas le GCVTP (GCVMP, GCVDP et GCVTP ne sont pas discriminés) permet une bonne approche des métabolites actifs en s'affranchissant du problème de disponibilité de standards. Cheng *et al.* avaient utilisé le même type d'approche en 1984 mais la validation analytique n'est pas présentée dans la publication.

La quantification est souvent rapportée à des produits connus comme les nucléotides endogènes ou le GCV (Cheng *et al.*, 1984 ; Bleyzac *et al.*, 1994 ; Van der Eb *et al.*, 2003)

L'échantillon est le plus souvent traité par extraction liquide-liquide avant la séparation par HPLC.

Tableau XV : Méthodes analytiques de dosage des dérivés phosphorylés intracellulaires du ganciclovir (GCV).

ACV=aciclovir, ACVMP=aciclovir monophosphate, ACVDP=aciclovir diphosphate, ACVTP=aciclovir triphosphate, GCVMP=ganciclovir monophosphate, GCVDP=ganciclovir diphosphate, GCVTP=ganciclovir triphosphate, HPLC= high performance liquid chromatography, LDQ=limite de quantification, Tr= temps de rétention, NR=non renseigné.

Ref	Molécules dosées	Milieu analysé	Méthode utilisée	Résultats (validation analytique - concentrations intracellulaires en nucléotides)
Cheng 1983	GCV	Cellules Hela	HPLC échange d'ions Colonne PARTISIL 10 SAX (Watman) Gradient d'élution, tampon phosphate de potassium (pH 6,6) de 0,03 à 0,15 M Colonne C8 , phase mobile acétonitrile, acide acétique 0,03M Colonne de chromatographie DEAE SEPHADEX Qui permet la séparation des nucléotides en fonction du nombre de charges ioniques des groupements phosphate	Standard : GCVMP (Syntex) Standards GCVDP et TP: synthèse de ces dérivés (synthèse enzymatique érythrocytaire à partir du GCVMP et en présence d'ATP) [c]extrac de 5 µM
Cheng 1984	GCV	Cellules Hela	Cf ref de 1979 A priori mesure indirecte après digestion enzymatique (phosphatase)	Concentrations cellulaires en dérivés P : ([c]extrac de 5 µM = 1,275 mg/L) Exposition pendant 6 heures GCVTP : 10 pmol/10 ⁶ cel
St Clair 1984 et 1987	ACV GCV, GCVTP	Cellules Vero	Elution isocratique : KH ₂ PO ₄ (0,55M) pH 3,5 Méthode non détaillée	Standard : GCV triP synthétisé (enzymes) Concentrations intracellulaires : [c]extrac de 50 µM = 12,75 mg/L) exposition pendant 7 h GCVTP: 53,9 pmol/10 ⁶ cel
Frank 1984	GCV, GCVMP, GCVDP, GCVTP nucléotides endogènes		cf Cheng et al.1983	Synthèse enzymatique des dérivés triP

Ref	Molécules dosées	Milieu analysé	Méthode utilisée	Résultats (validation analytique - concentrations intracellulaires en nucléotides)
Biron 1985	GCVMP GCVDP GCVTP	MRC5	Extraction cellulaire à l'acide perchlorique puis évaporation et reprise dans eau. Puis traitement par periodate de sodium pour séparer les ribonucléotides. HPLC : Colonne : Partisil SAX-10 (250 x 4.6 mm) Gradient d'élution linéaire de KH ₂ PO ₄ (de 0,3M à 0,8M)	Pas de résultats de validation analytique
			Détection de la radioactivité	
Freitas 1985	GCVMP GCVDP GCVTP	MRC5	Extraction cellulaire à l'acide perchlorique HPLC : séparation sur colonne PARTISIL PXS 10/25 SAX (Whatman) Phase mobile : KH ₂ PO ₄ (0,01 à 1M) (pH 3.5) avec gradient d'élution linéaire (débit de 1 mL/min) Durée d'analyse : 50 min Détection de la radioactivité des différentes fractions d'élution. cf Smees et al., 1985	Pas de résultats de validation analytique Tr : GCVMP : 11 min GCVDP : 18 min GCVTP : 31 min
Smees 1985	GCV GCVMP GCVDP GCVTP ACV ACVMP ACVDP ACVTP	Cellules Vero	HPLC : colonne PARTISIL PXS 10/25 SAX (Whatman) Débit de 1ml /min Phase mobile : KH ₂ PO ₄ (0,01 à 1M) (pH 3,5) avec gradient d'élution linéaire Détection : radioactivité des différentes fractions d'élution	Standard : GCV monoP et ACV monoP (Syntex) Sinon synthèse enzymatique Temps de rétention GCV : GCVMP : 11 min GCVDP : 19 min GCVTP : 32 min ACVMP : 11 min ACVDP : 21min ACVTP : 35 min Concentrations intracellulaires à 24 heures ([c]extrac de 5µM) GCVMP : 5 pmol/10 ⁶ cel GCVDP : 25 pmol/10 ⁶ cel GCVTP 300 pmol/10 ⁶ cel

Ref	Molécules dosées	Milieu analysé	Méthode utilisée	Résultats (validation analytique - concentrations intracellulaires en nucléotides)
Biron 1986	GCV GCVMP GCVDP GCVTP	MRC5	<u>Extraction</u> cellulaire à l'acide perchlorique puis évaporation et reprise dans eau. Puis traitement par periodate de sodium pour séparer les ribonucleotides. <u>HPLC</u> par échange d'ions. Elution des dérivés DP et TP par HCl 0,1M et élution des MP par méthanol 30%. <u>Détection</u> de la radioactivité	Pas de résultats de validation analytique Tr : GCV : 15 min GCVMP : 33 min GCVDP : 52 min GCVTP : 90 min
Bleyzac 1994	GCVMP GCVDP GCVTP GCV	Cellules myocardiques humaines	<u>HPLC</u> : hypersil ODS 3 µm, 150 x 4,6 mm Phase mobile: dihydrogénophosphate de potassium (pH 3,5, 0,002 M) élution isocratique, débit de 1,5 ml/min <u>Détection</u> UV à 254 nm Méthode indirecte	Recovery : 101 ± 2% LDQ : 2 pmol (correspond à 0,9 pmol/mg Répétabilité : 1% Reproductibilité : 4,4 %
Okleberry 1997	GCVMP GCVDP GCVTP	C1271 (cellules tumeur de sein)	<u>Extraction</u> des nucléotides cellulaires à l'acide perchlorique puis neutralisation et centrifugation. Conservation du surnageant à - 70°C jusqu'à l'analyse. <u>HPLC</u> : séparation par échange d'ions cf Smee et al., 1985 <u>Détection</u> : mesure de la radioactivité par spectrométrie de scintillation liquide	Pas de résultats de validation analytique Tr : GCVMP : 8 min GCVDP : 23 min GCVTP : 39 min Concentrations cellulaires en dérivés P : ([c]extrac en GCV 10 µM) GCVMP : 0,037 pmol/10 ⁶ cel GCVDP : 0,11 pmol/10 ⁶ cel GCVTP : 0,15 pmol/10 ⁶ cel

Ref	Molécules dosées	Milieu analysé	Méthode utilisée	Résultats (validation analytique - concentrations intracellulaires en nucléotides)
Balzarini 1998	GCV GCVMP GCVDP GCVTP	Cellules HSVTK+ Cellules HSVTK-	Après centrifugation du culot cellulaire, surnageant récolté et : <u>HPLC</u> : colonne partisphère –SAX (Whatman) Phase mobile : tampon A :5 mM (NH ₄)H ₂ PO ₄ , pH5 tampon B:500 mM (NH ₄)H ₂ PO ₄ , pH5 gradient linéaire: 5 min 100% A, 15 min gradient linéaire jusqu'à 10% B, 15 min gradient linéaire jusqu'à 100% B, 10 min 100% B, 5 min de gradient linéaire jusqu'à 100%A et 5 min d'équilibre à 100% A : au total 55 min <u>Détection</u> de la radioactivité	Pas de résultats de validation analytique Temps de rétention des composés GCV : 2-3 min GCVMP : 9-10 min GCVDP : 16-17 min GCVTP : 27-28min Concentrations intracellulaires ([c]extrac 1 µM = 0.255 mg/L) GCVTP après 24 heures d'incubation : 143 pmol/10 ⁶ cel dans cel HSVTK+ 5.11 pmol/10 ⁶ cel dans cel HSVTK-
Haberkorn 1998	GCV GCVMP	MCF7 (cellules de carcinome humain)	<u>Extraction</u> des nucléotides cellulaires à l'acide perchlorique puis neutralisation. <u>HPLC</u> : séparation sur colonne Eurospher 80 C8 (250 X 4 mm, 5µm) Phase mobile : tampon NaH ₂ PO ₄ 2 mM (pH 3,6), débit de 1 ml/min. Détection de la radioactivité (scintillation liquide)	Pas de résultats de validation analytique Tr GCV : 11,7 min Concentrations cellulaires en dérivés P : NR
Rubsam 1998 et 1999	GCV ACV ARAT métabolites nucléotides endogènes	Cellules gliolastome humain	<u>HPLC</u> : échange d'ions Colonne : Partisphère SAX (250 x 4,6 mm ; 5µm) (Whatman) Gradient linéaire d'élution de 0,15 à 0,60 M (pH 2,8 à 3,7) <u>Détection</u> UV : pour chaque nucléotide détection entre 200 et 355 nm. Quantification à 254 et 281 nm	Standards pour chaque nucléotide Concentrations intracellulaires: ([c]extrac de 1, 3 et 10 µM = 0,255 mg/L, 0,765 mg/L et 2,55mg/L) Exposition pendant 24 h GCVTP : 400 pmol/10 ⁷ cel

Ref	Molécules dosées	Milieu analysé	Méthode utilisée	Résultats (validation analytique - concentrations intracellulaires en nucléotides)
Agbaria, 2001	GCVTP	Cellules murines	<u>HPLC</u> : échange d'ions <u>Détection</u> UV et radio Colonne : Partisil SAX-10 (250 x 4.6 mm) Gradient d'élution Solution A : tampon 0,02 M phosphate d'ammonium Solution B : tampon 0,7 M phosphate d'ammonium + 10% méthanol	TR GCV : 2,5 min GCVMP : 10 min GCVDP : 19 min GCVTP : 30 min
De Bolle 2002	GCV GCVMP GCVDP GCVTP	Cellules lymphoblastoïdes T	Méthode idem Balzarini 1998 Débit : 2 ml/min avec gradient d'élution de 5 à 300 mM de (NH ₄) H ₂ PO ₄ .	GCVMP : 12 min GCVDP : 19 min GCVTP : 30 min dGMP : 14 min dGDP : 22 min dGTP : 35 min Concentrations intracellulaires: ([c]extrac de 50 µM = 12.7 mg/L) GCVTP : 15 pmol/10 ⁷ cel
Van der Eb 2003	GCV GCVMP GCVDP GCVTP AMP ADP ATP	Cellules hépatiques	<u>Extraction</u> cellulaire à l'acide perchlorique et neutralisation et centrifugation. Surnageant conservé à – 20 °C jusqu'à l'analyse. <u>HPLC</u> : échange d'ions sur colonne Partisphère SAX (125 x 4,6 mm ; 5µm) et précolonne (échange d'ions) Phase mobile : KH ₂ PO ₄ (7,5 à 525 mM) (pH 4,55) avec gradient d'élution linéaire (débit de 1 ml/min). Durée d'analyse : 60 minutes <u>Détection</u> UV : comme pas de standard pour les nucléotides du GCV, comparaison au signal du GCV	Pas de résultats de validation analytique Tr : GCV : > 50 min GCVMP : 13 min GCVDP : 33 min GCVTP : 50 min AMP : 10 min ADP : 32 min ATP : 48 min Concentrations cellulaires en dérivés P : ([c]extrac en GCV non précisée) GCVMP : 2,8 µmol/g protéine GCVDP : 2,3 µmol/g protéine GCVTP : 1,6 µmol/g protéine AMP : 9,5 µmol/g protéine ADP : 5,1 µmol/g protéine ATP : 2,3 µmol/g protéine

Ref	Molécules dosées	Milieu analysé	Méthode utilisée	Résultats (validation analytique - concentrations intracellulaires en nucléotides)
Gentry 2005	GCVTP	Cellules Hela	<u>Extraction</u> des nucléotides et analyse HPLC Méthode non détaillée	Concentrations intracellulaires: ([c]extrac de 100 μ M = 25,5 mg/L) GCVTP : 1700 pmol/10 ⁶ cel après 24 heures d'incubation
Kee Bae 2006	ACV GCV Penciclovir Et dérivés P	Cellules Vero 143B FTK143B	<u>Extraction</u> cellulaire à l'acide perchlorique puis neutralisation et évaporation. Reprise dans un tampon phosphate de potassium 1 M et conservation à - 20°C jusqu'à analyse. <u>HPLC</u> : séparation sur colonne hypersil BDS 4,6 x 25 cm. Phase mobile : Solution A : 5mM tetrabutylamonium bromide dans KH ₂ PO ₄ 20 mM à pH 3,5 Solution B : acétonitrile 60% à pH 3,5. Débit d'élution à 1 ml/min. Durée d'analyse : 60 min <u>Détection</u> : UV et les fractions de 1 ml toutes les minutes sont collectées pour mesure de la radioactivité par spectrométrie de scintillation liquide	Pas de résultats de validation analytique

2.2.11.4. Contraintes liées au milieu de dosage (cellules) et à la détection d'analogues nucléotidiques.

Les nucléotides endogènes sont concentrés dans les cellules et présentent des structures très proches des molécules d'intérêt avec des risques d'interférence importants (Pruvost *et al.*, 2001).

La matrice cellulaire est un milieu beaucoup plus complexe que le plasma et présente une variabilité entre les types cellulaires mais aussi au sein d'une même lignée et rend donc la validation des méthodes délicate.

Ces difficultés seront revues plus spécifiquement dans la partie expérimentale de notre travail.

2.2.11.5. Contraintes liées à la quantification des dérivés nucléotidiques du GCV en l'absence de standards

Contrairement aux analogues nucléotidiques utilisés en thérapie antirétrovirale (VIH), il n'existe pas de standards commercialisés pour les dérivés phosphorylés du GCV ; aussi la quantification est difficile à envisager car il n'est pas possible d'établir une validation analytique à partir de concentrations connues en standards. C'est pour cette raison que certains auteurs ont quantifié indirectement les dérivés phosphorylés du GCV en dosant d'une part le GCV et d'autre part le GCV et ses formes phosphorylés après traitement de l'échantillon par une phosphatase ; par différence il est possible de quantifier la part des dérivés phosphorylés (Bleyzac *et al.*, 1994). Une autre possibilité est de séparer les différentes formes phosphorylées par chromatographie puis de faire agir une phosphatase sur chaque fraction recueillie avant la détection (Vela *et al.*, 2007) par RIA, UV ou spectrométrie de masse.

2.2.11.6. Intérêt de la détection par spectrométrie de masse

La détection par spectrométrie de masse permet un gain en sensibilité et présente donc un intérêt par rapport à des techniques classiques pour la quantification dans le milieu intracellulaire où les concentrations attendues sont faibles.

Elle permet aussi de discriminer et de quantifier des molécules de structures très proches (analogues nucléotidiques de synthèse et nucléotides endogènes), mais présentant des ions parents et/ou des ions fragments différents (Compain *et al.*, 2007) ; alors que ces molécules ne pourraient pas être quantifiées par une méthode HPLC simple (co-élution).

Concernant les dérivés phosphorylés du GCV et en l'absence de standards disponibles, il est très utile d'employer la détection par spectrométrie de masse car connaissant la masse moléculaire de l'ion parent et de l'ion fils après fragmentation, il est possible de détecter le produit et de manière beaucoup plus fiable qu'avec des techniques de détection classique.

2.2.12. Etudes pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du GCV

2.2.12.1. Etudes *in vitro*

2.2.12.1.1. Métabolisme des dérivés phosphorylés

La relation entre la concentration extracellulaire en GCV et la concentration intracellulaire en dérivés phosphorylés a été rapportée par plusieurs auteurs (Smee *et al.*, 1985 ; Okleberry *et al.*, 1997 ; Rubsam *et al.*, 1998). La formation du GCVTP intracellulaire augmente avec des concentrations croissantes en GCV extracellulaire (Figure 9).

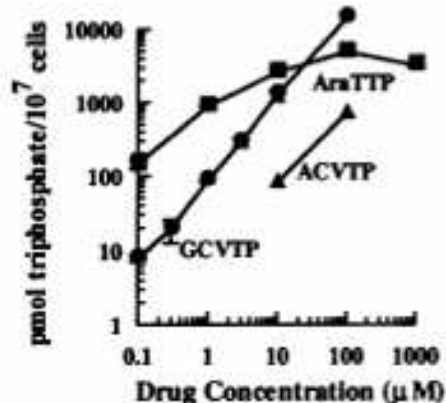


Fig. 4. Accumulation of triphosphates of ganciclovir, araT, and acyclovir. U251tk cells were incubated with tritium-labeled ganciclovir (●) or araT (■) for 4 h or acyclovir (▲) for 24 h. Nucleotides were analyzed by HPLC. Values represent the average of duplicate determinations; bars, SD.

Figure 9 : Ganciclovir (GCV), Aciclovir (ACV) et aracytine (ARAT) : Concentrations intracellulaires des dérivés triphosphatés versus concentrations extracellulaires (Rubsam *et al.*, 1998).

De même, la relation entre la durée d'exposition des cellules au GCV et la formation de GCVTP intracellulaire a été montrée dans plusieurs études sur cellules infectées (Frank *et al.*, 1984 ; Biron *et al.*, 1985 ; Smee *et al.*, 1985 ; Rubsam *et al.*, 1998 ; Gentry *et al.*, 2005). Rubsam *et al.* (1998) ont montré une augmentation du GCVTP dans les premières heures d'exposition au GCV (jusqu'à 12 heures) jusqu'à un état d'équilibre (figure 10). Biron *et al.* (1985) ont montré une augmentation continue pendant 7 jours d'exposition au GCV (et sans atteinte de plateau d'équilibre des concentrations en GCVTP) (figure 11).

Fig. 3. Phosphorylation of ganciclovir and araT. U251tk cells were incubated with [^{3} H]ganciclovir (0.1 μ M; A) or [^{3} H]AraT (1 μ M; B) for 24 h. Nucleotides were extracted with perchloric acid, neutralized, and analyzed by HPLC. Values represent the average of duplicate determinations; bars, SD.

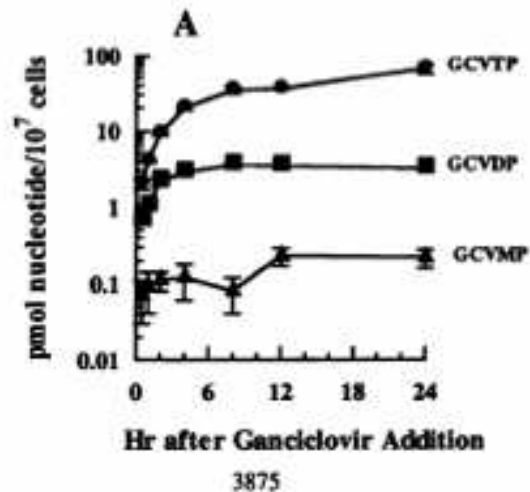


Figure 10 : GCV Profil des concentrations intracellulaires en dérivés phosphatés en fonction de la durée d'incubation en ganciclovir- cellules transfectées (rétrovirus) exprimant le gène de la thymidine kinase de l'HSV (Rubsam *et al.*, 1998).

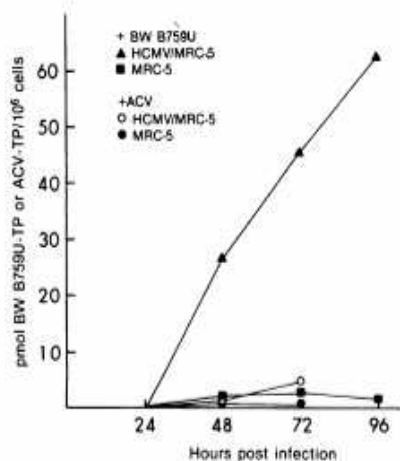


FIG. 1. Formation of BW B759U-triphosphate (BW B759U-TP) or ACV-triphosphate (ACV-TP) in cells infected with HCMV. Human diploid lung fibroblasts (MRC-5) were mock-infected or infected with HCMV strain AD169 at an moi of 0.1 pfu per cell. After 26 hr, 50 μ M [^{14} C]BW B759U (53.5 mCi/mmol) or 100 μ M [^{14} C]ACV (53.8 mCi/mmol) was added and samples were incubated until the indicated time of harvest. Cells were then washed, perchloric acid extracted, and analyzed by HPLC.

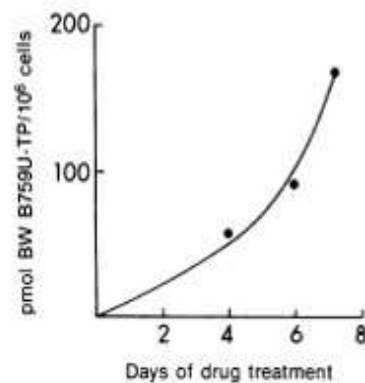


FIG. 3. Phosphorylation of BW B759U in cells infected with a clinical isolate of HCMV. MRC-5 cells were infected with both cell-associated and cell-free virus of the Wade clinical isolate. Radiolabeled BW B759U was added when infected cultures showed cytopathic involvement of 60% of the monolayers. Samples were harvested three times throughout the slow progression of the infection and were analyzed for HPLC. TP, triphosphate.

Figure 11 : Ganciclovir (BWB7559U) et aciclovir (ACV) : Profil des concentrations intracellulaires en dérivés phosphatés en fonction de la durée d'exposition au BWB7559U ou ACV - cellules infectées par le CMV (Biron *et al.*, 1985).

Enfin, la relation entre la durée après arrêt d'exposition au GCV (« wash-out ») et la décroissance du GVTP intracellulaire a été analysée (Biron *et al.*, 1985 et 1986, Rubsam *et al.*, 1997 ; Gentry *et al.*, 2005). L'élimination du GCVTP nécessite 48 heures après arrêt de l'exposition au GCV (figure 12).

Fig. 5. Comparison of GCVTP and araTTP elimination. U251tk cells were treated with [^{3} H]GCV at concentrations of 1 ($\blacksquare$) or 10 μ M ($\bullet$) or [^{3} H]araT at concentrations of 10 ($\blacksquare$) or 100 ($\bullet$) μ M for 4 h. After drug washout, GCVTP and araTTP were extracted from cells and analyzed by HPLC. Values represent the average of duplicate determinations; bars, SD.

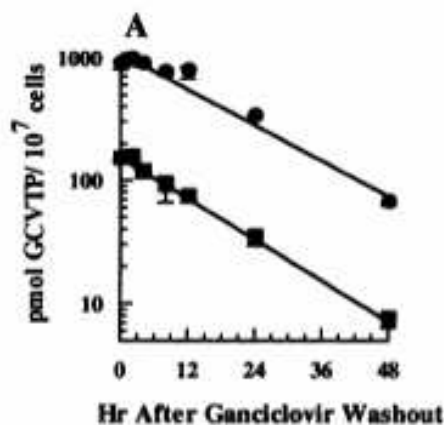


Figure 12 : Décroissance des concentration intracellulaires en ganciclovir triphosphate (GCVTP) après arrêt de l'exposition au ganciclovir (GCV) (Rubsam *et al.*, 1998).

2.2.12.1.2. Inhibition compétitive de l'ADN polymérase virale

L'inhibition compétitive entre GCVTP et dGTP a été modélisée par la courbe de Lineweaver-Burk (Germershausen *et al.*, 1983 ; Frank *et al.*, 1984 ; St Clair *et al.*, 1984). La figure 13 (St Clair *et al.*, 1984) montre qu'il existe une inhibition compétitive entre le GCVTP et le dGTP.

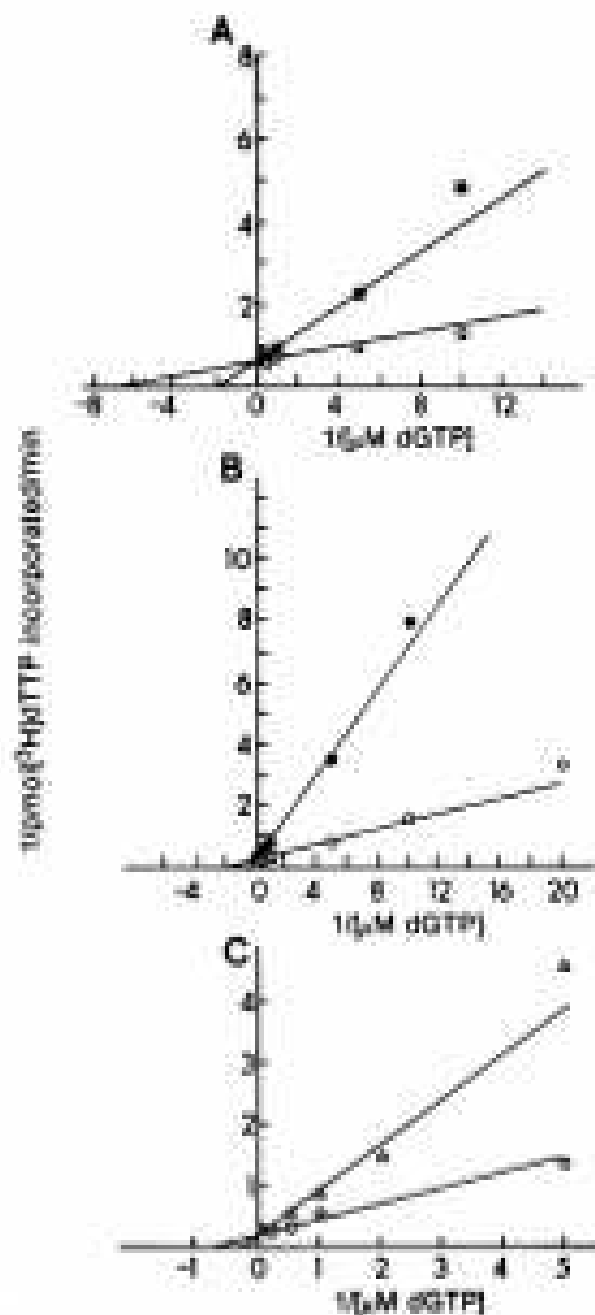


FIG. 1. Lineweaver-Burk plots showing inhibition by BW7559U-triphosphate of (A) HSV-1 (strain KOS) DNA polymerase, (B) HSV-1 (strain FAA7) DNA polymerase, and (C) HeLa S-3 α DNA polymerase. Symbols: $\blacksquare$, $0.16 \mu\text{M}$ BW7559U-triphosphate; $\bullet$, $0.20 \mu\text{M}$ BW7559U-triphosphate; Δ , $4.7 \mu\text{M}$ BW7559U-triphosphate; $\circ$, no BW7559U-triphosphate. DNA polymerase activity was measured by following the incorporation of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$.

Figure 13 : Représentation de Lineweaver-Burk de l'inhibition compétitive du ganciclovir triphosphate (BW7559U triphosphate) sur l'ADN polymérase (St Clair *et al.*, 1984)

2.2.12.1.3. Effet sur la synthèse d'ADN

L'effet du GCV sur la synthèse d'ADN est généralement quantifié par l'effet sur l'incorporation de la thymidine. Plusieurs études ont montré que la diminution de l'incorporation de thymidine était concentration-dépendante (Mar *et al.*, 1983 ; Frank *et al.*, 1984 ; Tocci *et al.*, 1984 ; St Clair *et al.*, 1987 ; Heagy *et al.*, 1991 ; Haberkorn *et al.*, 1997 ; Rubsam *et al.*, 1998).

La relation entre les concentrations en GCV et l'incorporation de la thymidine présentée figure 14 montre une incorporation de thymidine inférieure à 50% pour des concentrations de 0,26 mg/L.

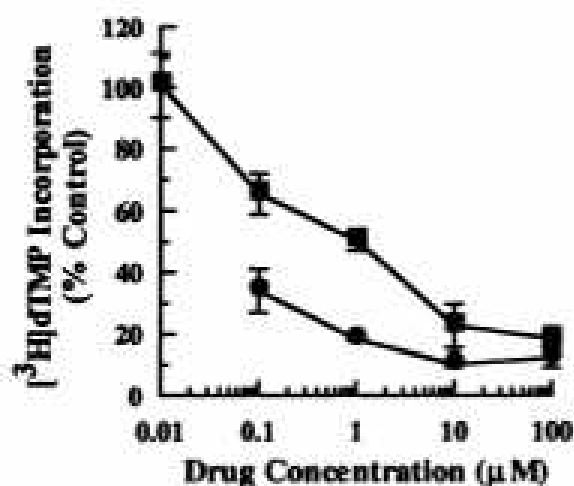


Fig. 8. Effect of ganciclovir and araT on DNA synthesis. U251tk cells were incubated with the indicated concentrations of ganciclovir (■) or araT (●) for 1 h. Each culture was pulsed with [³H]thymidine for the last 10 min of the incubation. Cells were then extracted with perchloric acid, and the amount of tritium in the acid-insoluble material was measured. The [³H]dTTP levels were measured by HPLC to correct for alterations in the specific activity of this nucleotide. Values represent the average of duplicate determinations; bars, SD.

NR77

Figure 14 : Relation entre la diminution de l'incorporation de la thymidine et la concentration extracellulaire en ganciclovir (Rubsam *et al.*, 1998).

2.2.12.1.4. Effet sur la charge virale : CI 50% et relation durée d'exposition/charge virale

La plupart des études *in vitro* ont analysé la CI50% du GCV sur le CMV (Mar *et al.*, 1983 ; Tocci *et al.*, 1984 ; Biron *et al.*, 1985 ; Freitas *et al.*, 1985 ; Duke *et al.*, 1986 ; Manischewitz

et al., 1990). Les études concernant la liaison entre durée d'exposition au GCV (pour une valeur de concentration donnée) et l'évolution de la charge virale sont beaucoup plus rares : Tocci *et al.* (1984) ont présenté les résultats de la CI50% (figure 15) mais aussi de l'impact de la durée d'exposition sur l'évolution de la charge virale (figures 16).

L'inhibition de la réplication virale par le GCV est dose-dépendante, avec une puissance 10 à 100 fois supérieure à celle de l'ACV (figure 16).

Après 5 jours (120 heures) de traitement au GCV des cellules infectées par le CMV, la charge virale est indétectable (figure 16) ; des cellules non traitées ou traitées par l'ACV présentent une diminution de la charge virale pendant les 48 premières heures post-infection puis une augmentation entre 48 heures et 120 heures.

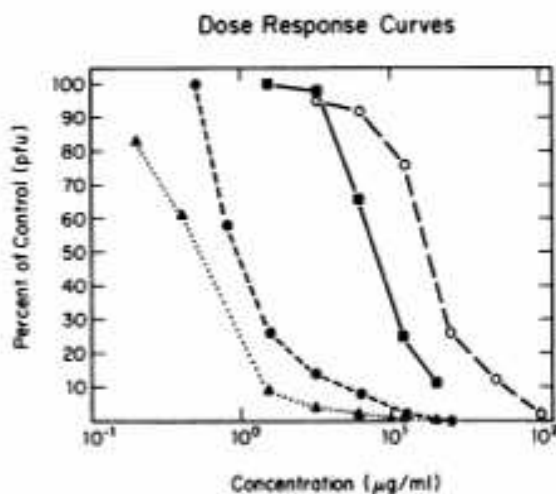


FIG. 1. Dose-response curves of 2'NDG and ACV for human CMV strains AD169 and Eisenhardt. Inhibition of CMV plaque formation on HEL cells was determined by plaque-reduction assay. Cells were infected with ca. 100 PFU of virus and individual cultures maintained in media containing increasing concentrations of either 2'NDG or ACV. The number of CMV plaques found in duplicate drug-treated cultures were counted and compared with control cultures that received no drug treatment, and the number of plaques was expressed as a percent of the control. Symbols: ▲, Eisenhardt strain plus 2'NDG; ●, AD169 strain plus 2'NDG; ■, Eisenhardt strain plus ACV; ○, AD169 strain plus ACV.

Figure 15 : Courbe concentration-réponse de l'aciclovir (ACV) et du ganciclovir (2'NDG) sur la charge virale CMV (Tocci *et al.*, 1984) après 7 jours d'infection et d'exposition au 2'NDG ou ACV.

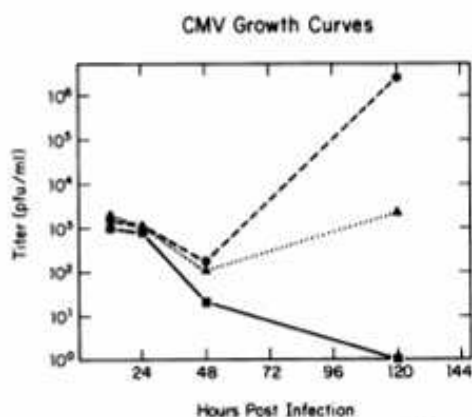


FIG. 5. CMV growth curves. Culture media containing extracellular virus was assayed at various times after infection from 2'NDG-treated HEL cells (10 µg/ml) (■), ACV-treated HEL cells (100 µg/ml) (▲), or control phosphate-buffered saline-treated HEL cells (●).

Figure 16 : Evolution de la charge virale après infection et exposition au GCV (2' NDG) (Tocci *et al.*, 1984).

2.2.12.1.5. Effet sur la toxicité cellulaire : comptage du nombre de cellules vivantes

Les études concentration/effet toxique ont montré la relation entre la concentration en GCV dans le milieu de culture et la diminution du nombre de cellules vivantes: elles ont notamment concerné la toxicité sur des modèles de cellules tumorales transfectées par le gène de la TK de l'HSV (thérapie génique des cancers) (Marmer *et al.*, 1983 ; St Clair *et al.*, 1987 ; Haberkorn *et al.*, 1997 et 1998 ; Rubsam *et al.*, 1997 et 1999 ; Tominic *et al.*, 2002 ; Cho *et al.*, 2004 ; Gentry *et al.*, 2005). La figure 17 montre que plus la concentration est forte plus la toxicité est importante ; en plus la durée d'exposition nécessaire pour atteindre une cytotoxicité maximal (0% de cellules vivantes) est très raccourcie pour de fortes expositions.

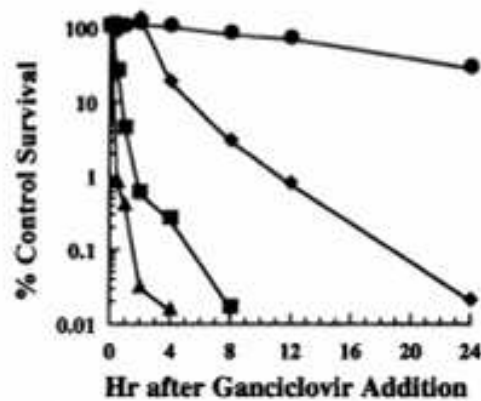


Fig. 2. Effect of length of incubation on cytotoxicity of ganciclovir. U251tk cells were incubated with ganciclovir at concentrations of 0.1 (●), 1.0 (◆), 10 (■), or 100 (▲) μM for the indicated time periods. Survival was determined by a colony formation assay.

Figure 17 : Effet de la concentration en ganciclovir sur la cytotoxicité (Rubsam et al., 1998).

Peu d'études ont été menées sur des cellules hématologiques saines non infectées ; elles ont mis en évidence le lien entre concentration en GCV et diminution du nombre de cellules vivantes (Somadossi et al., 1987 ; Heagy et al., 1991 ; Dornsife et al., 1996). La toxicité est très importante pour le GCV et à des concentrations entre 0,26 et 0, 52 mg/L correspondant aux concentrations efficaces (figure 18)

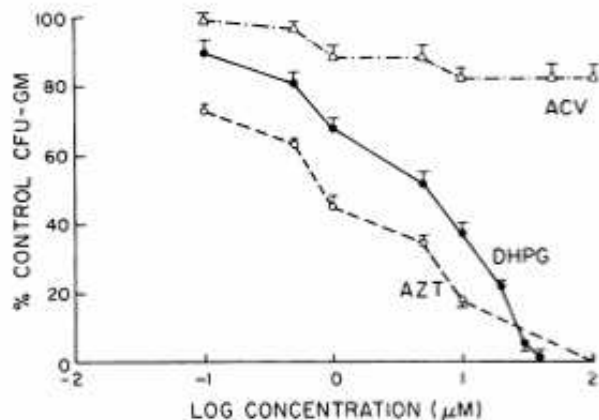


FIG. 1. Effects of continuous exposure (14 days) to increasing concentrations of AZT, DHPG, and acyclovir (ACV) on colony formation of human granulocyte-macrophage precursors grown in soft agar as compared with controls. The plating efficiency was approximately 0.1%. Each point represents the mean $\pm$ standard error of at least six experiments with different marrow donors.

Figure 18 : Effet de la concentration en ganciclovir (DHPG), aciclovir (ACV) et zidovudine (AZT) sur la croissance des cellules hématologiques de la lignée myélocytaire (Somadossi et al., 1987).

2.2.12.2. Etudes pharmacocinétiques et pharmacodynamiques cliniques

2.2.12.2.1. Méthodes de détermination des paramètres pharmacocinétiques

Pour déterminer les paramètres pharmacocinétiques d'un patient, la première solution est de procéder, à partir d'une série de mesures de concentrations plasmatiques à une régression non linéaire en fonction du temps. Outre les problèmes éthiques, pratiques et économiques posés par le nombre important de prélèvements, il existe une incertitude non négligeable sur les paramètres pharmacocinétiques ainsi déterminés car cette méthode ne prend pas en compte l'erreur faite sur la mesure des concentrations. Pour limiter le nombre de prélèvements sanguins, la solution est d'utiliser une information pharmacocinétique recueillie sur un certain nombre de patients proches de celui pour lequel on souhaite déterminer les caractéristiques pharmacocinétiques (population). En combinant l'information provenant de cette population à une information minimale provenant du patient (caractéristiques anthropométriques et/ou biologiques) avec 1 à 3 mesures de concentrations sanguines en médicament, il est possible d'obtenir une estimation de ses propres paramètres pharmacocinétiques (méthode bayésienne) et de calculer ensuite la posologie la plus adaptée pour atteindre des objectifs de concentrations plasmatiques donnés (Jelliffe *et al.*, 1993).

Les méthodes pharmaco-statistiques actuelles permettant de modéliser les paramètres pharmacocinétiques de population utilisent des algorithmes mathématiques (comme l'algorithme NPEM2) et permettent d'estimer les paramètres pharmacocinétiques en une étape, à partir de l'ensemble des données concernant le traitement d'un certain nombre de patients (doses administrées, horaires d'administration, temps de perfusion, concentrations plasmatiques en médicament mesurées, horaires des prélèvements sanguins), en prenant en compte l'erreur analytique. Des relations avec une ou plusieurs caractéristiques des patients (âge, poids, taille, clairance de la créatinine...) sont généralement établies. Une partie de la variabilité interindividuelle est donc expliquée par l'incorporation de ces caractéristiques, appelées covariables ou descripteurs (Jelliffe *et al.*, 1993).

Pour définir avec une précision correcte les paramètres d'un modèle pharmacocinétique monocompartimental, 15 à 20 patients avec deux mesures de concentrations sanguines sont nécessaires. Pour un modèle bicompartimental, le même nombre de patients nécessaires peut être pressenti, mais avec un nombre plus important de mesures de

concentrations sanguines (au minimum autant que de paramètres à estimer, soit 5 pour un modèle à 2 compartiments: la constante d'élimination K_{el} , le volume de distribution central $V_{central}$, le volume de distribution périphérique $V_{périphérique}$, les constantes de transfert K_{cp} et K_{pc}) (Al Banna *et al.*, 1990)

2.2.12.2.2. Pharmacocinétique clinique en transplantation d'organe solide chez l'enfant

Il faut souligner la rareté des publications concernant les études pharmacocinétiques du GCV en pédiatrie. Elles concernent essentiellement la transplantation rénale. Vethamutu *et al.* ont montré une variabilité inter et intra individuelle très importante retrouvée aussi dans l'étude de Zhang *et al.* A noter que malgré un schéma posologique identique, les concentrations résiduelles plasmatiques mesurées sont très différentes entre les 2 études : $0,24 \pm 0,25$ mg/L (Vethamutu *et al.*, 2007) versus $0,84 \pm 0,66$ mg/L (Zhang *et al.*, 2003) pour une administration IV biquotidienne de 5 mg/kg. Même si l'âge des patients varie entre les 2 études ($11,0 \pm 3,9$ ans et $4,5 \pm 3,1$ ans pour Zhang et Vehamuthu respectivement), ces différences importantes sont surprenantes.

2.2.12.2.3. Pharmacocinétique clinique en transplantation de moelle osseuse pédiatrique

A notre connaissance, aucune étude pharmacocinétique spécifique à cette population de patients a été publiée.

2.2.12.2.4. Pharmacocinétique clinique chez le nouveau-né (Infection congénitale)

Trang *et al.* ont montré en 1993 que le GCV par voie intraveineuse présente une pharmacocinétique linéaire (modèle à un compartiment) chez les nouveau-nés. L'étude montre qu'il existe une variabilité interindividuelle très forte du paramètre l'AUC/Dose. La modélisation des paramètres PK par une approche de population (NONMEM) a également été réalisée (Acosta *et al.*, 2007 ; Zhou *et al.*, 1996). Alors que Acosta *et al.*

montrent que la clairance et le volume de distribution du GCV dépendent du poids des patients, Zhou *et al.* montrent le lien entre l'élimination du GCV et la clairance de la créatinine d'une part et entre le volume de distribution et le poids du nouveau-né d'autre part.

Les principales études de pharmacocinétique chez le nouveau né sont rassemblées sur le tableau XVI

Tableau XVI Ganciclovir (GCV) : Etudes pharmacocinétiques cliniques en pédiatrie.

AUC=aire sous la courbe, Cl=clairance C_{max}=concentration plasmatique au pic, C_o=concentration résiduelle, D+=donneur séropositif, F : biodisponibilité, IV=intraveineux, NE=non évalué, NONMEM= non linear mixed effect modeling, R=receveur séronégatif, V=volume, valGCV=valganciclovir.

Ref	Caractéristiques des patients et indication du traitement	Voie d'administration du GCV	Schéma posologique	Nb de patients	Méthode de modélisation	Parametres pk analysés
Zhou 1996	Nouveaux -nés Infection CMV congénitale	IV	4 ou 6 mg/kg en 1 fois/j en perfusion d'1 heure	27	NONMEM	Cl, V
Filler 1998	Transplantation rénale et traitement prophylactique chez R-/D+	ORALE	3 x 1 g/j si poids>50 kg 3 x 750 mg/j si 37.5<poids<50 kg 3 x 500mg/j si 24<poids<37.5 kg	14	Pas de modélisation	
Frenkel 2000	Enfants immunodéprimés HIV1 positifs. Infectés par le CMV	ORALE	10 à 50 mg/kg toutes les 8 heures	36	Non compartimentale	C _{max} , AUC, Cl/F
Zhang 2003	Transplantation rénale	IV puis PO	5 mg/kg par administration 2 perfusions/j puis 50 mg/kg toutes les 12 heures (per os)	11	Non compartimentale	Voie IV : C _o , C _{max} , AUC, CL Voie orale : C _o , C _{max} , AUC, CL/F
Janoly-Dumenil 2006	Post-transplantation de moelle osseuse Infection à HHV6 Cas clinique	IV	Posologie initiale : 5 mg/kg par administration 2 perfusions/j	1 patient – case report	Adaptation bayésienne des posologies avec USCPACK	Paramètres individuels du patient

Ref	Caractéristiques des patients et indication du traitement	Voie d'administration du GCV	Schéma posologique	Nb de patients	Methode de modélisation	Parametres pk analysés
Acosta 2007	Infection congénitale du nouveau-né	ValGCV orale)	(solution IV : 10 mg/kg /j en 2 perfusions Per os : 15 mg/kg/dose A verifier	24 nouveau nés	NONMEM	Cl (l/h) : 0,146 X poids V (l) : 1,15 X poi
Galli 2007	Infection congénitale du nouveau-né	GCV IV valGCVr	IV : 10 mg/kg /j en 2 perfusions Per os : 15 mg/kg/dose 1 ou 2 fois /j	8 nouveaux nés	Mesure des taux exclusivement Détermination de la dose pour avoir une concentration cible optimale	NE
Vethamutu 2007	Transplantation pédiatrique rénale	GCV IV GCV oral ou valGCV	IV : 10 mg/kg /j en 2 perfusions	20 patients (enfants) 57 taux	Mesure des taux exclusivement Détermination de la dose pour avoir une concentration cible à 1mg/L	Administration IV Co=0,2 mg/L Doses moy calculées à 80 mg/kg/j pour obtenir des Co à 1mg/L et 40 mg/kg/j pour obtenir des Co à 0,5mg/L Administration orale (GCV ou valGCV) Co=0,6 mg/L Doses moy calculées à 40 mg/kg/j pour obtenir Co à 0,5 mg/L

- *Relation durée de traitement et efficacité*

Les relations traitement antiviral/décroissance de la charge virale ont été d'abord modélisées pour les virus des hépatites B et C et pour le VIH (Herz *et al.*, 1996 ; Nowak *et al.*, 1996 ; Tsiang *et al.*, 1999 ; Neuman *et al.*, 2000). Un modèle mathématique corrélant la charge virale VIH à la durée de traitement par antiprotéases ou inhibiteurs de transcriptase inverse explique la cinétique d'élimination du virus au cours du traitement : une élimination précoce (première pente d'élimination) qui correspond à l'épuration plasmatique des particules virales libres, alors qu'une élimination plus tardive reflète l'élimination des cellules infectées (Herz *et al.*, 1996). Le même type de modèle a également mis en évidence la clairance bi-phasique des virus de l'hépatite B et C (Tsiang *et al.*, 1999 ; Neuman *et al.*, 2000). La première phase d'élimination est dose dépendante, alors que la seconde phase est fonction de la charge virale initiale (non dose-dépendante). En plus, un modèle mathématique à effet mixte a permis d'expliquer la différence de réponse à l'interféron entre les porteurs du virus de l'hépatite C génotype 2 de ceux porteurs du génotype 1. Le modèle mathématique a mis en évidence des différences significatives de clairance virale, d'effet sur la production virale, soulignant que la variabilité de la dynamique virale en fonction du génotype devait être prise en compte dans le choix des agents antiviraux et dans l'ajustement des schémas posologiques (Neuman *et al.*, 2000). Concernant le CMV, une seule étude a analysé les relations entre le traitement antiviral et la cinétique de déclin du virus : un modèle mathématique mono-exponentiel de déclin de la charge virale en fonction de la durée de traitement par le GCV (figures 19 et 20). Il a permis d'estimer une demi-vie d'élimination du virus d'environ 2 jours (Emery *et al.*, 1999). Si cette hypothèse de déclin mono-exponentiel (pas de phase tardive d'élimination) était vérifiée, il pourrait être intéressant de la prendre en compte pour optimiser la durée du traitement, notamment en la réduisant au strict nécessaire, ce qui permettrait de diminuer la toxicité du GCV. Toutes ces études suggèrent enfin qu'un nombre plus important de données ponctuelles de charge virale (impliquant une fréquence de prélèvements plus élevée) permettrait d'optimiser encore la qualité des modèles mathématiques proposés (Herz *et al.*, 1996 ; Emery *et al.*, 1999).

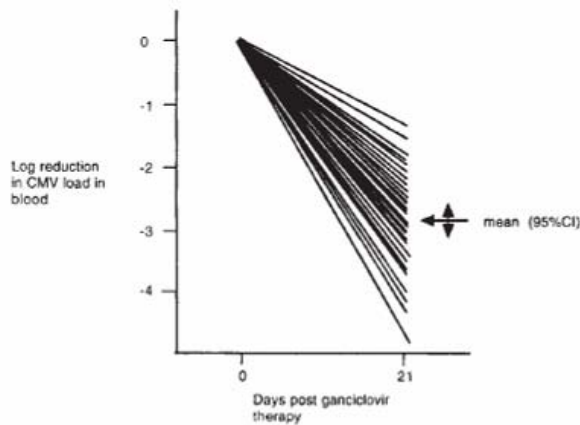


Figure 1. Log reduction in CMV load in the blood of 35 AIDS retinitis patients during 21 d of induction therapy with intravenous GCV (5 mg/kg/bd). CI, confidence interval.

Figure 19 : Réduction de la charge virale à 21 jours après l'initiation de traitement par ganciclovir (GCV) (Emery *et al.*, 1999).

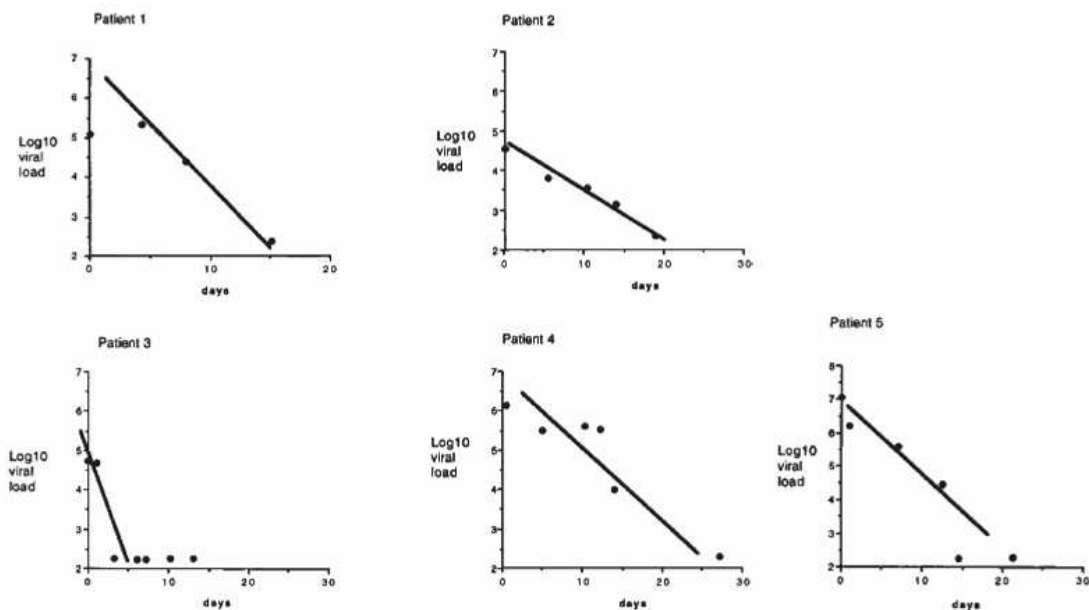


Figure 2. Reduction in CMV load in the blood of five AIDS retinitis patients subjected to intensive sampling after initiation of intravenous GCV therapy. The data points are represented as filled circles, and the computed line of best fit is shown.

Figure 20 Relation entre diminution de charge virale et durée de traitement par ganciclovir (GCV): exemple de 5 patients (Emery *et al.*, 1999)

- Relation concentration efficacité

La relation entre concentrations plasmatiques du GCV et son efficacité (relation PK/PD) n'a jamais été clairement mise en évidence (Scott *et al.*, 2004) (cas des transplantations d'organes solides), ou n'a jamais été étudiée (cas de la transplantation de moelle osseuse pédiatrique). En fait, la plupart des études s'étant intéressées à la relation concentration/effet thérapeutique font état de rapport entre concentrations plasmatiques à

un jour donné et devenir clinique du patient, ou au mieux avec les résultats des PCR/virémies ponctuels. Il existe cependant des valeurs de CI50 (concentration inhibant la moitié des virus présents) *in vitro*. Bien que difficilement extrapolables à la situation clinique, on peut toutefois supposer qu'une certaine quantité de ganciclovir doit arriver en continu dans le virus pour permettre d'obtenir une quantité constante et élevée de GCVTP *in situ* pour maintenir l'inhibition de la réplication, bien que les dérivés phosphatés présentent une demi-vie intracellulaire importante (> 10 heures). La distribution du ganciclovir dans la moelle osseuse pourrait être variable en fonction de la pharmacocinétique individuelle du ganciclovir, mais aussi du type de greffe, et de la dynamique de réplication du cytomégalovirus (Atkinson *et al.*, 1995 ; Tomonari *et al.*, 2004). Les études concernant le suivi du traitement prophylactique ou préventif de l'infection CMV mettent essentiellement en évidence l'intérêt des méthodes PCR, avec une adaptation du traitement antiviral en fonction des résultats, et souvent sans passer par la mesure et l'analyse des concentrations plasmatiques du médicament (Einsele *et al.*, 2000 ; Yun *et al.*, 2000 ; Mori *et al.*, 2002).

Concernant la toxicité, des études ont montré une corrélation entre le traitement par GCV et l'effet sur les cellules sanguines (Einsele *et al.*, 1995 ; Dornsife *et al.*, 1996 ; Salzberger *et al.*, 1997 ; Ghosh *et al.*, 1999 ; Kennedy *et al.*, 2002 ; Tomonari *et al.*, 2004). En revanche, on ne sait rien des relations entre les doses et les schémas d'administration possibles, les concentrations plasmatiques du GCV et son action sur les cellules souches hématopoïétiques, responsable de leucopénie et thrombopénie chez l'enfant transplanté de moelle osseuse.

2.2.13. Suivi thérapeutique du traitement par GCV

2.2.13.1. Contrôle des charges virales

Le contrôle des charges virales (antigénémie ou biologie moléculaire) est un point clef pour l'initiation, le suivi et l'arrêt du traitement par GCV. Il a été montré que l'initiation du traitement dès positivité de ces marqueurs était efficace dans la prévention de la maladie à CMV (Goodrich *et al.*, 1991 ; Schmidt *et al.*, 1991). La comparaison des méthodes par détection de l'antigénémie et des méthodes par amplification de l'ADN (PCR) montre les avantages des techniques PCR (Meijer *et al.*, 2003) en termes de rapidité (2 heures versus 4 heures), et de sensibilité d'analyse (Smith *et al.*, 2007).

Le développement de méthodes rapides et sensibles dans la détection de l'ADN viral (Yun *et al.*, 2002) ou de l'antigénémie a permis de passer de thérapeutiques prophylactiques et destinées à l'ensemble des patients à des stratégies thérapeutiques plus ciblées (sur positivité des marqueurs virologiques) (Einsele *et al.*, 1995). Il reste encore à déterminer clairement un seuil de positivité associé à la survenue de la maladie de manière à traiter spécifiquement les patients à risque.

L'intérêt du suivi de la charge virale est d'adapter les traitements antiviraux pour en augmenter l'efficacité, cependant la corrélation entre TDM par charge virale et incidence de la maladie n'a pas réellement mis en évidence l'intérêt du monitoring (Mori *et al.*, 2002 ; Meijer *et al.*, 2003).

La cinétique de la décroissance de la charge virale en fonction du temps semble être un indicateur précoce de la récurrence de la maladie : Humar *et al.* (2002) ont montré que la récurrence de la maladie est plus fréquente chez les patients présentant une demi vie d'élimination lente du virus (8,8 jours versus 3,17 jours chez les patients sans rechute, $p=0,001$).

2.2.13.2. *Suivi de la réponse cellulaire T CMV spécifique*

Les cellules T CMV spécifiques ont un rôle majeur dans la lutte contre l'infection à CMV. Aussi il apparaît intéressant d'effectuer leur suivi comme marqueur de la réponse au traitement (Boeckh *et al.*, 2003 ; Meijer *et al.*, 2003).

Des études ont montré que plus la durée de déplétion en cellule T CMV spécifiques était longue, plus le risque de développer la maladie était grand (Meijer *et al.*, 2003). La reconstitution cellulaire (cellules T CD4+ et CD8+) est associée à une résolution plus rapide de l'infection à CMV (Hebart *et al.*, 2002).

En plus, une étude a montré que chez les patients présentant l'antigénémie à CMV, seuls ceux présentant une diminution des cellules T cytotoxiques développaient la maladie (Gratama *et al.*, 2001).

Des techniques de mesure de la reconstitution immunitaire (cellules T) de plus en plus précises permettent aujourd'hui un suivi des patients à risque, en complément des mesures classiques de charge virale (Baldanti *et al.*, 2008).

2.2.13.3. *Adaptation des posologies à partir de la mesure des concentrations plasmatiques de GCV*

Les adaptations des posologies peuvent être réalisées de manière « empirique » uniquement au vu des mesures de concentration plasmatiques. Elles peuvent au contraire faire appel à une modélisation mathématique où l'information des concentrations plasmatiques et donc des paramètres PK du patient est associée à l'information sur la population pharmacocinétique à laquelle il est rattaché. Les paramètres de la population pharmacocinétiques peuvent être issus de la littérature ou mieux, être très spécifiques des patients étudiés.

La méthode bayésienne d'adaptation des posologies permet ainsi d'estimer les paramètres pharmacocinétiques d'un sujet, ainsi que la variabilité qui leur est associée en combinant des informations relatives à cet individu à l'information provenant de la « population pharmacocinétique » dont l'individu est issu (Mallet *et al.*, 1990). L'approche bayésienne utilisée pour le suivi thérapeutique repose sur le théorème développé par Thomas Bayes au 18^{ème} siècle, et qui permet à partir de probabilités conditionnelles de calculer la probabilité qu'un fait soit vérifié sachant qu'un autre fait est vrai (Leeman, 1990). Ce théorème, appliqué à la pharmacocinétique, permet d'établir une relation quantitative entre l'estimation d'une probabilité d'un événement avant toute information relative à cet événement (valeur *a priori*), l'obtention d'informations (telles que des concentrations plasmatiques) concernant cet événement et une nouvelle estimation de la probabilité de cet événement en tenant compte de l'information acquise (valeur *a posteriori*).

Pour estimer cette probabilité, la méthode bayésienne utilise un estimateur « MAP » (maximum a posteriori probability) qui prend en compte la différence entre la concentration mesurée et celle prédite par le modèle ainsi que la différence entre les paramètres de l'individu et ceux de la population. Ces valeurs sont respectivement pondérées par l'incertitude sur la mesure (variance de l'erreur analytique) et par la distribution du paramètre au sein de la population (Minto *et al.*, 1998). Cet estimateur est encore appelé fonction objective (FO).

$$FO = (\sum (C_{mes} - C_{est})^2 / SD^2) + (\sum (P_{pop} - P_{est})^2 / SD_{pop}^2)$$

Avec

C_{mes} = concentration mesurée

C_{est} = concentration estimée par le modèle

SD^2 = variance de l'erreur analytique sur les concentrations

P_{pop} = valeur du paramètre de la population a priori

P_{est} = valeur du paramètre estimé par le modèle pour un individu

SD_{pop}^2 = variance du paramètre de population

L'approche bayésienne a pour objectif de déterminer les valeurs des paramètres pharmacocinétiques les plus probables chez un individu et pour lesquels on obtient la valeur la plus faible possible de l'estimateur bayésien. Les valeurs des paramètres pharmacocinétiques permettent ensuite de prédire les concentrations plasmatiques futures chez un patient donné ou d'autres valeurs cible si besoin comme une aire sous la courbe.

2.2.13.3.2. Suivi thérapeutique controversé en transplantation adulte

L'intérêt du suivi thérapeutique des concentrations plasmatiques du GCV reste controversé dans l'optimisation des traitements par GCV.

Plusieurs arguments sont avancés pour préciser cette position : d'abord, la relation entre concentrations plasmatiques et effets thérapeutiques ou toxiques (concentration/effet) n'a jamais été clairement mise en évidence chez l'adulte, d'où la difficulté de préconiser des concentrations plasmatiques cibles pour le suivi thérapeutique (Scott *et al.*, 2004 ; Greanya *et al.*, 2005). Ensuite, la molécule dosée dans le cadre du suivi thérapeutique n'est pas la molécule pharmacologiquement active (donc biais). En plus, la pharmacocinétique du GCV est relativement bien connue avec une élimination essentiellement rénale et des adaptations en fonction de l'état rénal (clairance de la créatinine) sont relativement simples à réaliser (Scott *et al.*, 2004 ; Greanya *et al.*, 2005). Enfin, il existe d'autres moyens qui semblent plus fiables aux auteurs, comme l'ajustement du traitement en fonction des résultats des PCR virales, l'évolution des manifestations cliniques de la maladie et enfin la surveillance de la formule sanguine pour prévenir la toxicité hématologique (Scott *et al.*, 2004 ; Greanya *et al.*, 2005).

Pour ces raisons, le suivi thérapeutique à partir des concentrations plasmatiques du GCV n'apparaît pas justifié aux auteurs.

Au contraire, Yuen *et al.* dans une étude pharmacocinétique (modélisation NONMEM) montrent des variations importantes de la clairance rénale du GCV en fonction des populations de patients étudiés (HIV séropositifs atteints de rétinite à CMV, HIV séropositifs infectés asymptomatiques, transplantés d'organes solides). Ils préconiseraient plutôt chez ce type de patient un suivi thérapeutique étroit.

2.2.13.3.3. Suivi thérapeutique controversé en pédiatrie

Malgré le peu d'études pharmacocinétiques retrouvées en pédiatrie, Scott *et al.* pensent que comme en transplantation d'organe solide chez l'adulte, le suivi thérapeutique des concentrations plasmatiques n'a pas d'intérêt chez l'enfant. En plus des raisons communes à celles évoquées chez l'adulte, les auteurs précisent que des études ont montré une très bonne corrélation entre les doses ajustées au poids et l'AUC des concentrations plasmatiques en fonction du temps, rendant inutile le suivi des concentrations plasmatiques. Cependant, Vethamutu *et al.* montrent dans une étude pharmacocinétique récente (2007) chez 20 enfants transplantés rénaux une variabilité inter et intra individuelle importante et « inattendue » des concentrations plasmatiques de GCV, indépendamment de la dose administrée. Ils soulignent l'intérêt du suivi thérapeutique chez cette population particulière de patients, malgré l'absence de définition claire des concentrations plasmatiques cibles à obtenir pour une efficacité maximale et toxicité minimale du traitement. En l'absence d'AMM pédiatrique, les posologies utilisées sont classiquement celles de l'adulte rapportées au poids de l'enfant. Or, chez l'enfant, l'efficacité et la toxicité d'un schéma thérapeutique d'adulte peut être très variable du fait des variations de la pharmacocinétique liées au changement progressif de la répartition de l'eau corporelle, de la maturation de la fonction rénale et du processus de croissance continue (Eksborg *et al.*, 2003).

2.2.13.3.4. Intérêt du suivi thérapeutique en pédiatrie: 2 Cas rapportés

Dans certains cas (échec de traitement malgré des posologies présumées « efficaces », toxicité importante), il peut être utile de mesurer les concentrations plasmatiques en GCV. Elles peuvent aider à la mise en évidence de résistance au traitement (concentrations plasmatiques élevées sans réponse thérapeutique), ou peuvent permettre d'objectiver un sous dosage à posologies « efficaces ».

Deux cas publiés sont présentés ici : le premier (cas rapporté n°1) concerne un suivi thérapeutique réalisé grâce au suivi de la charge virale (PCR) et à la mesure des concentrations plasmatiques en GCV. Il montre l'intérêt du suivi thérapeutique par les concentrations plasmatiques et l'adaptation bayésienne des posologies (logiciel USC PACK)

dans la réussite du traitement. Il a été rapporté par notre équipe et publié dans Bone Marrow Transplantation en 2006 (Janoly-Dumenil, *et al.*, 2006). Le deuxième cas (cas rapporté n°2) concerne une toxicité neurologique majeure imputable au valGCV chez un enfant présentant une fonction rénale altérée, toxicité objectivée par la mesure de concentrations plasmatiques hautes de GCV ayant conduit à une adaptation des posologies.

Cas rapporté n°1 : Infection à Herpes virus 6 (HHV6) en transplantation de moelle osseuse pédiatrique traitée avec succès par GCV « haute dose ». (Janoly-Dumenil *et al.*, 2006).

CE, garçon de 7 ans, a été hospitalisé en onco-hématologie pour TMO en décembre 2004. Le patient était séropositif pour HHV6 avant la greffe. L'évolution favorable en période post TMO immédiate a permis la sortie du patient à J30. Il a été réhospitalisé à J50 pour état fébrile. Un traitement par GCV (10 mg/kg/j en 2 perfusions d'1 heure) a été instauré dès les résultats de PCR indiquant une méningite à HHV6 (ADN viral retrouvé dans le LCR). Le dosage plasmatique (HPLC) du GCV et l'adaptation bayésienne des posologies (USCPACK[®]) ont été réalisés à la pharmacie ; les concentrations plasmatiques de GCV résiduelles (GCVcp) à atteindre ayant été définies avec les cliniciens (1-2 µg/ml) et selon les résultats des PCR, l'évolution clinique, et les mesures quotidiennes de créatinémie du patient.

Une première GCVcp infra-thérapeutique est mesurée 4 jours après initialisation du traitement. Après adaptation bayésienne des posologies, les doses sont augmentées à 18 mg/kg/j puis à 24 mg/kg/j pour atteindre une GCVcp à 1,1 µg/ml. Un passage à 3 perfusions de 2 heures est alors préconisé pour maintenir des concentrations plasmatiques de GCV au pic <15 µg/ml. La fièvre et les signes centraux régressent en quelques jours sous ce schéma posologique « haute dose » (avec négativation des PCR) ; aucun effet indésirable n'a été lié au traitement.

Ce schéma thérapeutique « haute-dose » montre les limites de la transposition de posologies standard adultes de GCV (10 mg/kg/j) chez l'enfant et l'intérêt d'un suivi thérapeutique étroit dans la réussite du traitement.

Cas rapporté n°2 : Neurotoxicité liée au valGCV chez un enfant présentant une insuffisance rénale : utilité du TDM (Peyrière *et al.*, 2006)

Un garçon de 13 ans présentant une leucémie aigüe lymphoblastique était traité pour une rétinite à CMV par valGCV 450 mg tous les 2 jours (en post TMO). Les traitements concomitants étaient l'omeprazole, le furosémide et le paracétamol. Lorsque la clairance de la créatine a chuté à 20 ml/min, l'enfant a présenté des signes de neurotoxicité sévère (confusion mentale et hallucinations), qui ont disparu à l'arrêt de l'ensemble des traitements.

Le TDM du valGCV a montré des concentrations élevées dans le sang et dans le LCR (3,85 mg/L et 2,6 mg/L respectivement) 48 heures après la dernière prise. Après résolution de la toxicité neurologique, des doses plus faibles de valGCV ont été proposées (225 mg 2 fois par semaine) avec suivi thérapeutique et ce nouveau schéma posologique a été bien toléré par le patient. Par contre, l'infection par CMV a persisté malgré le traitement. Une rechute de la leucémie et une insuffisance rénale terminale ont conduit au décès du patient. Le score d'imputabilité de Naranjo (pharmacovigilance) a objectivé un lien entre la neurotoxicité et le traitement par valGCV.

L'ACV, valGCV et oméprazole ont tous les 3 été rapportés pour induire une neurotoxicité, avec une pharmacocinétique altérée par l'insuffisance rénale pour ACV et GCV. Les manifestations neurologiques étaient présentes dès l'administration d'ACV et les concentrations en GCV ont été élevées durant les manifestations neurotoxiques. Aussi, ces effets indésirables ont été liés à un surdosage en valGCV et majorés par l'administration concomitante d'ACV.

2.3. Lignée lymphoblastoïde

2.3.1. Historique

La première lignée lymphoblastoïde a été établie spontanément à partir de cellules sanguines (Paul J. *et al.*, 1958 ; Benyesh-Melnick *et al.*, 1963), et en 1964 à partir du lymphome de Burkitt (Epstein M.A. *et al.*, 1964). Le groupe d'Epstein a mis en évidence en 1964, dans plusieurs lignées, un virus du groupe Herpes, l'Epstein-Barr (EBV).

En 1967, des lignées lymphoblastoïdes ont également été établies à partir de lymphocytes sanguins de malades atteints de mononucléose infectieuse (Pope J.H. 1967) ou de sujet cliniquement sains ayant le plus souvent des anticorps anti-EBV. Enfin des lignées ont été établies à partir de sujets n'ayant pas été antérieurement en contact avec l'EBV, par une technique de « co-culture » associant à la culture de lymphocytes sanguins, des cellules tuées (par irradiation à des doses létales ou par congélation-décongélation) provenant de lignées EBV-positives. L'agent transformant a été identifié comme étant l'EBV par Pope *et al.* (Pope J.H. *et al.*, 1968) qui parviennent à établir des lignées lymphoblastoïdes en utilisant un filtrat acellulaire de lignée EBV positive et productrice de virus.

Jusqu'au début des années 80, toutes les techniques mises au point utilisaient des virus d'origine humaine dont la production présentait des difficultés liées à la disponibilité en sang de malades ou de sujets porteurs sains. D'où l'intérêt d'essayer d'obtenir des souches d'EBV animales pour transformer les lymphocytes humains. L'infection était retrouvée chez les primates avec un virus EBV de structure proche du virus EBV humain.

Parmi les lignées lymphoblastoïdes de primates qui sont établies par infection virale (le virus EBV) et utilisées comme source de production de virus EBV, la plus importante est celle établie par (Miller G *et al.*, 1973) dénommée B₉₅₋₈.

Dorénavant, les différents travaux consistent essentiellement à améliorer la maîtrise de la transformation des cellules : d'abord en réduisant l'interférence de l'immunité à long terme médiée par les lymphocytes T qui diminue le nombre de cellules transformées (Neitzel H., 1986). Ensuite, en modifiant la technique de façon à rendre l'immortalisation efficace sur une faible quantité de sang total.

2.3.2. Lymphocytes B, cible de l'EBV

La majorité des lignées lymphoblastoïdes, spontanément établies à partir de tissus ou de sang ou obtenues par transformation par l'EBV *in vitro* ont des marqueurs de surface de lymphocytes B : immunoglobulines de surface, récepteurs du complément et récepteurs Fc. De plus, les récepteurs de l'EBV ont été mis en évidence uniquement à la surface des lymphocytes B. (Jondal *et al.*, 1973). Les lymphocytes de primates non humains sont également susceptibles d'être infectés ou transformés par l'EBV ou par des virus appartenant au groupe des Gammaherpesvirinae. Les lymphocytes de poulet peuvent être transformés par le virus de la maladie de Marek (Zur Hausen *et al.*, 1975).

Les lymphocytes B sont les cibles sélectives de l'EBV en raison de la présence de récepteurs spécifiques membranaires pour l'EBV ; cependant il n'est pas exclu que d'autres types cellulaires puissent être transformés par l'EBV si le génome viral parvient à pénétrer dans la cellule.

2.3.3. Virus Epstein-Barr ou EBV

L'EBV est un virus à ADN. Contrairement aux autres virus herpes, l'EBV ne se multiplie pas dans les systèmes cellulaires habituellement utilisés, fibroblastes et cellules épithéliales, mais uniquement dans les lymphocytes B qui possèdent un récepteur spécifique du virus. Dans les cellules lymphoïdes, le virus peut provoquer 3 types d'infections :

- Infection productive et lytique : les lymphocytes ou les cellules lymphoblastoïdes dans lesquels la réplication virale est complète, produisent des virions qui sont libérés, tandis que la cellule productrice est détruite.
- Infection latente : quelques lymphocytes dans l'organisme (au cours de la mononuclease infectieuse ou chez des sujets séro-positifs) contiennent des génomes de l'EBV et expriment l'antigène très précoce LYDMA mais le cycle de réplication est bloqué à une étape très précoce. Le blocage de la réplication virale est levé lorsque les lymphocytes sont cultivés *in vitro* (Champsaur *et al.*, 1980).
- Infection et transformation : le phénomène de transformation induit une multiplication cellulaire illimitée *in vitro* et donc une immortalisation de la lignée. Dans les cellules transformées, provenant des lymphocytes normaux transformés *in vitro*, ou des cellules de lymphomes de Burkitt ou d'adénocarcinomes du rhino-pharynx, sont constamment mis en évidence plusieurs exemplaires du génome viral.

2.3.4. Méthode d'obtention des lignées lymphoblastoïdes

Les différentes étapes pour aboutir à la lignée lymphoblastoïde sont les suivantes : préparation du virus et titration, préparation des cellules cibles, et infection des cellules cibles par le virus (nous y reviendrons dans la partie méthode du travail expérimental).

Une partie seulement des lymphocytes B circulants (environ 1%) sont immortalisés par l'EBV (Sugden *et al.*, 1977), le reste de lymphocytes B est plutôt immortalisé en lymphocytes B activés (Aman *et al.*, 1984). Les lymphocytes B immortalisés par l'EBV sont au départ polyclonaux avec sécrétion d'immunoglobulines de différentes classes. Après culture prolongée, Les lignées deviennent oligo voir monoclonales (Nilsson *et al.*, 1982). Les lignées cellulaires immortalisées par l'EBV sont infectées de manière latente par l'EBV et produisent très peu de particules virales infectieuses.

La titration du virus EBV avant infection est un paramètre critique et doit être vérifié pour éviter des infections massives avec production de particules virales. La ciclosporine A est ajoutée dans le milieu de culture de manière à inhiber la prolifération des lymphocytes T (qui risquent d'inhiber la croissance des lymphocytes B).

La croissance des lymphocytes B est favorisée par les cellules monocytaires et des facteurs de croissances sécrétés par les cellules B infectées par l'EBV (Gordon *et al.*, 1984). Aussi il faut conserver les cellules monocytaires dans le milieu de culture et les cellules ne doivent pas être lavées après infection de manière à conserver le virus dans le milieu extracellulaire. La préparation du virus nécessite 3 jours. La préparation des cellules mononuclées pour l'immortalisation nécessite 2 heures ; et l'infection virale prend 2 heures. Finalement, la génération de la lignée cellulaire immortalisée est réalisée en 3 à 5 semaines au total.

2.3.5. Propriétés des cellules transformées

La taille moyenne des cellules lymphoblastoïdes est de 12 à 13 μm . Leur morphologie est voisine des lymphoblastes B stimulés par des mitogènes. Par contre, les cellules transformées présentent en plus des villi (ou prolongement de la membrane cytoplasmique), le pus souvent de localisation polaire asymétrique et visualisés en microscopie (Wang *et al.*, 1975). Ces « villi » confèrent à ces cellules une flexibilité et une mobilité notables. La membrane plasmique est hérissée de prolongements, diverticules qui donnent à ces cellules un aspect « chevelu ».

Les celules lymphoblastoïdes poussent en suspension et ont tendance à se rassembler en amas de taille importante (ou clusters).

2.3.6. Caractéristiques et avantage de ce modèle cellulaire de culture

Le principe de l'immortalisation est d'obtenir un matériel biologique en grande quantité. Mello *et al.* (2006) ont recensé les avantages à établir des lignées lymphoblastoïdes, en comparaison avec l'établissement de lignées de fibroblastes. L'obtention de prélèvements est plus aisée dans la plupart des cas (la biopsie cutanée constitue une contrainte organisationnelle car elle nécessite la présence d'un membre du corps médical autorisé au prélèvement). De plus, la variation cytogénétique est moins décelable, la prolifération cellulaire est plus rapide, les cellules voient leur espérance de vie s'accroître, la production de matériel biologique est plus massive, les lignées sont plus faciles à conserver congelées, et à remettre en culture.

2.3.7. Infection des cellules lymphoblastoïdes par le CMV

L'infection par le CMV des cellules lymphoblastoïdes a été décrite dans quelques études ; la synthèse est présentée dans le tableau XVII. Les travaux rapportés montrent une variabilité importante de la dose virale infectieuse de départ choisie : elle varie de 1 pfu/cel (St Jeor *et al.*, 1977) à 10 pfu/cel (Tocci *et al.*, 1979). Le temps de contact entre le virus et les cellules lymphoblastoïdes est de 2 heures, il est suivi d'un lavage des cellules de manière à éliminer les virus n'ayant pas pénétré l'intérieur des cellules (Tocci *et al.*, 1979).

Tableau XVII Méthodes d'infection « in vitro » de cellules lymphoblastoïdes par le cytomegalovirus

Pfu=plaque forming unit, NR=non renseigné.

Ref	Dose infectieuse	Temps de contact	de Lavage
St Jeor 1977	1 pfu/cel	NR	NR
Tocci 1979	10 pfu/cel dans milieu cellulaire concentré (10^7 cel /ml)	2 heures	3 rinçages successifs puis remise en suspension à 10^6 cel/ml
Sun 1999	Pas d'infection réelle : transfection par un rétrovirus recombinant pour expression du gène du CMV pp65		
Sun 2000	Pas d'infection réelle : transfection par un rétrovirus recombinant pour expression du gène du CMV pp65		

L'infection est plus ou moins effective : on retrouve une réelle multiplication virale (Tocci et al, 1979) et maintenue sur plusieurs jours ou alors une infection persistente mais non répliquative (St Jeor *et al.*, 1977).

2.3.8. Effet de l'EBV sur l'activation du GCV en GCVTP

Il est reconnu que l'EBV est capable *in vivo* d'induire la phosphorylation du GCV en GCVMP. Le modèle *in vitro* ne doit pas avoir cette propriété sinon il ne peut être retenu pour l'étude du métabolisme du GCV dans des cellules infectées ou non infectées par le CMV (phosphorylation possible par EBV et CMV avec impossibilité de faire la part de la phosphorylation due au CMV)

La bibliographie montre que seul l'EBV dans une phase lytique peut induire la phosphorylation du GCV. Dans les lignées lymphoblastoïdes produites « *in vitro* », le virus est dans une phase quiescente donc ne peut pas théoriquement agir sur le GCV (pas d'expression de kinases ou phosphotransférases virale) (Mentzer *et al.*, 2001).

Des études sur la sensibilité de lymphomes EBV positifs au GCV ont montré la nécessité d'utiliser des molécules anticancéreuses « activatrices » de la phase lytique du virus pour permettre au GCV d'exercer sa cytotoxicité (Mentzer *et al.*, 2001 ; Moore *et al.*, 2001 ; Feng *et al.*, 2002 et 2004). Ces molécules « activatrices » (cis platine, 5 fluoro uracile, taxol...) ont la propriété de permettre le passage de la phase quiescente à la phase lytique du virus (avec induction de l'expression des thymidine kinase nécessaires à la phosphorylation du GCV).

3. Travaux expérimentaux

Nos travaux regroupent un ensemble d'études préalables à un projet d'étude clinique randomisée multicentrique qui comparera le schéma thérapeutique standard au schéma thérapeutique retenu à partir de nos résultats.

3.1. Objectifs de l'étude

L'objectif du travail est de déterminer l'influence de l'intensité et de la durée d'exposition au GCV sur l'activité antivirale et la toxicité cellulaire à partir d'une étude *in vitro* sur cultures cellulaires lymphoblastoïdes infectées et non infectées par le CMV. Le but est d'étudier la relation entre l'exposition des cellules au GCV et la charge virale (efficacité), le nombre et la viabilité des cellules (toxicité) et enfin la concentration intracellulaire en dérivés triphosphate du GCV.

Les résultats de cette étude seront dans un deuxième temps intégrés dans un modèle mathématique à partir duquel un schéma thérapeutique optimal sera déterminé : simulation de l'effet obtenu (activité antivirale et toxicité cellulaire) par l'application de doses données de ganciclovir sur de courtes séquences répétées (détermination de la dose, de la durée d'administration et de la périodicité de cette durée) pour pouvoir déterminer la meilleure dose/durée pour une efficacité maximale et une toxicité cellulaire minimale

Les perspectives de ce projet sont de proposer une étude randomisée multicentrique nationale pour comparer le schéma classique d'administration du GCV (5 mg/kg/12 h pendant 15 jours puis 5 mg/kg/24h pendant 21 jours) avec le schéma thérapeutique déterminé d'après l'étude *in vitro*.

3.2. Matériel

3.2.1. Virologie

3.2.1.1. Souche de virus CMV AD169

3.2.1.2. Cellules MRC5

Les cellules MRC5 sont des cellules embryonnaires de poumon de fœtus humain. Elles sont fournies par les laboratoires Biomérieux, Marcy L'Etoile, France.

3.2.1.3. Milieu de culture

- Milieu MEM (LONZA; Verviers, Belgique).
- Sérum de veau fœtal 2% (LONZA; Verviers, Belgique).
- Milieu Hepes (Jacques Boy; Reims, France).
- Antibiotiques à ajouter dans le milieu MEM : Pénicilline/streptomycine (LONZA; Verviers, Belgique) et néomycine (SIGMA ALDRICH, Steinheim, Allemagne)
- L-Glutamine (LONZA; Verviers, Belgique).
- Acides aminés (LONZA; Verviers, Belgique).

3.2.1.4. Réactifs pour trypsination des cellules

- Tampon phosphate : NaCl (8g) (VWR INTERNATIONAL, Fontenay sous Bois, France), KCl (0,4 g) (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italie), Na₂HPO₄·2H₂O (0,06 g) (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italie), qsp eau distillée 1 L.
- Solution Versène : EDTA (0,2 g) (SIGMA ALDRICH, Steinheim, Allemagne), NaCl (8 g), KCl (0,2g), Na₂HPO₄, 2H₂O solution.
- Trypsine (EUROBIO, Les Ulis, France).

3.2.1.5. Extraction et préparation de l'ADN pour quantification PCR

- Le kit d'extraction de l'ADN
«High Pure Viral Nucleic Acid Kit®» (ref 1858874) est fourni par Roche Diagnostics, (Mannheim, Germany). Le contenu du Kit est présenté Figure 21 (notice Roche, version Juillet 2005).

Vial/Cap	Label	Contents / Function
1 green	Binding Buffer	• 2 x 25 ml • [6 M guanidine-HCl, 10 mM Tris-HCl, 20% Triton® X-100 (w/v), pH 4.4 (25°C)].
2	Poly(A)	• Lyophilizate • 2 mg poly(A) carrier RNA • For binding of RNA
3 pink	Proteinase K	• Lyophilizate • 100 mg • For the digestion of proteins
4a black	Inhibitor Removal Buffer	• 33 ml, add 20 ml absolute ethanol • [5 M guanidine-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6 (25°C) final concentration after addition of ethanol]
4 blue	Wash Buffer	• 2 x 10 ml add 40 ml ethanol p.a each • [20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5 (25°C) final concentrations after addition of ethanol]
5 colorless	Elution Buffer	• 30 ml • Nuclease-free, sterile, double distilled water
6	High Pure Filter Tubes	Two bags with 50 polypropylene tubes with two layers of glass fiber fleece, for use of up to 700 µl sample volume.
7	Collection Tubes	Eight bags with 50 polypropylene tubes (2 ml).

Figure 21 : Réactifs contenus dans le kit «High Pure Viral Nucleic Acid Kit®» (Roche Diagnostics).

- Les amorces d'ADN, (Eurogentec ;Seraim, Belgique)

Les kits de réactifs pour PCR "TaqMan PCR core reagent Kit®" (ref N8080228) sont fournis par Applied Biosystems (Courtaboeuf, France). Le Kit comprend: AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (250 unités), 100 Units AmpErase® UNG (100 unités), dUTP, dATP, dCTP, dGTP, 10X TaqMan® Buffer A (10X), solution de MgCl₂ (25 mM).

3.2.1.6. Appareil de mesure de la charge virale (PCR)

L'appareil 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) a été utilisé pour l'analyse des réactions en chaîne par polymérase (PCR) quantitatives en temps réel.

3.2.2. Biotechnologies cellulaires : culture des cellules lymphoblastoïdes

3.2.2.1. Cellules lymphoblastoïdes

Elles sont obtenues à partir de prélèvement sanguin et par séparation des lymphocytes (cf paragraphe 3.3.1.3 ou **ANNEXE 3**)

3.2.2.2. Milieu de culture

- Milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 medium (Eurobio; Courtaboeuf, France).
- Sérum de veau fœtal (Perbio Science; Bezons, France).
- Milieu Phosphate buffered saline ou PBS (Jacques Boy; Reims, France).
- Antibiotiques à ajouter dans le milieu RPMI 1640 :

Pénicilline/streptomycine (10000 U/mL) (Bio Whittaker Europe; Cambrex ; Verviers, Belgium)

Amphotéricine B (Bristol Myers Squibb ; Rueil Malmaison, France),

- Cyclosporine A (Sigma; Steinheim, Germany)

La procédure décrivant les modalités de préparation des milieux utilisés en cultures cellulaires est décrite en **ANNEXE 1**.

3.2.2.3. Ganciclovir

- Laboratoires Roche (Neuilly sur Seine, France).

3.2.2.4. Compteur de cellules Beckman Coulter Z2

Le compteur Beckman Coulter Z2 (Beckman Coulter, Roissy, France) est un compteur automatique, monobloc, basé sur le principe Coulter (détection volumétrique par mesure de variation de résistance)

Il donne un comptage absolu et représentatif mais ne permet pas de discriminer finement les cellules vivantes des cellules mortes.

Le volume de prélèvement nécessaire pour l'analyse est de 200 µl (avec une dilution au 1/20 dans solution Isoton[®])

3.2.2.5. Compteur automatique et analyse de la viabilité cellulaire : ADAM (Advanced Detection Accurate Measurement), Labtech – France)

Le principe de l'analyse repose sur de la microscopie optique couplée à la détection de la fluorescence d'échantillons marqués au iodure de propidium. Les échantillons sont marqués par le colorant (iodure de propidium, intercalant de l'ADN) puis les images sont réalisées par la caméra. Les images enregistrées sont ensuite traitées et le nombre de cellules ainsi que la viabilité sont calculés.

Les figures 22 et 23 expliquent le principe de la mesure.

Le colorant + solution de lyse des membranes cellulaires : permet le comptage du nombre total de cellules : vivantes + non vivantes.

Le colorant seul permet le comptage des cellules mortes exclusivement (car la membrane des cellules vivantes empêche le colorant de pénétrer dans la cellule et donc de marquer le noyau cellulaire).

Par différence on obtient le nombre de cellules vivantes (total – mort) et donc la viabilité des cellules (en %). Le volume de prélèvement nécessaire pour l'analyse est 2 fois 20 µl par échantillon à analyser.

Staining for Cell Counting and Viability

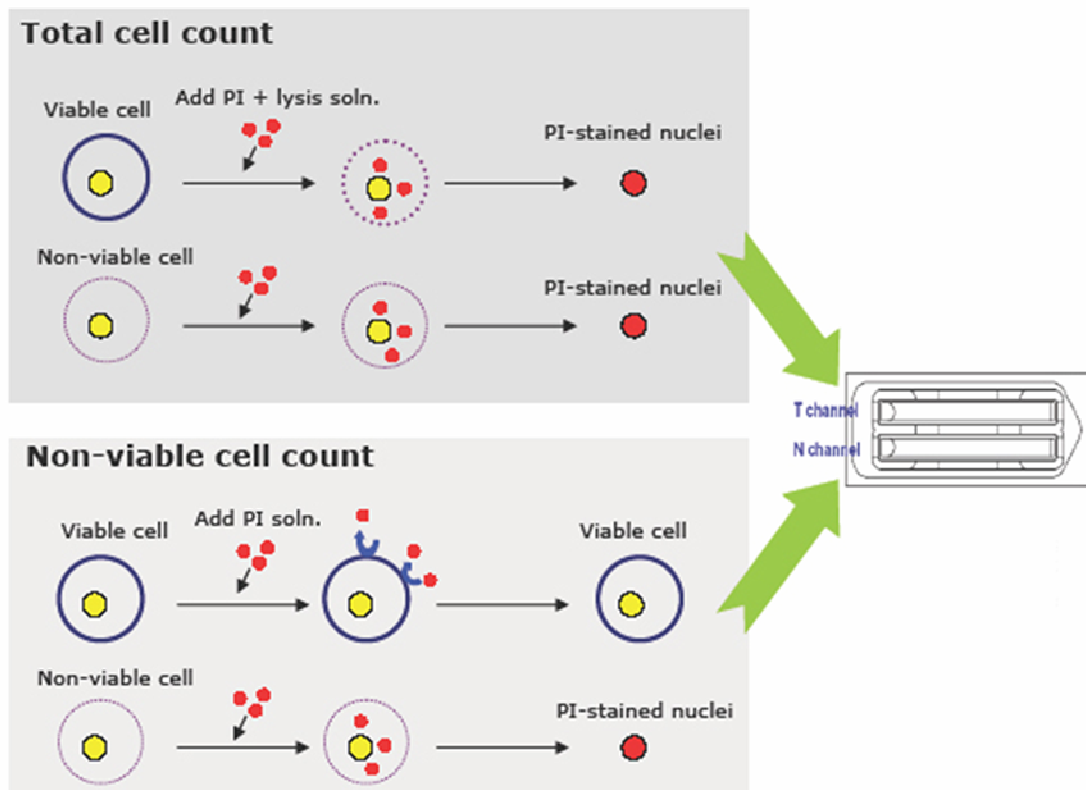


Figure 22 : ADAM (advanced detection accurate measurement) : principe de l'analyse.

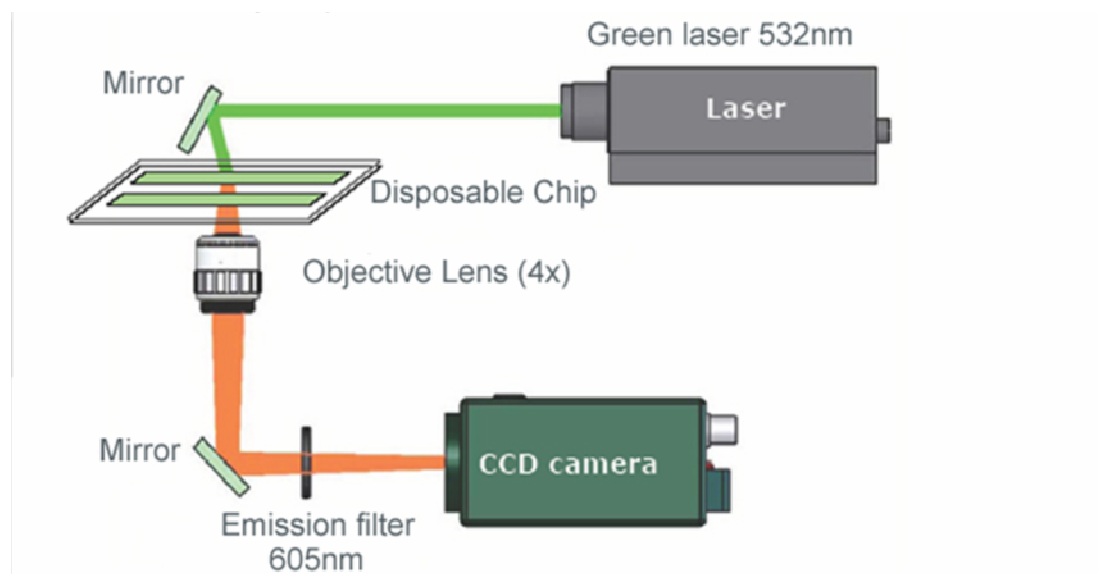


Figure 23 : ADAM (advanced detection accurate measurement): descriptif de l'appareillage.

3.2.2.5.1.

3.2.2.6. *Microscope optique*

Nikon éclipse TE-2000 et logiciel de traitement NIS NIKON (Nikon Instruments Europe, Amstelveen, Pays Bas)

3.2.2.7. *Appareillage HPLC couplé détecteur UV pour étude de stabilité des concentrations de GCV extracellulaires dans le temps*

Chaîne automatisée SHIMADZU 10 (Shimadzu, Champ sur Marne, France) avec détection UV.

3.2.3. Dosage analytique des dérivés phosphorylés intracellulaire du GCV

3.2.3.1. *Molécules, standards et étalons internes*

Le GCV et l'ACV (étalon interne) ont été commandés auprès des laboratoires Roche (Neuilly sur Seine, France) et Glaxo SmithKline (Marly-le-Roy, France) respectivement.

Tous les nucléotides endogènes marqués ont été fournis par Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France) : guanosine $^{13}\text{C}_{10}^{15}\text{N}_5$ 5' monophosphate sodium, 2' deoxyguanosine $^{13}\text{C}_{10}^{15}\text{N}_5$ 5' monophosphate sodium, 2' deoxyguanosine $^{13}\text{C}_{10}^{15}\text{N}_5$ 5' triphosphate sodium et guanosine $^{13}\text{C}_{10}^{15}\text{N}_5$ 5' triphosphate sodium.

Les étalons internes des nucléotides mono et triphosphorylés ont également été fournis par Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France) : 8 bromoguanosine 5' monophosphate sodium, 8 bromoadenosine 5' triphosphate sodium.

3.2.3.2. *Solvants et réactifs*

Les solvants et réactifs utilisés pour les essais sont rassemblés dans le tableau XVIII

Tableau XVIII : Liste des solvants et réactifs.

Produit	Fournisseur
Acétonitrile pour HPLC	Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne
Méthanol pour HPLC	Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne
Eau MilliQ	
Acide acétique	Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne
Diéthylamine (DEA)	Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne
Hexylamine	Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne
Acide formique	Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne
Acétate d'ammonium	Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne
Hydroxyde d'ammonium 30%	Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne
Phosphatase Alcaline	Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France

3.2.3.3. *Extraction phase solide (SPE) et évaporation de l'éluat*

- cartouches d'extraction OASIS Waters hlb WAXX (Waters, Massachussets, Etats unis)
- Evaporateur : TURBOVAP LV (Caliper Life Sciences, Etats-unis)
- Extracteur SUPELCO VISIPREP 24 DL cat n°57265 (Supelco, Etats Unis)

3.2.3.4. *HPLC*

Le système de chromatographie liquide haute performance est composé d'une pompe Thermo Electron surveyor MS équipée d'un injecteur automatique (ThermoElectron San Jose, USA). Le système est contrôlé par le logiciel informatique Thermoelectron Excalibur (version 1.4), installé sur un ordinateur Dell Optiplex pentium 4. Les colonnes chromatographiques testées et leurs dimensions sont présentées dans le tableau XIX

Tableau XIX : Colonnes chromatographiques utilisées pour la mise au point du dosage analytique.

Colonne	Fournisseur	Dimension	Type de greffage
ATLANTIS HILIC	Waters	2,1 x 100 mm (3µm)	Silice greffée avec des groupements hydrophyles
ATLANTIS dC18	Waters	2,1 x 150 mm (3µm)	Silice + « end capping » hydrophobe
HYPERCARB	Thermo Corporation	Electron 2,1 x 100 mm (3µm)	Graphite poreux
X TERRA 18 rp	Waters	2,1 x 250 mm (5µm)	Silice greffée avec des groupements méthyle par technologie hybride de seconde génération

3.2.3.5. *Spectromètre de masse*

Les analyses LC/MS/MS ont été réalisées avec le spectromètre de masse triple quadripole Quantum-Ultra (Thermoelectron) équipé d'une source API (atmospheric pressure ionization) Ion Max.

3.2.4. Analyse statistique des données

L'analyse statistique des données a été réalisée avec le logiciel SPSS® (version 12.0, Chicago, IL, USA).

3.3. Méthodes

3.3.1. Virologie et cultures cellulaires

3.3.1.1. Préparation d'une souche CMV AD169 passage 28 de référence.

But : Réactiver le virus par 2 passages sur cellules MRC5 (à partir du passage 26) de manière à constituer un pool de virus AD169 qui servira pour l'ensemble des essais de l'étude.

- Décongélation de 1 cryotube congelé dans l'azote liquide (AD169 passage 26 sur cellule MRC5) et inoculation sur 2 boîtes (Falcon 30) de cellules MRC5 :
0,5 ml de suspension virale inoculée sur une boîte de MRC5 (milieu changé avec 8ml de MEM 2% de SVFi), après vérification de la nappe cellulaire au microscope
- Centrifugation 30 minutes à 340G
- Aspiration du surnageant et ajout de 8ml de milieu de culture MEM 2%SVFi
- Incubation à 36°C pendant 24 heures
- Après 24 heures, vérification de la nappe cellulaire au microscope
- Remplacement du milieu par du milieu neuf (8 ml de MEM 2%SVFi)
- Incubation pendant 3 jours puis trypsination des cellules infectées (après vérification de la nappe cellulaire au microscope) et inoculation sur 4 boîtes (Falcon 30) MRC5

Le Mode opératoire pour la trypsination des cellules est le suivant :

- Aspiration du surnageant
- Rinçage de la nappe cellulaire avec 2 ml de diluant
- Aspiration du diluant
- Ajout de 2 ml du mélange trypsine-versène
- Contact pendant 1minute sur la paillasse
- Aspiration du mélange
- Réalisation de l'émulsion des cellules trypsinées avec 2 ml de MEM 2% SVFi

- Inoculation sur 2 nouvelles boîtes (Falcon 30) de MRC5 (0,5 ml de suspension cellulaire par boîte) changée avec 8 ml de MEM 2% de SVFi, après vérification de la nappe cellulaire au microscope.

- Incubation à 36°C pendant 24 heures
- Après vérification de la nappe cellulaire au microscope, aspiration, du surnageant et ajout de 8 ml de MEM 2%SVFi pendant 3 jours
- Trypsination 2 boîtes (Falcon 30) de MRC5 avec pour chaque boîte (Falcon 30) : 4ml de MEM + 3 ml de cryoprotecteur + 1 ml de SVFi (16 ml en tout) selon le mode opératoire décrit ci-dessus.
- Répartition de la suspension virale obtenue après trypsination dans 32 cryotubes
- Congélation des 32 cryotubes pendant 12 heures à -80°C
- Puis congélation dans l'azote liquide

Cette souche AD169 passage 28 (P28) produite servira de point de départ à la préparation de virus CMV pour l'ensemble des essais réalisés.

3.3.1.2. Production d'une souche AD169 et détermination de la charge virale par PCR (à partir de la souche AD169 passage 28)

But : Déterminer la charge virale de la souche AD169 passage 28 (P28) après réactivation du virus par 2 nouveaux passages sur cellules MRC5.

- Décongélation de 3 cryotubes congelés dans l'azote liquide et inoculation sur 3 boîtes F30 de MRC5 (AD169 P28)

0,5 ml de suspension virale inoculée sur une boîte de MRC5 changée avec 8ml de MEM 2% de SVFi, après vérification de la nappe cellulaire au microscope

Centrifugation des 3 boîtes 30 minutes à 340G

Remplacement du milieu par du milieu neuf (8 ml de MEM 2%SVFi)

Incubation à 36°C pendant 4 jours

- Après vérification de la nappe cellulaire au microscope, trypsination des 3 F30 infectées et inoculation sur 2 boîtes (Falcon 250) de MRC5 (cf protocole de trypsination paragraphe 3.3.1.1)

Inoculation sur 2 boîtes (Falcon 250) de MRC5 (1ml de suspension par boîte) changée avec 10 ml de MEM 2% de SVFi, après vérification de la nappe cellulaire au microscope

Incubation à 36°C pendant 5 heures

Remplacement du milieu par du milieu neuf (40 ml de MEM 2%SVFi)

Incubation à 36°C pendant 3 jours

- Vérification de la nappe cellulaire des 2 F250 MRC5 au microscope: mise en évidence de l'effet cytopathique (ECP +++)

Remplacement du milieu par du milieu neuf (40 ml de MEM 2%SVFi)

Incubation à 36°C pendant 4 jours

- Trypsination des 2 boîtes (Falcon 250) :

Vérification de l'ECP au microscope

Aspiration du surnageant

Rinçage de la nappe cellulaire avec 2 x 10 ml de diluant

Aspiration du diluant

Ajout de 10 ml de mélange versène trypsine

Contact pendant 1 minute sur la paillasse

Aspiration du mélange

Mise à l'étuve à 36°C

Lorsque décollement de la nappe cellulaire, réalisation de l'émulsion avec 5 ml de MEM 2% (avec une pipette de 10 ml)

Répartition en 20 x 200 µl par boîte (Falcon 250) et congeler à -20°C jusqu'au titrage par PCR du CMV

Les différentes étapes de préparation du virus en vue de la titration et de l'infection des cellules lymphoblastoïdes sont présentées sur les figures 24 et 25.

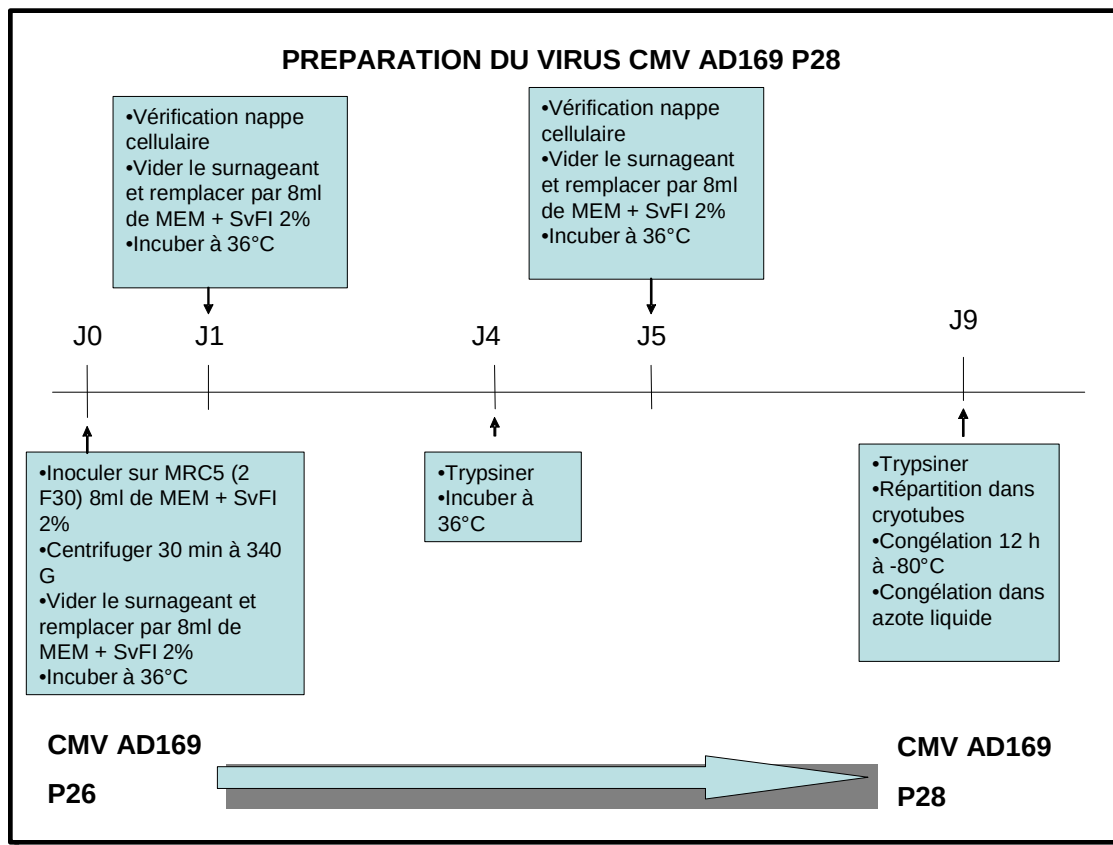


Figure 24 : Préparation d'une souche CMV AD169 passage 28.

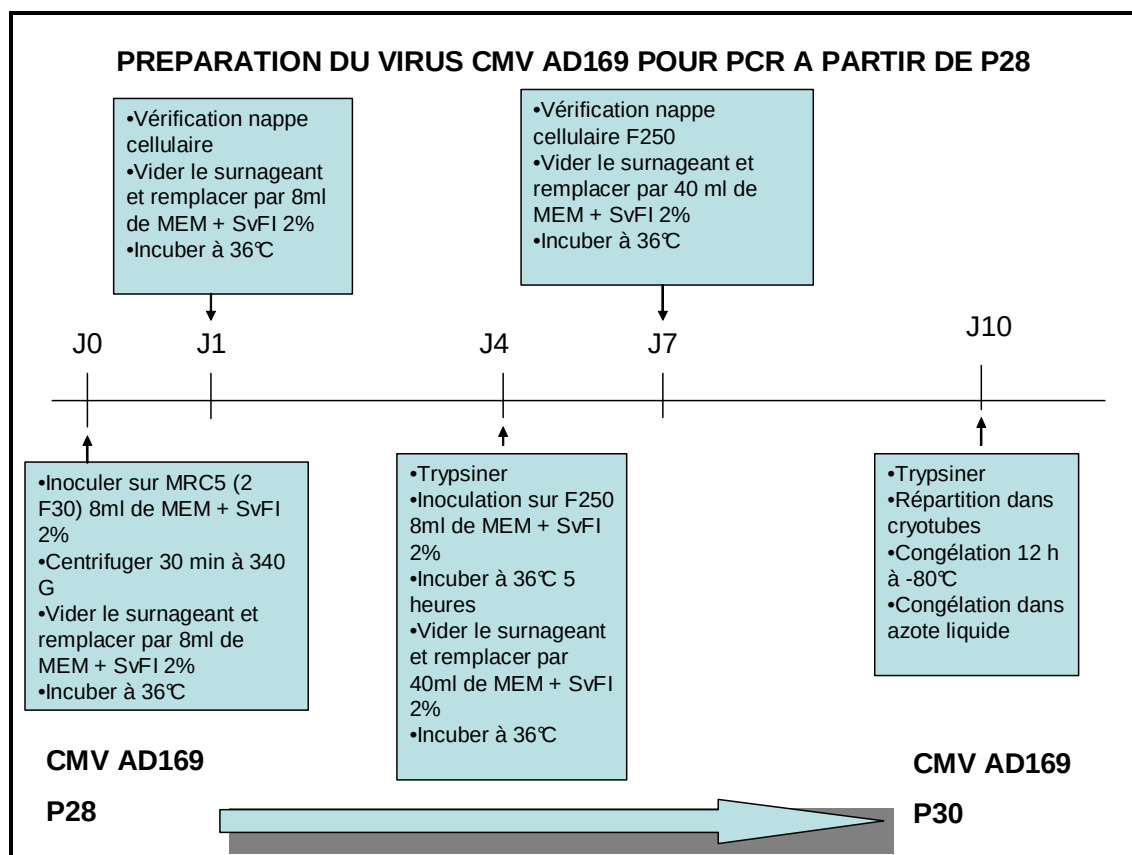


Figure 25 : Préparation d'une souche CMV AD169 (passage 30) pour infection cellules lymphoblastoïdes à partir du passage 28.

Le principe de la méthode de mesure de la charge virale (méthode moléculaire PCR) est présenté figure 26.

La procédure détaillée de la méthode d'extraction de l'ADN viral est présentée en **ANNEXE 2**.

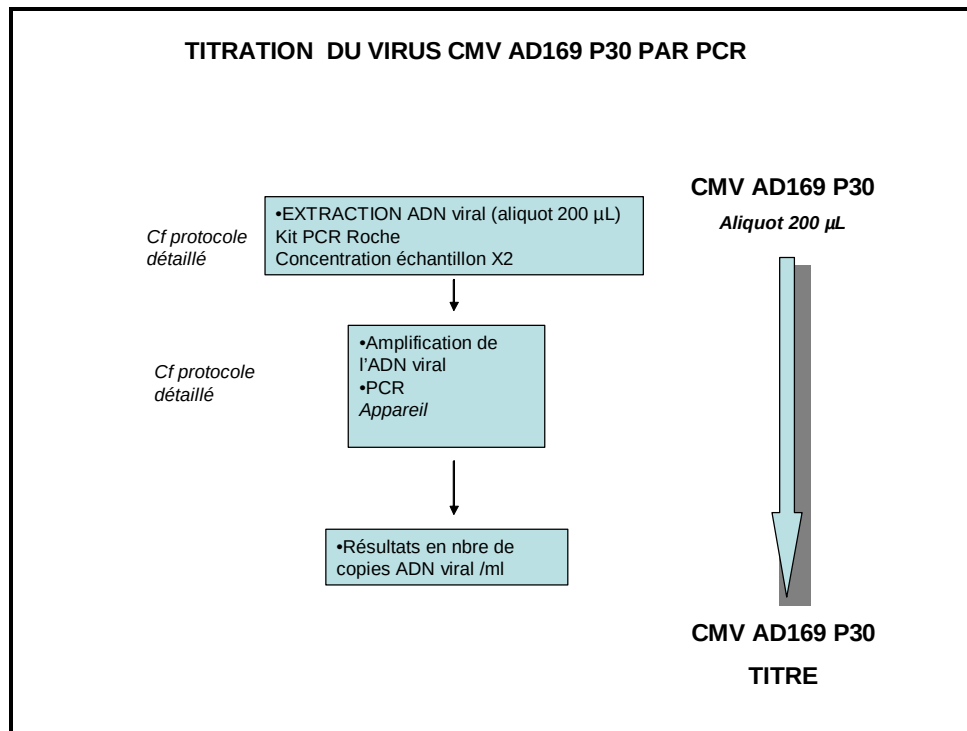


Figure 26 : Méthode de détermination de la charge virale de la souche CMV AD169 passage 30.

3.3.1.3. *Préparation de la lignée de cellules lymphoblastoïdes*

3.3.1.3.1. Isolement des lymphocytes et cryopréservation

La procédure décrivant les modalités de l'isolement des lymphocytes et de leur cryopréservation est présentée en **ANNEXE 3**.

3.3.1.3.2. Production du virus Epstein Barr (EBV)

La procédure décrivant les modalités pour la production de l'EBV est présentée en **ANNEXE 4**.

3.3.1.3.3. Immortalisation des lymphocytes

La procédure décrivant les modalités pour immortaliser les lymphocytes est présentée en **ANNEXE 5**.

3.3.1.3.4. Caractérisation des cellules immortalisées par l'EBV

Les propriétés morphologiques des cellules transformées par l'EBV ont été décrites dans le paragraphe 2.3.5.

Une altération des cellules lymphoblastoïdes est confirmée au microscope d'après les caractéristiques suivantes : diminution de la taille des cellules (les cellules ont un aspect « dégonflé ») et coloration brune (dûe à la diminution du volume intracellulaire). La lyse cellulaire peut parfois également être observée.

La désaggrégation des amas cellulaire (clusters) est observée : diminution quantitative du nombre de clusters et diminution de la taille.

3.3.1.3.5. Culture des lignées lymphoblastoïdes

La procédure décrivant les modalités de la culture des lignées lymphoblastoïdes est présentée en **ANNEXE 6**.

3.3.1.4. *Choix des modalités d'incubation avec le GCV*

Elles doivent se rapprocher au maximum des conditions rencontrées in vivo tout en respectant les contraintes imposées par le modèle de culture cellulaire.

3.3.1.4.1. Concentrations testées

Les concentrations ont été choisies de manière à couvrir les concentrations telles que celles qui pourraient être retrouvées dans l'organisme humain, ou proche des CMI actuellement retenues (1 et 5 mg/L), et des concentrations plus élevées (10 et 20 mg/L) pour les comparer en terme de toxicité cellulaire et efficacité antivirale.

3.3.1.4.2. Durées d'incubation

Le choix des durées d'incubation a été fait en fonction des durées de traitement classiquement utilisées en pratique clinique, des durées d'incubation nécessaires pour permettre au GCV de pénétrer dans les cellules hématologiques et des contraintes imposées par la culture cellulaire.

La durée d'incubation la plus longue (« traitement » de référence) a été de 14 jours, les autres durées d'incubation ont été de 1, 2 et 7 jours.

3.3.1.4.3. Stabilité des concentrations du milieu extracellulaire dans le temps

Une première étude a été réalisée à ce stade ; l'objectif était d'évaluer la stabilité du GCV dans le milieu de culture cellulaire à différents temps d'incubation (et jusqu'à 14 jours) pour apprécier la dégradation du produit au cours du temps : si peu ou pas de perte de produit (<10%) sur la durée prévue pour l'étude, il ne sera pas nécessaire de renouveler le milieu extracellulaire. Si la perte est trop importante (>10%), il faudra envisager un renouvellement du milieu (avec fréquence à définir) pendant la culture cellulaire. La détermination des concentrations extracellulaire a été réalisée par séparation HPLC et détection UV ; La procédure d'analyse est présentée en **ANNEXE 7)**

Essai préliminaire avec mesures à T0, T4H, T6H et T24H après ajout du GCV dans le milieu de culture cellulaire de manière à évaluer la dégradation sur une période de 24 heures

Les concentrations ont été mesurées à la fois dans le culot et dans le surnageant des cellules (de manière à apprécier le passage du GCV à l'intérieur de la cellule)

Le principe de la préparation de l'échantillon est présenté sur la figure 27.

Les volumes d'une solution mère de ganciclovir à 1 mg/mL à ajouter ont été calculés pour obtenir des concentrations finales de 5 et 15 mg/L.

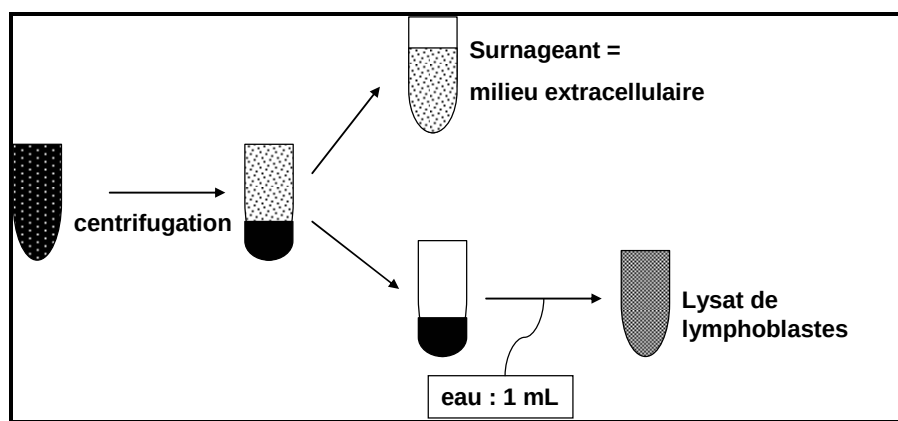


Figure 27 Préparation des cellules en vue de l'analyse extracellulaire et intracellulaire du GCV : l'analyse du GCV est à la fois réalisée dans le surnageant et dans le lysat cellulaire. centrifugation pendant 10 minutes à 10000 tours par min. Le culot cellulaire est lysé par choc osmotique (eau).

Essai final : essai final de stabilité sur la période prévue pour l'étude finale (soit 14 jours) ; l'analyse des concentrations en GCV a été effectuée tous les jours jusqu'à J14 inclus.

Le volume de la solution mère de ganciclovir à 1 mg/L à ajouter a été calculé pour obtenir une concentration finale en GCV dans le milieu de culture à 10 mg/L.

Les prélèvements ont été réalisés uniquement sur le surnageant : 350 µL chaque jour.

Les prélèvements étaient centrifugés (1000 tours par minute pendant 10 minutes) et 300 µL étaient aliquotés et congelés à – 80 °C jusqu'à l'analyse.

3.3.1.5. Préparation du lysat cellulaire en vue du dosage intracellulaire en dérivés phosphorylés du GCV

3.3.1.5.1. Nombre de cellules nécessaires

En accord avec la bibliographie (paragraphe 2.2.11.2.2), les premiers essais ont été réalisés en concentrant les lysats cellulaires pour obtenir des aliquots de 10^7 cellules dans 1 mL.

Puis le nombre de cellules nécessaire a été limité à 4×10^6 cellules (et d'après les résultats des premiers essais HPLC/MS qui montraient trop d'interférences pour des lysats cellulaires très concentrés)

3.3.1.5.2. Préparation de l'extrait cellulaire et conservation jusqu'à l'analyse

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

- lavage 2 fois au PBS du culot cellulaire
- reprise par un volume pour obtenir une concentration de 10^7 cellules dans 0.5 ml

A température ambiante pendant toute la durée de préparation du lysat cellulaire

- congélation à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'analyse

Une dégradation importante des nucléotides endogènes ayant été observée lors de l'analyse HPLC, un nouveau protocole a été appliqué pour la suite des essais. Il figure paragraphe 3.3.2.2.

3.3.1.6. *Choix de la dose infectieuse en CMV et de la durée entre l'infection et l'exposition des cellules infectées au GCV*

L'objectif était de vérifier la capacité du virus CMV souche AD169 à infecter les cellules lymphoblastoïdes et de choisir alors la dose infectieuse optimale.

La durée d'infection « sans traitement » devait être optimisée de manière à pouvoir analyser de manière non biaisée l'efficacité et la toxicité du traitement par GCV au bout de X jours. Le CMV étant très toxique, la période de culture des cellules infectées non traitées doit être maîtrisée et limitée de manière à pouvoir quantifier l'efficacité du traitement par GCV ; une période trop longue pouvant conduire à une toxicité cellulaire trop importante (due au CMV) et à l'échec du traitement trop tardif par le GCV.

3.3.1.6.1. Infection des cellules pendant 14 jours (sans exposition au GCV: ESSAI a

Deux lignées lymphoblastoïdes humaines (souche A et souche B) ont été infectées par le CMV humain AD169 à 3 MOI (multiplicity of infection) différentes : 10, 1 et 0,1 (1 MOI correspond à une infection d'une particule virale (ou PFU) pour une cellule).

Un dosage de la charge virale est réalisé par PCR à J0 (témoin), J0+ 2h après infection, J7 et J14. Un contrôle de croissance et de la viabilité cellulaire est effectué à J0 (témoin), J0+2h , J7 et J14 après infection.

Lignée cellulaire : 2 lignées cellulaires lymphoblastoïdes humaines (transformées par l'EBV) ont été cultivées en suspension dans le milieu RPMI 1640 supplémenté par 10% de serum de veau foetal, à 37°C, atmosphère 5% de CO₂.

Les deux souches ont été remises en suspension et les cellules des clusters ont été dissociées par aspiration/refoulement à l'aide d'une pipette pasteur stérile.

- Après numération des deux souches, les cellules lymphoblastoïdes cultivées ont été réparties en tubes de 10 ml à raison de 1 ml de suspension cellulaire à 10⁷ cellules/ml de milieu RPMI 1640.

CMV : souche préparée sur cellules MRC5 à un titre de 10⁹ pfu/ml comme décrit plus haut (cf préparation du virus, paragraphe 3.3.1.2)

Infection virale : 10⁷ cellules lymphoblastoïdes en suspension dans 1ml de milieu RPMI 1640 sont infectées par le CMV à des MOI équivalentes à 10 ; 1 et 0,1 pfu/cellule (essais sur 2 lignées lymphoblastoïdes distinctes).

Le virus récolté sur cellules MRC5 titré à 10⁹ pfu/ml est ajouté dans les tubes comme suit :

- tubes CMV 10 pfu/cellule : 100 µl de suspension virale à 10⁹ pfu/ml
- tubes CMV 1 pfu/cellule : 10 µl de suspension virale à 10⁹ pfu/ml
- tubes CMV 0,1 pfu/cellule : 10 µl de suspension virale à 10⁸ pfu/ml (suspension virale diluée au 1/10)

Des essais témoins (sans infection) ont été réalisés en parallèle. L'ensemble des essais a été réalisé en tube de 10ml.

Les cellules ont été infectées pendant **2 heures à 37°C avec agitation fréquente (TOCCI et JEOR, 1979 ; SUN et al., 1999)**. Après adsorption du virus, les cellules ont été lavées trois fois et remises en suspension dans du RPMI 1640 à une concentration de 10⁶ cellules/ml (soit dans 10 ml en flacon T25). Les flacons ont été placés à 37°C en atmosphère enrichie en CO₂ pendant 14 jours.

Détermination de la charge virale : Les cellules et le surnageant ont été testés par PCR afin de déterminer la charge virale à J0+2h, J7 et J14 après infection. 300 µl de suspension cellulaire (1 témoin, 2 CMV10, 2 CMV1 et 2 CMV 0,1 par lignée lymphoblastoïde) ont été aliquotés pour effectuer les PCR de contrôle à J0+2h , J7 et J14.

Détermination du nombre de cellules : compteur coulter

Incubation avec le GCV : au terme de 14 jours d'infection, les cellules ont été exposées à différentes doses de GCV (0 ; 1 et 10 mg/L)

Tableau XX : Protocole pour la détermination de la dose infectieuse optimale (pour une lignée lymphoblastoïde).

Ingrédients lymphoblastoïdes:									
Tubes	Témoins (3)			CMV0,1 (2)		CMV1 (2)		CMV10 (2)	
CMV	0			0,1		1		10	
pfu/c									
Incubation	2h à 37°C avec agitation fréquente								
J0+2h									
J7	PCR et numération								
J14									
GCV mg/l	0	1	10	1	10	1	10	1	10

La dose infectieuse retenue sera celle permettant une infection se rapprochant le plus possible des charges virales retrouvées en pratique clinique : soit environ 10^5 copies/ml et qui sera le moins toxique possible pour les cellules (croissance des cellules infectées équivalente à la croissance des cellules non infectées à 14 jours).

3.3.1.6.2. Infection des cellules (2 heures de contact) suivi d'un traitement par GCV : ESSAI b

But : Déterminer l'effet de doses infectieuses plus faibles sur la charge virale à 24 et 48 heures et sur la croissance cellulaire (et en accord avec les résultats de l'essai a) avec modification du délai entre l'infection et l'exposition au GCV

Lignée cellulaire : lignée cellulaire lymphoblastoïde humaine (transformées par l'EBV) cultivée en suspension dans le milieu RPMI 1640 supplémenté par 10% de sérum de veau foetal, à 37°C, atmosphère 5% de CO₂.

CMV AD69 : souche préparée sur cellules MRC5 à un titre de 10^9 pfu/ml

Infection virale et incubation avec le GCV : elle est réalisée comme pour l'essai a (paragraphe 3.3.1.6.1). Par contre les cellules sont incubées avec le GCV immédiatement après l'infection (après les 2 heures de contact et le lavage des cellules)

Incubation avec le GCV : A partir d'une solution mère à 1 mg/ml de GCV , les volumes de GCV à ajouter ont été calculés de manière à obtenir des concentrations finales de 1 et 10 mg/L dans le milieu extracellulaire

Détermination de la charge virale : les cellules et le surnageant sont testés par PCR afin de déterminer la charge virale à T2heures (immédiatement après infection), T 24h et T48h. Chaque PCR est effectuée sur un volume de 300 µl

Croissance et viabilité cellulaire : une numération des cellules est effectuée à T0, T48h. Chaque numération est effectuée sur un volume de 100µl (dilution 1/100).

3.3.1.7. Essais préliminaires de toxicité

3.3.1.7.1. Etude de toxicité du GCV SEUL : Essai A

But : Déterminer la relation GCV/toxicité cellulaire, indépendamment de l'infection par le CMV (cellules non infectées CMV) : Incubation des cellules lymphoblastoïdes à différentes concentrations de GCV : 1, 5, 10, et 20 mg/L pendant 48 H, 7 J ou 15 jours. La culture cellulaire est poursuivie 14 jours indépendamment de la durée d'exposition au GCV.

Méthodes

- **Lignée cellulaire** : 2 lignées cellulaires lymphoblastoïdes humaines (transformées par l'EBV) sont cultivées en suspension dans le milieu RPMI 1640 supplémenté par 10% de serum de veau fœtal, à 37°C, atmosphère 5% de CO₂.

- **Ganciclovir** : La solution de GCV est préparée comme suit : un flacon de Cymevan® 500mg lyophilisé est repris par 10ml de sérum physiologique. Cette solution à 50 mg/ml (stable 12h) est ensuite diluée au 1/50^{ème} dans du sérum physiologique pour obtenir une solution à **1mg/ml** (100µl de GCV + 4,9 ml de NaCl 0,9%).

- **Préparation de la suspension cellulaire** : Les deux souches sont remises en suspension et les cellules des clusters sont dissociées par aspiration/refoulement à l'aide d'une pipette pasteur stérile.

Après numération des deux souches, les cellules lymphoblastoïdes cultivées sont réparties en flacons T25 (10 ml par flacons de suspension cellulaire)

- **Incubation avec le GCV** : 15 flacons T25 sont préparés (par souche) et répartis comme suit :

- 3 GCV 0 mg/L
- 3 GCV 1 mg/L : 10 µl de solution GCV à 1mg/ml dans 10 ml de suspension cellulaire
- 3 GCV 5 mg/L : 50 µl de solution GCV à 1mg/ml dans 10 ml de suspension cellulaire
- 3 GCV 10 mg/L : 100 µl de solution GCV à 1mg/ml dans 10 ml de suspension cellulaire
- 3 GCV 20 mg/L : 200 µl de solution GCV à 1mg/ml dans 10 ml de suspension cellulaire, s
- **Numération des cellules** (Compteur Coulter) : à J0, J2, J7 et J15
- **Observation au microscope** : à J0, J2, J7 et J15

L'ensemble des essais est rassemblé dans le tableau XXI.

Tableau XXI : Cellules lymphoblastoïdes non infectées : plan d'analyse de l'étude de toxicité (pour 1 souche) essai A.

	GCV 0 mg/L			GCV 1 mg/L			GCV 5 mg/L			GCV 10 mg/L			GCV 20 mg/L		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3
2J	L N*			L N*			L N*			L N*			L N*		
7 J	N	L N*		N	L N*		N	L N*		N	L N*		N	L N*	
14 J	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

S1 : exposition au GCV pendant 2J ; S2 : exposition au GCV pendant 7J

S3 : exposition au GCV pendant 14J (référence) ; pour chaque série 5 concentrations testées (0, 1, 5, 10, 20 mg/L)

L=LAVAGE ; N=NUMERATION ; N*= NUMERATION AVANT ET APRES LAVAGE

GCV 0 = pas de GCV , GCV1= concentration à 1 mg/L, GCV 5 = concentration à 5 mg/L, GCV10 = concentration à 10 mg/L ;

GCV20 = concentration à 20 mg/L

3.3.1.7.2. Etude de toxicité du GCV seul : ESSAI B

But : Déterminer la relation GCV/toxicité cellulaire, indépendamment de l'infection par le CMV (cellules non infectées CMV) et confirmer les résultats de l'Essai1 : Incubation des cellules lymphoblastoïdes à différentes concentrations de GCV : 0, 1, 5, 10, et 20 mg/L pendant 1, 2, 7 et 14 jours. La culture cellulaire est poursuivie 14 jours indépendamment de la durée d'exposition au GCV. Des mesures complémentaires de viabilité cellulaires sont réalisées aux différents temps d'analyse.

Lignée cellulaire lymphoblastoïde : 1 lignée cellulaire lymphoblastoïde humaine (transformées par l'EBV) est cultivée en suspension dans le milieu RPMI 1640 supplémenté par 10% de serum de veau fœtal, à 37°C, atmosphère 5% de CO₂.

Préparation de la solution de Ganciclovir : cf paragraphe 3.3.1.8.1

Préparation de la suspension cellulaire lymphoblastoïde

Incubation avec le GCV : 20 flacons T25 sont préparés et répartis comme suit :

4 GCV 0 mg/L (incubations 1, 2, 7, 14 jours)

4 GCV 1 mg/L (incubations 1, 2, 7, 14 jours)

X µl de solution GCV à 1mg/ml dans **Y** ml de suspension cellulaire

4 GCV 5 mg/L (incubations 1, 2, 7, 14 jours) : **X'** µl de solution GCV à 1mg/ml dans **Y** ml de suspension cellulaire

4 GCV 10 mg/L (incubations 1, 2, 7, 14 jours) : **X''** µl de solution GCV à 1mg/ml dans **Y** ml de suspension cellulaire

4 GCV 20 mg/L (incubations 1, 2, 7, 14 jours) : **X'''** µl de solution GCV à 1mg/ml dans **Y** ml de suspension cellulaire

(Y correspond au volume de la culture cellulaire, X, X', X'', X''' dependent de la valeur de Y)

Numération des cellules (Compteur Coulter) : à J0, J2, J7 et J15

Observation au microscope : à J0, J1, J2, J7 et J15

Numération et viabilité cellulaire (compteur ADAM) : à J0, J1, J2, J7 et J15.

Le détail des essais est présenté dans le tableau XXII.

Tableau XXII : Cellules lymphoblastoïdes non infectées : plan d'analyse de l'étude de toxicité essai B.

	GCV 0 mg/L				GCV 1 mg/L				GCV 5 mg/L				GCV 10 mg/L				GCV 20 mg/L			
	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
T0	NUMERATION ET VIABILITE																			
1J	L N* V				L N* V				L N* V				L N* V				L N* V			
2J	N V	L N* V			N V	L N* V			N V	L N* V			N V	L N* V			N V	L N* V		
7 J	N V	N V	L N* V		N V	N V	L N* V		N V	N V	L N* V		N V	N V	L N* V		N V	N V	L N* V	
14J	N V	N V	N V	L N V	N V	N V	N V	L N V	N V	N V	N V	L N V	N V	N V	N V	L N V	N V	N V	N V	L N V

S1 : exposition 1J

S2 : exposition 2J

S3 : exposition 7J

S4 : exposition 14 J (reference) pour chaque série : GCV 0, 1, 5, 10 et 20 mg/L

L=Lavage

N=Numération

N*= Numération avant et après lavage

GCV 0 = pas de GCV , GCV1= concentration à 1 mg/L, GCV 5 = concentration à 5 mg/L, GCV10 = concentration à 10 mg/L ;

GCV20 = concentration à 20 mg/L

3.3.1.8. Essais préliminaires d'efficacité : ESSAI C

But: Déterminer l'effet du GCV sur le CMV : étude de l'influence de la dose de GCV et de la durée d'exposition sur l'évolution de la charge virale d'une lignée cellulaire lymphoblastoïde humaine infectée par le CMV et déterminer l'effet « cumulé » de l'infection et du traitement par GCV sur la croissance cellulaire (toxicité)

Méthodes

Lignée cellulaire lymphoblastoïde : la lignée cellulaire lymphoblastoïde humaine (transformées par l'EBV) a été cultivée en suspension dans le milieu RPMI 1640 supplémenté par 10% de serum de veau foetal, à 37°C, atmosphère 5% de CO₂.

Virus CMV AD69 : la souche a été préparée sur cellules MRC5 à un titre de **10⁹ pfu/ml** (cf préparation du virus, paragraphe 3.3.1.2)

Infection virale : 10⁷ cellules lymphoblastoïdes en suspension dans 1ml de milieu RPMI 1640 ont été infectées par le CMV à **0,1 pfu/cellule** (dose infectieuse choisie d'après les résultats de la détermination de la dose infectieuse optimale, paragraphe 3.3.1.6).

Des essais témoins (sans infection) ont été réalisés en parallèle. L'ensemble des essais a été réalisé en tube de 10ml.

Les cellules ont été infectées pendant **2 heures à 37°C avec agitation fréquente (TOCCI et JEOR, 1979 ; SUN et al., 1999)**. Après adsorption du virus, les cellules ont été lavées trois fois et remises en suspension dans du RPMI 1640 à une concentration de 10⁶ cellules/ml (flacon T25).

Le protocole de préparation et infection des cellules (J-3 et J0) est présenté dans le tableau XXIII.

Tableau XXIII : Protocole de préparation et d'infection des cellules Essai C.

		Témoin	Traitement par GCV
J-3	Nombre de tubes de 10ml	1	5
	Concentration cellulaire	5ml de suspension cellulaire à 10^7 cellules/ml par tube (sf T : 2ml)	
	CMV 10^9 pfu/ml	0	50µl du virus dilué au 1/10
	Incubation	2 heures à 37°C avec agitation fréquente	
	Lavages	trois lavages avec du RPMI 1640 par centrifugation (165 x g pendant 10 minutes)/remise en suspension	
	Reprise du culot	Culot remis en suspension dans 50ml de milieu RPMI (10^6 cellules/ml) en flacon T75	
	PCR	Aliquots de 300 µl	
	Numérations	Numération sur 100 µl dilué au 1/100	
J0	PCR	Aliquots de 300 µl	
	Numérations	Numération sur 100 µl dilué au 1/100	
	Répartition en flacons	Répartir les lymphos infectés par le CMV en 15 flacons de 15ml chacun (5 flacons par ttt)	

Préparation de la solution de ganciclovir: la préparation a été la même que pour les essais précédents. Le volume de la solution de GCV à 1 mg/mL à ajouter dans chaque milieu de culture a été calculé pour obtenir des concentrations finales de 1, 5, 10 et 20 mg/L

Protocole d'exposition des cellules au GCV : le GCV a été ajouté au milieu cellulaire 3 jours après l'infection. Les cellules ont été incubées 1 jours, 2 jours ou 7 jours avant lavage du milieu. La culture cellulaire a été maintenue 14 jours indépendamment de la durée d'exposition au GCV.

Détermination de la charge virale : les cellules et le surnageant (300 µL du mélange) ont été testés par PCR afin de déterminer la charge virale à J-3 (immédiatement après infection), J0 (3 jours d'infection), J1 J7, et J14.

Croissance et viabilité cellulaire : une numération des cellules a été effectuée à J-3, J0, J1, J7, J14 (volume de 100µl et dilution au 1/100).

Le détail des essais est présenté dans le tableau XXIV

Tableau XXIV : Cellules lymphoblastoïdes infectées par le CMV : plan d'analyse de l'étude d'efficacité (et toxicité cumulée) Essai C.

	GCV 0 mg/L			GCV 1 mg/L			GCV 5 mg/L			GCV 10 mg/L			GCV 20 mg/L		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3
J-3	PCR POST INFECTION NUMERATION														
J0	PCR ET NUMERATION														
1J	L N* P			L N* P			L N* P			L N* P			L N* P		
2J	N P	L N* P		N P	L N* P		N P	L N* P		N P	L N* P		N P	L N* P	
7 J	N P	N P	L N* P	N P	N P	L N* P	N P	N P	L N* P	N P	N P	L N* P	N P	N P	L N* P
14J	N P	N P	N P	N P	N P	N P	N P	N P	N P	N P	N P	N P	N P	N P	N P

S1 : exposition 1J, S2 : exposition 2J

S3 : exposition 7J (pour chaque série : GCV 0, 1, 5, 10 et 20 mg/L)

L=Lavage, N=Numération N*= Numération avant et après lavage

3.3.1.9. Essais finaux de toxicité et d'efficacité : ESSAI E

3.3.1.9.1. Objectifs

- Détermination de la relation GCV/toxicité cellulaire, indépendamment de l'infection par le CMV (cellules lymphoblastoïdes non infectées CMV)
- Détermination de l'efficacité GCV/charge virale CMV sur cellules lymphoblastoïdes infectées (charge infectieuse unique déterminée d'après les résultats de l'Essai b) pour analyser la toxicité globale due au CMV et au GCV. Par différence la toxicité due au CMV pourra être évaluée.

Incubation des cellules lymphoblastoïdes infectées et non infectées à différentes concentrations de GCV : 0, 1, 5, 10, et 20 mg/L pendant 1, 2, 7 et 14 jours. La culture cellulaire est poursuivie 14 jours indépendamment de la durée d'exposition au GCV.

3.3.1.9.2. Méthodes

Les modifications majeures apportées par rapport à l'essai D : 2 souches ont été cultivées (à la place de 1), la durée d'infection avant incubation avec le GCV a été limitée à 2 heures et enfin des mesures de viabilité cellulaire ont été ajoutées à l'analyse.

Lignée cellulaire lymphoblastoïde : 3 lignées cellulaire lymphoblastoïde humaine (transformées par l'EBV) ont été cultivées en suspension dans le milieu RPMI 1640 supplémenté par 10% de serum de veau fœtal, à 37°C, atmosphère 5% de CO₂.

Chaque souche est remise en suspension et les cellules des clusters sont dissociées par aspiration/refoulement à l'aide d'une pipette pasteur stérile.

Après numération, les cellules lymphoblastoïdes cultivées ont été réparties comme suit

- 2 flacons de 500 ml (à environ 10⁶ cel/ml) pour les essais sur cellules infectées et non infectées (souche A)
- 2 flacons de 250 ml (à environ 10⁶ cel/ml) pour les essais sur cellules infectées et non infectées (souche B)
- 2 flacons de 250 ml (à environ 10⁶ cel/ml) pour la production d'un pool de cellules réservé à la mise au point du dosage en HPLC/MS (souche C)

Virus CMV AD69 : la souche a été préparée sur cellules MRC5 à un titre de 10^9 pfu/ml (cf préparation du virus, paragraphe 3.3.1.2)

Infection virale : 10^7 cellules lymphoblastoïdes en suspension dans 1ml de milieu RPMI 1640 ont été infectées par le CMV à **0,1 pfu/cellule** (dose infectieuse choisie d'après les résultats de la détermination de la dose infectieuse optimale, paragraphe 3.3.1.6).

Les cellules sont infectées pendant 2 heures à 37°C avec agitation fréquente (TOCCI et JEOR, 1979 ; SUN et al., 1999). Après adsorption du virus, les cellules sont lavées trois fois et remises en suspension dans du RPMI 1640, à une concentration de environ 10^6 cellules/ml (dans 450 ml pour la souche A et 250 ml pour la souche B) et réparties dans 20 flacons de 20 ml (souche A), ou 20 flacons de 10 ml (souche B)

En plus, pour le pool (dosage HPLC), répartition dans 6 flacons de 50 ml à 10^6 cell /ml : CMV+GCV0, CMV+GCV1 et CMV+GCV10 ; CMV-GCV0, CMV-GCV1 et CMV-GCV10 (souche C).

Préparation de la solution de GCV cf paragraphe 3.3.1.8.1

Le volume de solution à ajouter est calculé pour obtenir les concentrations finales à 1, 5, 10 et 20 mg/L dans le milieu de culture.

Protocole d'exposition des cellules au GCV : le GCV a été ajouté au milieu cellulaire immédiatement après infection et lavage des cellules. Les cellules ont été incubées 1 jours, 2 jours, 7 jours ou 14 jours avant lavage du milieu. La culture cellulaire a été maintenue 14 jours indépendamment de la durée d'exposition au GCV.

Protocole d'exposition des cellules pour production du pool de cellules (mise au point du dosage par HPLC/MS)

Les cellules infectées ont été exposées au GCV pendant 48 heures aux concentrations suivantes : 0, 1 et 10 mg/L.

Les cellules non infectées ont été exposées au GCV pendant 48 heures aux concentrations suivantes : 0, 1 et 10 mg/L.

La préparation des lysats cellulaires a été réalisée comme indiqué paragraphe 3.3.2.2.

Chaque aliquot contient 10^7 cellules dans 0.5 ml.

Observation microscopique des cellules : à J0, J1, J2, J7 et J14.

Numérations Coulter des cellules : à J0, J1, J2, J7 et J14.

200µL de suspension cellulaire sont prélevés après agitation, puis dilués qsp 20ml (tampon ISOTON).

Viabilité des cellules : à J0, J7 et J14.

2x20 µL de suspension cellulaire sont prélevés par échantillon.

Mesure de la charge virale sur cellules infectées : à J0, J1, J2, J7 et J14.

300 µl de la suspension cellulaire sont prélevés par échantillon, puis congelés à - 20°C jusqu'à l'analyse.

Le détail des essais est présenté dans le tableau XXV.

Le protocole complet figure en **ANNEXE 8**.

Tableau XXV : Cellules lymphoblastoïdes non infectées : plan d'analyse de l'étude de toxicité (pour 1 souche).

	GCV 0 mg/L				GCV 1 mg/L				GCV 5 mg/L				GCV 10 mg/L				GCV 20 mg/L			
	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
T0	NUMERATION ET VIABILITE																			
1J	L N* V*				L N* V*				L N* V*				L N* V*				L N* V*			
2J	N V	L N* V* D*			N V	L N* V* D*			N V	L N* V			N V	L N* V* D*			N V	L N* V*		
7J	N V	N V	L N* V*		N V	N V	L N* V*		N V	N V	L N* V*		N V	N V	L N* V*		N V	N V	L N* V*	
14J	N V	N V	N V	N* V*	N V	N V	N V	N* V*	N V	N V	N V	N* V*	N V	N V	N V	N* V*	N V	N V	N V	N* V*

S1 : exposition au GCV 1J

S2 : exposition au GCV 2J

S3 : exposition au GCV 7J

S4 : exposition au GCV 14 J (référence) ; pour chaque série 5 concentrations testées (0, 1, 5, 10, 20 mg/L)

L=LAVAGE

N=NUMERATION

N*= NUMERATION AVANT ET APRES LAVAGE

D* = ALIQUOTS POUR LA MISE AU POINT DOSAGE HPLC (5 X 10⁷ cellules pour chaque point) *série en parallèle*

Numération : 200 µL par mesure

Adam : 40 µL par point

Au total : 20 flacons (20ml) + 3 flacons supplémentaires pour HPLC (50 ml) PAR SOUCHE

Tableau XXVI : Cellules lymphoblastoïdes infectées par le CMV : plan d'analyse de l'étude de toxicité et d'efficacité (pour 1 souche).

	GCV 0 mg/L				GCV 1 mg/L				GCV 5 mg/L				GCV 10 mg/L				GCV 20 mg/L			
	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
T0	NUMERATION, VIABILITE ET PCR																			
1J	L N* V* P				L N* V* P				L N* V* P				L N* V* P				L N* V* P			
2J	N V P	L N* V* D* P			N V P	L N* V* D* P			N V P	L N* V* P			N V P	L N* V* D* P			N V P	L N* V* P		
7 J	N V P	N V P	L N* V* P		N V P	N V P	L N* V* P		N V P	N V P	L N* V* P		N V P	N V P	L N* V* P		N V P	N V P	L N* V* P	
14J	N V P	N V P	N V P	N* V P	N V P	N V P	N V P	N* V P	N V P	N V P	N V P	N* V P	N V P	N V P	N V P	N* V P	N V P	N V P	N V P	N* V P

S1 : exposition 1J

S2 : exposition 2J

S3 : exposition 7J

S4 : exposition 14 J (référence); pour chaque série 5 concentrations testées (0, 1, 5, 10, 20 mg/L)

L=LAVAGE

N=NUMERATION

N*= NUMERATION AVANT ET APRES LAVAGE

P = PCR : 50 + T2heures + TEMOIN 2 heures+ Récolte = **53 PCR par souche**

D* = ALIQUOTS POUR LA MISE AU POINT DOSAGE HPLC (**5 X 10⁷ cellules pour chaque point**)

3.3.2. Mise au point du dosage intracellulaire des dérivés phosphorylés du ganciclovir

En complément du comptage cellulaire et des quantifications de charge virale (PCR), la concentration des dérivés phosphorylés du GCV sera mesurée à l'intérieur des cellules lymphoblastoïdes (pour chaque concentration et chaque durée d'exposition). L'objectif est de quantifier les métabolites actifs du GCV dans les cellules infectées et non infectées par le CMV, pour étudier la corrélation [c] extracellulaires/[c] intracellulaires/toxicité -efficacité. La méthode de dosage retenue est une méthode associant la chromatographie liquide haute performance (HPLC) à la spectrométrie de masse (SM) en effet, étant données les concentrations intracellulaires faibles attendues et la complexité du milieu intracellulaire, une méthode classique par HPLC et détection UV ne serait pas suffisamment spécifique et sensible.

Le dosage sera réalisé sur les cellules lymphoblastoïdes infectées par le CMV d'une part et sur les cellules non infectées d'autre part pour apprécier la métabolisation du GCV en l'absence de kinases viro-induites.

3.3.2.1. Molécules d'intérêt à doser

Les 2 principales molécules d'intérêt à doser sont le GCV (si choix de la méthode indirecte dont le principe est détaillé paragraphe 3.3.2.3) et le GCVTP (si choix de la méthode directe dont le principe est détaillé paragraphe 3.3.2.4).

D'autres molécules comme les dérivés phosphorylés intermédiaires du GCV (GCVMP et GCVDP) peuvent être intéressantes à doser.

Enfin, et en l'absence de standard des formes phosphorylées du GCV, il pourra être nécessaire de doser les nucléotides endogènes analogues des formes phosphorylées du GCV (si choix de la méthode directe) pour pouvoir réaliser une gamme de concentration et une validation de la méthode analytique.

3.3.2.2. Extraction et conservation des cellules (jusqu'à l'analyse par HPLC/MS)

La méthode d'extraction et de conservation du culot cellulaire avant son analyse est une étape délicate. D'après la bibliographie (paragraphe 2.2.11.2.1 et tableau XII), la méthode retenue a été la suivante :

- 2 lavages successifs des cellules au PBS froid : ajout d'un volume X (dépendant du nombre de cellules) de PBS froid sur le culot cellulaire puis centrifugation (1500 tours/min pendant 10 min à +4°C)
- Après la dernière centrifugation, les tubes sont placés dans la glace et le culot cellulaire repris avec du méthanol 60% froid
- Tubes vortexés pendant 1 minute exactement
- Répartition en aliquots (10^7 cellules dans 0.5 ml) avec conservation à - 80°C jusqu'à l'analyse

La numération des cellules est réalisée avant le lavage, le volume de reprise par le méthanol étant calculé pour obtenir une concentration de 2×10^7 cel/mL.**

***Pour les premiers essais où le nombre optimal de cellules restait à déterminer, la préparation était réalisée pour obtenir des aliquots à 2.5×10^7 cel/mL.*

3.3.2.3. Dosage indirect des formes phosphorylés du GCV

Dans un premier temps nous nous sommes orientés vers une méthode de dosage indirect des formes phosphorylées du GCV, étant donnée l'impossibilité de disposer d'un standard commercialisé du GCVTP.

Le principe du dosage indirect est le suivant (Figure 28) : quantification du GCV sans traitement et après traitement de l'échantillon par une phosphatase alcaline (lyse des liaisons pyrophosphates du GCVMP, GCVDP et GCVTP).

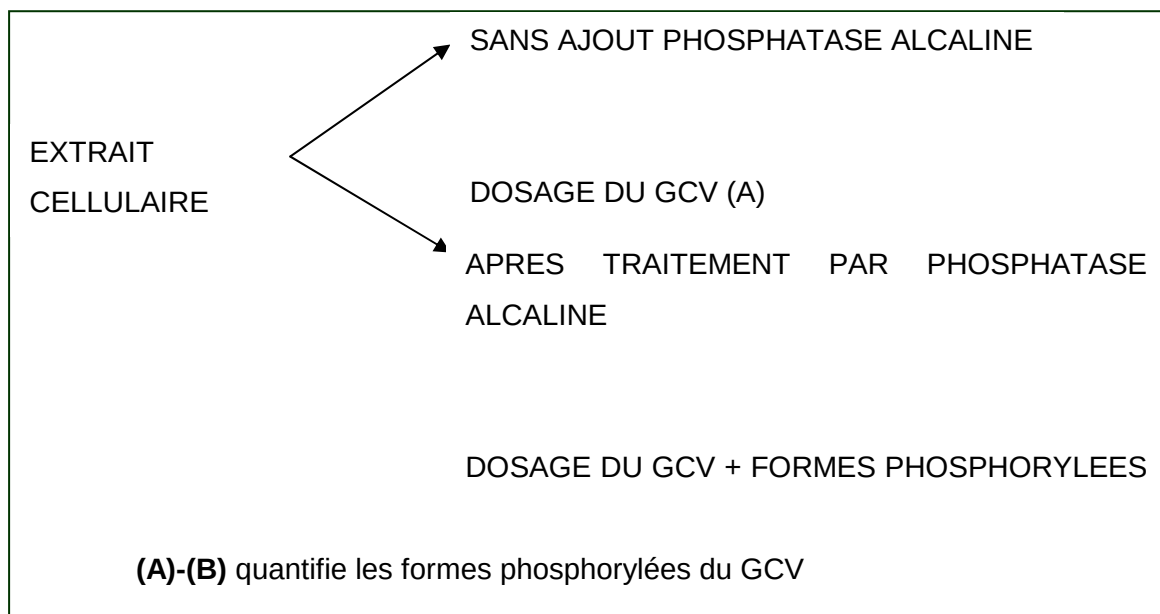


Figure 28 : Principe de la méthode de dosage indirect des formes phosphorylées du ganciclovir (GCV).

3.3.2.3.1. Préparation de l'échantillon

Les structures chimiques et masses molaires du GCV et ACV sont présentées sur la figure 29.

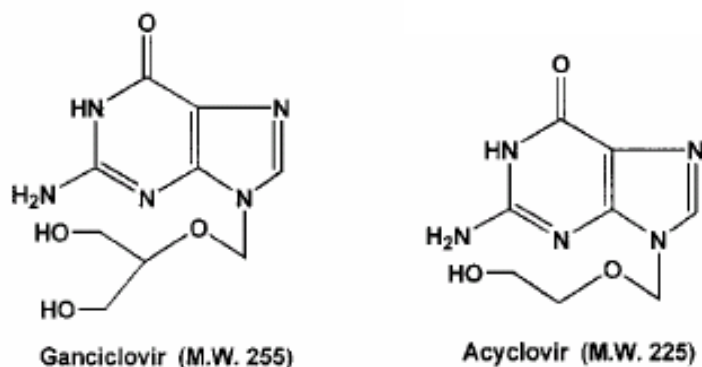


Figure 29 : Structures chimiques et masses molaires du GCV et ACV (étalon interne).

- Etalonnage interne

Comme dans la méthode de Xu *et al.* (2001), l'ACV a été retenu comme étalon interne (structure très voisine de celle du GCV).

- Choix du nombre de cellules à analyser

L'analyse bibliographique (cf paragraphe 2.2.11.2.2 et tableau XIII) nous montre une grande variabilité du nombre de cellules analysées ; le choix dépend de la sensibilité de la méthode

de dosage mais aussi du type de cellules analysées avec des composants intracellulaires quantitativement et qualitativement différents d'un type cellulaire à l'autre.

Il a été choisi de tester différentes concentrations cellulaires : 2.5×10^7 et 1×10^7 cellules ; des quantités cellulaires supérieures étant plus difficiles à produire et risquant d'apporter un bruit de fond important.

- Extraction liquide-liquide

Un simple traitement de l'échantillon par l'acétonitrile (1 à 3 fois le volume de prise, en fonction des essais), suivi d'une centrifugation (10000 t/min 10 min à + 10°C) et évaporation a été retenu. Le résidu est repris par 100 µL d'eau ultrapure (purifiée par le système MilliQ) additionnée d'acide formique 0.1%.

3.3.2.3.2. Optimisation de la séparation

- Choix de la colonne de séparation

Différentes colonnes ont été testées de manière à améliorer la sensibilité, la rétention et la qualité des pics de GCV et ACV : colonne XTERRA 18rp (Waters), ATLANTIS dC 18 (Waters) et ATLANTIS HILIC (Waters). Les caractéristiques de ces colonnes sont présentées paragraphe 3.2.3.4.

- Choix de la phase mobile

La phase mobile a été choisie en fonction du type de colonne utilisée et en tenant compte des contraintes imposées par la détection par SM (pas de force ionique trop importante)

- Choix du pH de la phase mobile

C'est un paramètre important à tester, de lui va dépendre le caractère ionisé de la molécule et donc sa rétention sur la colonne de séparation.

- Choix du débit

Le débit a été choisi en fonction des contraintes imposées par la détection par SM. Les modes d'élution isocratique et gradient ont été testés.

3.3.2.3.3. Optimisation de la détection

- Choix du mode de détection

Le mode de détection positif a été retenu (Xu *et al.*, 2001) avec une source d'ionisation par électrospray (ESI). La position de la sonde ESI (x, y, z) a été optimisée avec une solution de GCV.

- Paramétrage de la spectrométrie de masse

Le gaz de collision utilisé a été l'argon à 1.5 mTorr. La température du capillaire et la tension du spray ont été fixées à 3.0 kV et 300 °C respectivement.

Les pressions des gaz « sheath » (azote), auxiliaires et « sweep » ont été maintenues à 30, 10 et 5 unités (unités arbitraires données par le logiciel X-Calibur).

L'azote a été produit par un générateur de gaz (D Hunter, Dukesway, UK) couplé à un compresseur d'air (Jun-Air, Norresundby, Danemark)

Les transitions étudiées ont été les suivantes : 256/152 pour le GCV et 226/152 pour l'ACV (Figure 30). Les ions $[M+H]^+$ du GCV et de l'ACV traversent le premier (Q1) et le troisième (Q3) quadrupole avec des largeurs de pics de 0.7 Th

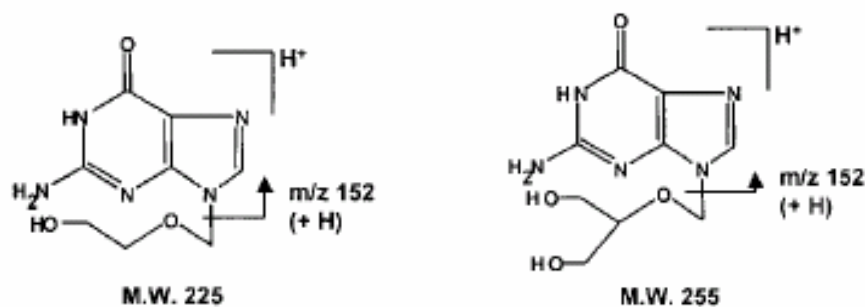


Figure 30 : Ionisation du GCV (m/z = 256) et ACV (m/z = 226) et formation des ions fils (mode positif, ESI).

Les composés ont été quantifiés par mode SRM (Selected Reaction Monitoring) et les runs HPLC ont pu être dans certains cas divisés en plusieurs segments avec une détection de transitions spécifiques dans chacun des segments. La SMR a été réalisée avec une largeur (m/z) et une durée de scan de 1 et 0.5 s respectivement. L'énergie de collision a été fixée à 18 eV après optimisation.

3.3.2.3.4. Principaux essais réalisés

ESSAI 1

But : Comparer 2 colonnes de chromatographie sur la qualité de la séparation du GCV et ACV.

- Préparation des culots cellulaires et paramètres de la séparation

Les modalités sont présentées sur le tableau XXVII.

Tableau XXVII : Préparation de l'échantillon et conditions chromatographiques retenues (Essai I).

Préparation échantillon	Composition phase mobile	Débit	Colonne de séparation
300 µL de prise + 300 µl acétonitrile Vortex 30 secondes exactement Centrifugation 10000 t/min 10 min à + 10°C Evaporation sous azote Reprise par 100µl d'eau Injection de 10 µL	A : Eau + acide formique 0,1% (90%) B : acétonitrile + acide formique 0,1% (10%)	200 µl/min Gradient d'élution**	X TERRA 18 rp 2,1 x 250 mm (5µm)
300 µL de prise + 300 µl acétonitrile Vortex 30 secondes exactement Centrifugation 10000 t/min 10 min à + 10°C Evaporation sous azote 50°C Reprise par 100µl d'eau Injection de 10µL	Eau + acide formique 0,1% (95%) acétonitrile + acide formique 0,1% (5%)	200 µl/min Elution isocratique	ATLANTIS dC18 2,1 x 150 mm (3 µm)

**Les modalités du gradient d'élution utilisé avec la colonne chromatographiques XTERRA 18 rp sont présentées sur le tableau XXVIII.

Tableau XXVIII : Modalités du gradient d'élution.

Durée (min)	% A	% B
0	90	10
3	90	10
3,5	30	70
5	30	70
5,1	90	10
10	90	10

- Préparation des solutions pures dans l'eau ultra pure.

A partir de solutions d'ACV et GCV à 1 mg/ml, des dilutions successives ont été réalisées pour obtenir une concentration finale en GCV et ACV à 50 ng/ml.

ESSAI 2

But : Analyser sur des cellules traitées par le GCV (1 et 10 mg/L) pendant 36 heures les concentrations intracellulaires en GCV et en dérivés phosphorylés (échantillons traités et non traités par la phosphatase alcaline) ; analyser l'influence du nombre de cellules sur la qualité du signal. L'essai a été réalisé sur des cellules non infectées, donc les concentrations attendues en GCVTP sont très faibles.

Les modalités de préparation des échantillons sont présentées sur les tableaux XXIX et.XXX.

Tableau XXIX : Préparation de l'échantillon et conditions chromatographiques retenues (Essai II).

Préparation echantillon	Composition phase mobile	Débit	Colonne de séparation
300 µL de prise + 300 µl acétonitrile	Eau + acide formique 0,1% (95%)	200 µl/min	ATLANTIS dC18
Vortex 30 secondes exactement	acétonitrile + Acide formique 0,1% (5%)	Elution isocratique	2,1 x 150 mm (3µm)
Centrifugation 10000 t/min			
10 min à + 10°C			
Evaporation sous azote			
Reprise par 100µl d'eau			
Injection de 10µL			

Tableau XXX : Caractéristiques des échantillons analysés (Essai II).

*Tampon phosphate pH 7-8 (pour action de la phosphatase alcaline)

Les échantillons ont été évaporés et repris avec de l'eau + acide formique 0,1% (100 µL)

Echantillon	GCV (mg/L)	[c] cellulaire (cell/ml)	Phosphatase Alcaline	Prise d'essai (ml)	Acétonitrile (ml)
1A	1	25×10^6	NON	250	300
2A	10	25×10^6	NON	250	300
3A	0	25×10^6	NON	250	300
1B	1	10×10^6	OUI	250	300 + 50*
2B	10	10×10^6	OUI	250	300 + 50*
3B	0	10×10^6	OUI	250	300 + 50*
1C	1	25×10^6	OUI	250	300 + 50*
2C	10	25×10^6	OUI	250	300 + 50*
3C	0	25×10^6	OUI	250	300 + 50*
1D	1	10×10^6	NON	250	300
2D	10	10×10^6	NON	250	300
3D	0	10×10^6	NON	250	300

ESSAI 3

But : Evaluer l'impact de la température sur la répétabilité des essais sur culots cellulaires et analyser le problème d'interférence de l'ACV (EI) sur des échantillons cellulaires non chargés.

- Préparation d'une solution ACV + GCV pour surcharger les culots cellulaires non exposés au GCV : dilutions successives d'une solution concentrée de manière à obtenir une concentration finale d'ACV (EI) + GCV dans l'acétonitrile à 15 ng/mL.
- Culot cellulaire : à partir des culots cellulaires à $2,5 \times 10^7$ cell/mL, diluer pour obtenir une concentration cellulaire de 10×10^6 cell/mL.
- Préparation de l'échantillon : Les modalités de préparation de l'échantillon et de la phase mobile sont présentées dans le tableau XXXI.
- Optimisation de la température d'évaporation de l'échantillon (pour améliorer la répétabilité) : les essais réalisés sont présentés dans le tableau XXXII.
- Interférence de l'ACV sur les culots cellulaires : les culots cellulaires sont chargés et non chargés en ACV pour évaluer l'impact de l'ajout de cette molécule sur le signal (pics chromatographiques interférents).
- Interférence de l'ACV sur des solutions aqueuses : une gamme dans l'eau a été réalisée avec des concentrations de 0, 50, 500, 5000 ng/mL de GCV + ACV et la même gamme avec le GCV seul.

Tableau XXXI : Préparation de l'échantillon et conditions chromatographiques retenues (Essai III).

Préparation echantillon	Composition phase mobile	Débit	Colonne de séparation
250 µL de prise + 300 µl acétonitrile	Eau + acide formique 0,1% (95%)	200 µl/min	ATLANTIS dC18 2,1x150 mm
Vortex 30 secondes exactement	acétonitrile + acide formique 0,1% (5%)	isocratique	(3µm)
Centrifugation à 10000 t/min 10 min à + 10°C			
Evaporation sous azote			
Reprise par 100µl d'eau			
Injection de 10µL			

Tableau XXXII : Caractéristiques des échantillons analysés pour l'essai d'optimisation de la température d'évaporation.

* culots cellulaires non chargés+ACN seul.

30°C	40°C	50°C
Tube 30	Tube 40	Tube 50
Tube 30'	Tube 40'	Tube 50'
Tube 30''	Tube 40''	Tube 50''
Témoin 30*	Témoin 40*	Témoin 50*

ESSAI 4

But : Tester un autre type de colonne de séparation: ATLANTIS HILIC pour optimiser la séparation des composés et la qualité des pics chromatographiques (interférences avec les autres colonnes).

La colonne Atlantis HILIC présente une phase stationnaire différente de celles utilisées jusque là: la silice est greffée par des groupements polaires avec des mécanismes d'échanges d'ions possibles entre les groupements silanols chargés et les fonctions amines des bases nucléosidiques à pH acide. Cette colonne permet d'améliorer la rétention des molécules polaires parfois très peu retenues par les colonnes phase inverse classiques. La phase mobile utilisée est une phase mobile majoritairement organique avec l'avantage après extraction de pouvoir s'affranchir de l'étape d'évaporation (si concentration non nécessaire) et reprise par une phase acqueuse comme avec les colonnes phase inverse utilisées précédemment.

Paramètres testés

- L'influence de la colonne sur la qualité de la séparation (interférences aux temps de rétention du GCV et ACV retrouvée sur les précédents essais)
- L'influence de l'étape d'évaporation sur le signal : les phases mobiles organiques étant compatibles avec les colonnes HILIC, la molécule peut être directement injectée après extraction liquide/liquide. Les échantillons évaporés n'ont pas été concentrés et ils ont été repris après évaporation par le même volume de départ (pour comparer aux échantillons non évaporés).
- L'influence de la prise d'essai sur la séparation et la sensibilité
- Préparation des échantillons
- Culot cellulaire : les culots cellulaires à $2,5 \times 10^7$ cell/mL ont été dilués pour obtenir une concentration cellulaire de 10×10^6 cell/mL. Les modalités de préparation des culots cellulaires sont présentées dans le tableau XXXIII.

Tableau XXXIII : Préparation de l'échantillon et conditions chromatographiques retenues (Essai I).

Préparation échantillon	Composition phase mobile	Débit	Colonne de séparation
100 µL prise + 300 µL acétonitrile Ou 50 µL prise + 150 µL acétonitrile Vortex 30 secondes exactement Centrifugation à 10000 t/min 10 min à + 10°C Evaporation sous azote à 40°C ou pas d'évaporation Reprise par 400 µL d'eau si évaporation Injection de 5 µL	● Tampon acétate d'ammonium 100 mM pH5 (12%) ● Eau (8%) ● Acétonitrile (80%)	200 µL/min Elution isocratique	ATLANTIS HILIC 2,1x100 mm (3µm)

Les cellules ont été exposées au GCV à 1 mg/L et 10 mg/L pendant 36 heures. Les caractéristiques des échantillons sont présentées dans le tableau XXXIV.

Tableau XXXIV : Caractéristiques des échantillons analysés pour l'essai d'optimisation de la prise d'essai et de l'influence de l'étape d'évaporation (Essai IV).

ACN=acétonitrile, Tubes A : exposition au GCV 1 mg/L, Tubes B : exposition au GCV 10 mg/L

Tubes	A1*	A2*	A3*	A4*	B1**	B2*	B3**	B4**
						*		
Volume échantillon (µL)	50	50	100	100	50	50	100	100
Volume ACN (µL)	150	150	300 ou 400	300 ou 400	150	150	300 ou 400	300 ou 400
	Evaporation et reprise par 400 µL d'eau	—	Evaporation et reprise par 400 µL d'eau	—	Evaporation et reprise par 400 µL d'eau	—	Evaporation et reprise par 400 µL d'eau	—

En plus :

- Réalisation d'un témoin non chargé pour chaque type de préparation (10x10⁶ cell/mL)

- Des culots cellulaires non exposés au GCV sont chargés en GCV et ACV (tableau XXXV) pour réaliser une gamme dynamique (même gamme de concentrations que pour les solutions pures).

Tableau XXXV Préparation de la gamme de GCV : culots cellulaires chargés.

C1	4 µg/mL	ACN/METOH
C2	400 ng/mL (100+900)	Culot cellulaire
C3	200 ng/mL (250+250)	Culot cellulaire
C4	40 ng/ mL (100+400)	Culot cellulaire
C5	4 ng/ mL (50+450)	Culot cellulaire
C6	0,4 ng/ mL (50+450)	Culot cellulaire

Puis les échantillons sont traités comme les solutions pures (comme proportions $\frac{3}{4}$ ACN+EI/ $\frac{1}{4}$ GCV pour l'extraction, les concentrations finales en GCV sont de: 100 ng/mL, 50 ng/mL, 10 ng/mL, 1 ng/mL, 0,1 ng/mL)

- Gammes dans solutions pures 0.1 à 100 ng/mL (0.39 à 390 pmol/mL)

La première dilution est réalisée dans du méthanol puis dans un mélange ACN/méthanol (75/25).

Solutions pures à préparer : Ces solutions sont obtenues par dilution successive de solutions concentrées à 1 mg/mL.

- ACV: solution finale à 20 ng/ml. (Comme proportions $\frac{3}{4}$ ACN+EI/ $\frac{1}{4}$ GCV pour l'extraction, les concentrations finales en AVC sont 15 ng/mL).

- GCV : solutions finales à 400 ng/mL, 200 ng/mL, 40 ng/mL, 4 ng/mL, 0,400 ng/mL. (Comme proportions $\frac{3}{4}$ ACN+EI/ $\frac{1}{4}$ GCV pour l'extraction, les concentrations finales en GCV sont de: 100 ng/mL, 50 ng/mL, 10 ng/mL, 1 ng/mL, 0,1 ng/mL)

3.3.2.4. *Dosage direct des dérivés mono, di et triphosphate du GCV*

3.3.2.4.1. Molécules d'intérêt à doser

Le GCVTP est la molécule principale à analyser. La détection du GCVMP présente également un intérêt (la première phosphorylation du GCV représentant l'étape limitante et virale dépendante à la formation des dérivés TP actifs). Le dosage des nucléotides endogènes pourrait montrer l'impact du GCVTP sur leurs concentrations intracellulaires. Comme il n'existe pas de standards de GCVMP et GCVTP, il a été décidé de réaliser la mise au point et la validation de la méthode analytique avec des molécules de structure très voisines : GMP (ou dGMP) et dGTP (standards marqués). La quantification des molécules d'intérêt (GCVMP et GCVTP) dans les culots cellulaires sera réalisée en comparant le signal à celui des nucléotides endogènes GMP (ou dGMP) et dGTP.

3.3.2.4.2. Optimisation du nombre de cellules à analyser

cf paragraphe 3.3.2.3.1

3.3.2.4.3. Choix des étalons internes

Comme des nucléotides monophosphorylés et triphosphorylés sont à quantifier, il a été décidé de choisir 2 étalons internes pour correspondre à ces 2 formes de nucléotides. Le bromoATP a été retenu pour sa structure proche des nucléotides triphosphorylés (GCVTP en particulier). Le bromo-GMP a été retenu pour sa structure proche des nucléotides monophosphorylés (dGMP, GMP et GCVMP).

3.3.2.4.4. Paramètres de séparation (HPLC)

- Phase mobile

La composition retenue pour la phase mobile est la suivante :

Solution A : diéthylamine (DEA) + hexylamine dans eau (le pH est ajusté avec de l'acide acétique)

Solution B : eau (50%)/acétonitrile (50%)

- pH de la phase mobile

Tableau XXXVI Détermination du pH de la phase mobile pour la séparation HPLC des nucléotides endogènes : quelques références bibliographiques.

Ref	pH	Molécules	Méthode d'analyse
Moore 2000	Non renseigné	LamivudineTP, zidovudineTP, stavudineTP Avec mesure indirecte après digestion par PHOSPHATASE	HPLC/MS (mode positif)
Agbaria 2001	"native pH"	GCVTP	HPLC
Becher 2002	11,5	ZidovudineTP	HPLC/MS (mode négatif)
Becher 2002	11,5	StavudineTP, lamivudineTP	HPLC/MS (mode négatif)
Fung 2001	7	CarbovirMP, DP et TP	HPLC/MS (mode positif)
Pruvost 2001	11,5	StavudineP	HPLC/MS (mode négatif)

- Débit de la phase mobile

Le débit a été fixé à 250 µL/min et un gradient d'élution a été retenu pour la séparation des nucléotides. Différents gradients ont été testés et ils sont présentés pour chaque essai réalisé (paragraphe 3.3.2.4.7).

- Colonne de séparation

La colonne retenue a été la colonne Hypercarb (150 x 2.1 mm ; 3 µm), composée de particules sphériques de carbone graphite poreux (CPG). Le support est composé de feuillets plans de cycles hexagonaux de carbone. La sélectivité de cette colonne diffère de celle des silices greffées ou des polymères hydrophobes car les mécanismes de rétention impliquent plusieurs types d'interactions hydrophobes et électroniques. La rétention de composés hydrophiles est due aux propriétés électroniques spécifiques de la surface du carbone graphite. Le CPG permet aussi la rétention d'anions organiques (nucléotides) à la manière d'un échangeur d'ions.

Finallement le support Hypercarb semble être adapté à la séparation des nucléotides. Le fait que la rétention soit induite par plusieurs facteurs permet d'envisager des conditions opératoires acceptables pour la spectrométrie de masse. La colonne Hypercarb n'agissant pas exclusivement comme un échangeur d'anions, il est possible d'utiliser des solutions tamponnées moins salines qu'avec d'autres supports. De plus, sa capacité à obtenir des sélectivités structurales importantes pourrait être un atout pour séparer des molécules de structures très proches (nucléotides du GCV et nucléotides endogènes).

3.3.2.4.5. Paramètres de détection (spectrométrie de masse)

- Transitions retenues

Une recherche bibliographique (tableau XXXVII) sur les molécules de structure proche des dérivés phosphorylés du GCV a permis de choisir les transitions les plus probables pour le GCVMP et le GCVTP (aucune étude à notre connaissance n'a détecté les dérivés phosphorylés du GCV en spectrométrie de masse)

Tableau XXXVII Quelques études sur la détection de nucléotides par SM et transitions retenues.

Ref	Molécule	Transition	Méthode d'analyse
Moore 2000	Lamivudine	230,2/112,2	HPLC/MS
	zidovudine	268,2/127,2	Mode positif
	stavudine	225,2/127,2	
Becher 2002 (a)	ZidovudineTP	506/159	HPLC/MS
			Mode négatif
Becher 2002 (b)	StavudineTP	463/159	HPLC/MS
	lamivudineTP	468/159	Mode négatif
Fung 2001	CarbovirMP	328/152	HPLC/MS
	CarbovirDP	408/152	Mode négatif
	CarbovirTP	488/152	
Pruvost 2001	StavudineMP	303/125	HPLC/MS
	StavudineDP	383/159	Mode négatif
	StavudineTP	463/159	

En mode négatif, le groupement pyrophosphate $m/z = 159$ est utilisé pour la détection des dérivés DP et TP. Pour le dérivé MP, la fragmentation se fait au niveau de la base aboutissant à un $m/z = 125$ (Pruvost et al., 2001, Becher et al., 2002).

En mode positif, carbovirMP, DP et TP (qui possèdent une structure très proche des dérivés phosphorylés du GCV) donnent le même ion fils que le GCV après fragmentation (Fung et al., 2001). Chaque groupement pyrophosphate ajoute + 80 à la masse initiale du GCV.

Les transitions retenues pour le GCV et ses métabolites phosphorylés sont présentées dans le tableau XXXVIII. Ce tableau regroupe les transitions retenues pour la détection de l'ensemble des nucléotides (endogènes ou dérivés nucléotidiques du GCV).

Tableau XXXVIII : Transitions retenues pour la détection des nucléotides intracellulaires.
DEA = diéthylamine (contre ion).

Nom de la molécule	Masse moléculaire (g/mol)	Mode SM1	Ion parent/fils	(+) DEA positif	adduit en	Mode SM2	Ion parent/fils
GCV	255.00	+	256/152	329/152		(-)	(254/150)
dCMP	307.16	-	306/110	-			
dUMP	308.15	-	307,04/111	-			
TMP	322.17	-	321,05/125	-			
CMP	323.16	-	322/110	-			
UMP	324.15	-	323/111	-			
dAMP	331.19	-	330/134	-			
GCV MP	335.00	+	336/152	409/152		(-)	(334/150)
AMP	347.19	+	348/136,12	421/136,12			
dGMP	347.19	+	348/152,1	421/152,1			
dGMP*	362.11	+	363/162	436/162			
GMP	363.19	+	464/152	437/152	-		362/150
GMP*	378.11	+	379/162	452/162			
dCDP	387.16	-	386,07/158,99	-			
dUDP	388.15	-	387,04/158,99	-			
TDP	402.17	-	401,05/158,99	-			
CDP	403.16	-	402.08/158.99	-			
UDP	404.15	-	403/158,99	-			
dADP	411.19	-	410,07/158,99	-			
GCV DP	415.00	+	416/152	489/152		(-)	(414/159)
ADP	427.19	+	428/136,12	501/136,12			
dGDP	427.19	+	428/152,1	501/152,1			
BrGMP	442.12	+	443/231	516/231			
GDP	443.19	+	444/152	517/152	-		442/158,99
dCTP	467.16	-	466,07/158,99	-			
dUTP	468.15	-	467.04/158.99	-			
dCTP*	479.16	-	478/158.99	-			
TTP	482.17	-	481,05/158,99	-			
CTP	483.16	-	482,08/158,99	-			

UTP	484.15	-	483/158,99	-		
dATP	491.19	-	490,07/158,99	-		
TTP*	494.17	-	493/158,99	-		
GCVTP	495.00	+	496/152	569/152	(-)	(494/159)
UTP*	495.15	-	494/158,99	-		
CTP*	495.16	-	494/158,99	-		
dATP*	506.19	-	505/158,99	-		
ATP	507.19	+	508/136,12	581/136,12		
dGTP	507.19	+	508/152,1	581/152,1		
ATP*	522.19	+	523/146,12	596,2/146,12		
dGTP*	522.2	+	523/162,1	596,2/162,1		
GTP	523.19	-	522,03/158,99	-		
GTP*	538.19	-	537/158,99	-		
BrATP	586.09	+	587,9/215,99	660,9/215,99	-	585,9/158,99

L'ensemble de ces transitions n'a pas été étudiée pour l'instant sur un essai unique ; aussi un tableau rassemblant les transitions spécifiques étudiées sera présenté pour chaque essai réalisé.

- Choix du mode de détection

Les modes de détection positifs et négatifs ont été testés.

- Autres paramètres de spectrométrie

Le gaz de collision utilisé a été l'argon à 1.5 mTorr. La température du capillaire et la tension du spray ont été fixées à 3.0 kV et 300 °C respectivement.

Les pressions des gaz « sheath » (azote), auxiliaires et « sweep » ont été maintenues à 30, 10 et 5 unités (unités en relation avec des unités arbitraires données par le logiciel X-Calibur).

L'azote était produit par un générateur de gaz (D Hunter, Dukesway, UK) couplé à un compresseur d'air (Jun-Air, Norresundby, Danemark)

Les ions $[M+H]^+$ traversent le premier (Q1) et le troisième (Q3) quadrupole avec des largeurs de pics de 0.5 et 0.7 Th respectivement.

Les composés ont été quantifiés par en mode SRM (Selected Reaction Monitoring) et les runs HPLC ont pu être dans certains cas divisés en plusieurs segments avec une détection de transitions spécifique dans chacun des segments. La SMR a été réalisée avec une largeur (m/z) et une durée de scan de 0.01 et 0.3 s respectivement

L'énergie de collision retenue pour l'ensemble des essais était de 30 eV.

3.3.2.4.6. Modalités d'extraction SPE (colonne Oasis HLB WAX[®]) et de concentration de l'échantillon

La colonne OASIS HLB-WAX a été retenue pour l'étape de SPE. Elle présente les propriétés suivantes : le support est un copolymère macroporeux réalisé à partir d'un équilibre entre 2 monomères : le divinylbenzène (lipophile) et le N vinylpyrrolidone (hydrophile) ; il est en plus fonctionnalisé avec un groupement pipérazine.

En milieu acide, les groupements pipérazine ($pK_a = 6.7$) sont protonés et permettent des interactions ioniques fortes avec les nucléotides anioniques. Ces supports redeviennent neutres en milieu basique. Aussi, lors de l'étape d'élution, les nucléotides chargés négativement ne sont plus retenus par le support et sont élués par une phase mobile riche en solvant organique si le pH utilisé est basique. Ce support mixte offre l'avantage de retenir les composés anioniques selon leur charge et selon leur hydrophobie ; de plus, l'extrait se retrouve dans une phase organique en présence d'une faible concentration en sels.

Les étapes successives de l'extraction SPE sur la colonne Oasis HLB WAX[®] ont été les suivantes :

- conditionnement de la colonne:

La colonne a été conditionnée par 2 ml de méthanol suivis de 2 ml d'eau

- dépôt de l'échantillon

2 ml de l'échantillon ont été déposés sur la colonne

- lavage

Le dépôt a été lavé par la solution de lavage suivante : 2 ml d'un mélange méthanol/ acétate d'ammonium 50 mM pH 4.5 (50/50 ; v/v %)

A ce pH, les nucléotides entrent en interaction avec la phase stationnaire ionisée et sont retenus sur la cartouche

- Elution des nucléotides

Les nucléotides ont été élués par la solution suivante : 2 ml d'un mélange méthanol /eau/hydroxyde d'ammonium (80/16.7/3.3 ; v/v/v %)

A ce pH, les nucléotides se décrochent de la phase stationnaire non ionisée et sont donc élués

- Evaporation au bain marie sous azote à 37°C

- Reprise du résidu sec par 100 μ l de tampon A diéthylamine (DEA) + hexylamine pH 10 dans eau).

ESSAI 1

But : Détecter le GCV, ses nucléotides et les nucléotides endogènes avec de nouvelles conditions chromatographiques (conditions optimisées pour le dosage des nucléotides endogènes)

Les essais ont été réalisés sur des solutions pures chargées en GCV et sur des culots cellulaires.

- Solution de GCV dans eau

A partir de solution à 1 mg/mL, dilutions successives pour obtenir des concentrations finales à 10 ng/ml dans la phase mobile (tampon A)

- Culots cellulaires

Cellules non exposées au GCV

Cellules exposées 15 heures au GCV (1 et 10 mg/L)

Cellules exposées 40 heures au GCV (1 et 10 mg/L)

Les concentrations cellulaires de chaque échantillon sont présentées dans le tableau XXXIX.

Tableau XXXIX : Nombre de cellules par culot (volume de 0.5 mL).

TTT = traitement

	GCV 0 mg/L	GCV 1 mg/L	GCV 10 mg/L
TTT 15 H	3,44 X10 ⁶	3,04 X10 ⁶	3,17 X10 ⁶
TTT 40 H	3,96 X10 ⁶	3,18 X10 ⁶	3,17 X10 ⁶

- Préparation de l'échantillon

500 µl déposé sur la cartouche SPE, extraction (cf paragraphe 3.3.2.4.6) et évaporation (plus d'1 heure) puis reprise avec 100µL de phase mobile (tampon A).

- Gradient d'élution

Les modalités du gradient d'élution utilisé sont présentées dans le tableau XL.

Tableau XL : Modalités du gradient d'élution (Essai 1).

A = diéthylamine (DEA) + hexylamine dans eau (le pH est ajusté avec de l'acide acétique)

B = eau (50%)/acétonitrile (50%)

Durée (min)	% A	% B
0	100	0
20	0	100
21	100	0
36	100	0

- Transitions et mode de détection

Les transitions et mode de détection retenus sont présentés dans le tableau XLI.

Tableau XLI : Transitions retenues et mode de détection SM (Essai 1).

DEA = diéthylamine (contre ion)

Molécule	Transition étudiée	Avec DEA (m/z = 72)	Mode de détection
GCV	256/152	329/152	positif
ACV	226/152	299/152	positif
GCVTP	496/152	569/152	positif
GCVDP	416/152	489/152	positif
GCVMP	336/152	409/152	positif
ATP	508/136	581/136	positif
dGTP	508/152	581/152	positif
GTP	522/159	-	negatif
GCVTP	494/159	-	negatif

ESSAI 2

But : Détecter sur du matériel cellulaire « frais » (cellules extraites dans les 15 jours précédant l'essai) le GCV et ses nucléotides dans les mêmes conditions chromatographiques et de détection que l'ESSAI 1.

Les essais ont été réalisés sur des solutions pures chargées en GCV et sur des culots cellulaires.

- Solution de GCV et ACV dans eau

A partir de solution à 1 mg/mL, dilutions successives pour obtenir des concentrations finales à 10 ng/ml dans la phase mobile (tampon A)

- Culots cellulaires

Les caractéristiques et les concentrations cellulaires de chaque échantillon analysé sont présentées dans le tableau XLII.

Tableau XLII : Nombre de cellules par culot (volume de 0.5 mL) ; cellules exposées au ganciclovir (GCV) pendant 24 heures.

TTT = traitement ; CMV 0,1 signifie que les cellules ont été infectées par le CMV à une MOI de 0.1 ou 0.1 pfu pour 1 cellule.

	GCV 0 mg/L	GCV 1 mg/L	GCV 10 mg/L
CMV0	9,69E+06	9,33E+06	9,75E+06
CMV 0,1	1,01E+07	1,01E+07	9,92E+06
CMV 0,01	1,01E+07	8,74E+06	8,27E+06

- Les modalités de préparation de l'échantillon ont été les mêmes que celles de l'ESSAI 1.

Les fractions de lavage et les éluats de la SPE ont été analysés en HPLC/MS de manière à évaluer les pertes en dérivés phosphorylés du GCV dans le lavage.

- Les modalités du gradient d'élution utilisé sont présentées dans le tableau XLIII.

Tableau XLIII : Modalités du gradient d'élution (Essai 2).

A = diéthylamine (DEA) + hexylamine dans eau (le pH est ajusté avec de l'acide acétique)

B = eau (50%)/acétonitrile (50%)

Durée (min)	% A	% B
0	100	0
15	76	24
35	76	24
45	50	50
46	0	100
47	100	0

- Les transitions et mode de détection utilisés en SM sont rassemblés dans le tableau XLIV.

Tableau XLIV : Transitions retenues et mode de détection SM (Essai 2).

DEA = diéthylamine (contre ion)

Molécule	Transition étudiée	Avec DEA (m/z = 72)	Mode de détection
GCV	256/152	329/152	positif
ACV	226/152	299/152	positif
GCVTP	496/152	569/152	positif
GCVDP	416/152	489/152	positif
GCVMP	336/152	409/152	positif
ATP	508/136	581/136	positif
dGTP	508/152	581/152	positif
GTP	522/159		negatif
GCVTP	494/159	-	negatif

ESSAI 3

But : Détecter sur du matériel cellulaire « frais » (cellules extraites dans les 21 jours précédant l'essai) le GCV et ses nucléotides dans les mêmes conditions chromatographiques et de détection que l'Essai 1.

Les essais ont été réalisés sur des solutions pures chargées en GCV et sur des culots cellulaires.

L'Essai 3 a été réalisé dans les mêmes conditions de préparation, séparation et détection que l'Essai 2 mais à un jour différent d'analyse.

Les caractéristiques des culots cellulaires analysés sont présentées dans le tableau XLV.

Tableau XLV : Nombre de cellules par culot cellulaires (volume de 0.5 mL), cellules exposées au GCV pendant 48 heures.

TTT = traitement ; CMV 0,1= cellules infectées par le CMV à une MOI de 0,1 pfu par cellules, CMV 0,01= cellules infectées par le CMV à une MOI de 0,01 pfu par cellules

		GCV 0 mg/L	GCV 1 mg/L	GCV 10 mg/L
TTT 48H	CMV 0	1,10E+07E	1,18E+07E	1,07E+07E
TTT 48 H	CMV 0,1	1,17E+07E	1,18E+07E	9,93E+06E
TTT 48 H	CMV 0,01	1,13E+07E	1,19E+07E	1,17E+07E

ESSAI 4

But : Détecter des nucléotides marqués et le GCV sur des solutions pures. Détecter des nucléotides marqués, nucléotides endogènes non marqués et GCVMP, DP et TP sur des culots cellulaires (non exposés au GCV) chargés. Optimiser l'étape de lavage lors de l'extraction SPE de manière à ne pas éluer dans cette phase les nucléotides MP et DP, calculer le rendement d'extraction et vérifier l'absence de perte lors du dépôt sur la cartouche SPE de l'extrait cellulaire.

Les transitions et mode de détection utilisés en SM sont rassemblés dans le tableau XLVI.

Tableau XLVI : Transitions retenues et mode de détection (Essai 4).

DEA = diéthylamine (contre ion) ; segment 1 : 10 à 38 min ; segment 2 : 38 à 65 min.

Molécule	Transition étudiée	Avec DEA (m/z = 72)	Segment de détection	Mode de détection
GCVo	256/152	329/152	1	positif
dGMP*	363/162	436/162	1	positif
GMP*	379/162	452/162	1	positif
ATP	508/152	581/136	2	positif
BrGMP	443/231	516/231	2	Positif
Br ATP	588/216	660/216	2	Positif
GTP*	537/159	-	2	negatif
GTP	522/159	-	2	negatif
dGTP*	523/162	596/162	2	positif
dGTP	508/136	581/152	2	positif

Préparation des solutions chargées en nucléotides dans eau

Des solutions de GMP*, dGMP*, GTP*, dGTP*, BrGMP, BrATP et GCV à 1µmol/ml (dans eau) ont été réalisées.

A partir des solution à 1mM (ou 1 µmol/ml) de GTP*, dGTP*, GMP*, dGMP*, la solution mère suivante a été réalisée :

16 µL de GMP*

32 µL de dGMP* dilué au 1/50ème

32 µL de GTP*

32 µL de dGTP* dilué au 1/50ème

+688 H₂O = 800 µL solution mère nucléotides marqués.

Préparation de la solution d'étalon interne TP (BrATP)

A partir de la solution à 1µmol/mL : 190 µl Br ATP + 40µl d'eau

Préparation de la solution d'étalon interne MP (BrGMP)

A partir de la solution à 1µmol/mL : dilution au 1/100 : solution à 10 nmol/ml EIMP S2

Préparation de la solution de GCV

A partir de la solution à 1µmol/mL (S1)

Dilution au 1/100 : solution à 10 nmol/mL GCV (S2) puis dilution au 1/10 : solution à 1nmol/mL (S3)

Préparation de la solution finale (SF) : 50 µl de la solution mère nucléotides marqués + 10µl de EIMP S2+ 10 µL de EI TP + 10 µL de GCVS3 + 20 µL de tampon **A**.

La composition de la solution finale est présentée sur le tableau XLVII.

Tableau XLVII : Quantité de nucléotides contenue dans la solution finale (SF).

Molécule	Quantités injectées en pmol (dans 10 µL)	Quantités en pmol dans solution finale SF (100 µL)
GTP*	200	2000
dGTP*	4	40
GMP*	100	1000
dGMP*	4	40
BrGMP	10	100
GCV	1	10

Injecter (10µL) de la solution finale (SF) 3 fois

- Optimisation de la SPE

A 500 μL du surnageant culot ($5 \cdot 10^6$ cellules) (après centrifugation) ont été ajoutés :

50 μL de solution mère de nucléotides marqués (décrite ci-dessus)

+ 10 μL BrATP

+ 10 μL BrGMP

+ 10 μL GCV°

+ 1420 μL d'eau milliQ

La méthode utilisée étant initialement adaptée pour la purification des nucléotides triphosphate, il était nécessaire de s'assurer que la proportion de méthanol à 50 % ne décroche pas les nucléotides monophosphates, moins fortement liés à la phase stationnaire (que les nucléotides DP ou TP).

La méthode d'extraction SPE a été la même que celle des essais précédents ; par contre, différentes compositions de la solution de lavage ont été testées (cf tableau XLVIII). L'analyse HPLC/MS a été réalisée à la fois sur la fraction de lavage et l'éluat pour apprécier les pourcentages de perte dans le lavage.

Tableau XLVIII Composition de la solution de lavage pour l'extraction SPE.

Composition de la solution de lavage	MeOH 50%	MeOH 40%	MeOH 30%	MeOH 20%
ELUAT	$5 \cdot 10^6$ cellules	$5 \cdot 10^6$ cellules	$5 \cdot 10^6$ cellules	$5 \cdot 10^6$ cellules
LAVAGE	$5 \cdot 10^6$ cellules	$5 \cdot 10^6$ cellules	$5 \cdot 10^6$ cellules	$5 \cdot 10^6$ cellules

- Rendement d'extraction

Le principe est de passer des cellules non chargées sur SPE et ajouter les métabolites juste avant l'injection. Le signal est comparé à celui obtenu avec des cellules chargées avant extraction SPE.

Préparation et extraction des cellules non chargées : 500 μL du surnageant du culot cellulaire ($5 \cdot 10^6$ cellules) (après centrifugation)

+ 1500 μL d'eau ultra pure

Reprise par 100 μL de la solution finale de nucléotides (SF).

- Perte des nucléotides lors du dépôt sur la cartouche SPE

L'objectif était de vérifier qu'après conditionnement de la cartouche SPE et passage de l'échantillon, on ne retrouvait pas les métabolites dans la solution de dépôt éluée.

Réalisation d'un dépôt dans solution méthanolique pour GCV, GMP*, dGMP*, EITP, EIMP, GTP*, dGTP*.

Préparation de l'échantillon

500 µL de MeOH 60% (à la place du surnageant culot cellulaire)

+ 100 µL solution finale de nucléotides (SF)

+ 1500 µL d'eau milliQ

Les cartouches ont été conditionnées, la solution méthanolique a été déposée, récupérée, évaporée et injectée.

3.4. Résultats et Discussion

3.4.1. Etude de la stabilité des concentrations en GCV dans le milieu de culture cellulaire

3.4.1.1. Stabilité des concentrations sur 24 heures

Les résultats de l'étude de stabilité des concentrations extracellulaires pendant 24 heures après ajout du GCV ont montré une absence de dégradation du produit avec des concentrations stables dans le temps (cf tableau L). Les concentrations intracellulaires n'étaient pas détectables (<LDD 20 ng/ml, données non montrées), ce qui confirme la nécessité d'utiliser une méthode de dosage plus sensible pour la détection du GCV et de ses dérivés phosphorylés (HPLC/MS).

Tableau XLIX : Stabilité des concentrations en GCV (5 et 15 mg/L) pendant 24 heures dans le milieu extra-cellulaire à 37°C.

RPMI : milieu de culture « pur » sans cellules ; EC, milieu extra cellulaire

Echantillon	Durée d'incubation (heures)	Concentration initiale (mg/L)	Fraction dosée	Concentration mesurée (mg/L)
1	0	5	NaCl 0,9%	4,72
2	0	5	RPMI	5,14
3	4	5	RPMI	4,95
4	6	5	RPMI	5,01
5	24	5	RPMI	4,86
6	0	0	EC	0,23
7	0	5	EC	5,36
8	4	5	EC	5,04
9	6	5	EC	5,07
10	24	5	EC	5,12
11	4	15	EC	14,58
12	6	15	EC	14,00
13	24	15	EC	14,20

3.4.1.2. Stabilité des concentrations sur 14 jours (336 heures)

Les résultats de l'étude de stabilité sur la période totale prévue de l'étude sont présentés sur le tableau LI.

Il a été noté une absence de dégradation du produit sur la période d'incubation prévue (336 heures). Ces résultats de stabilité nous permettent donc de nous affranchir d'un changement de milieu régulier pour maintenir des concentrations en GCV constantes et de simplifier le protocole de l'essai.

Tableau LI : Stabilité des concentrations en GCV (10 mg/L) pendant 14 jours dans le milieu extra-cellulaire à 37°C.

EC : extracellulaire

Echantillon	Durée d'incubation (heures)	Concentration initiale (mg/L)	Fraction dosée	Concentration mesurée (mg/L)
1	0	0	EC	0,38
2	0	10	EC	9,65
3	24	10	EC	9,45
4	48	10	EC	9,01
5	72	10	EC	9,46
6	96	10	EC	9,23
7	120	10	EC	9,24
8	144	10	EC	9,20
9	168	10	EC	8,76
10	192	10	EC	9,22
11	216	10	EC	9,26
12	240	10	EC	9,65
13	264	10	EC	9,45
14	288	10	EC	9,01
11	312	10	EC	9,46
12	336	10	EC	9,23

3.4.2. Titration du CMV AD169 (P30) : dose infectieuse avant infection des cellules lymphoblastoïdes

La charge virale obtenue est de 10^9 pfu/ml. Cette charge infectieuse est suffisamment importante pour infecter les cellules lymphoblastoïdes.

D'après la bibliographie, les doses infectieuses classiquement retrouvées varient de 0,1 à 10 MOI (ou 0,1 à 10 particules infectieuses pour une cellule).

La charge infectieuse de la souche produite pourra être diluée de manière à obtenir la dose infectieuse optimale. Un titre infectieux plus faible aurait limité le panel des doses à tester sur les cellules lymphoblastoïdes. La concentration cellulaire étant de 10^7 cellules par ml au moment de l'infection, il fallait obtenir un titre au moins 10 x supérieur (10^8) pour pouvoir tester les MOI les plus élevées (10).

3.4.3. Dose infectieuse et durée de l'infection avant traitement par GCV

3.4.3.1. Essai préliminaire pour définir la dose infectieuse optimale: Infection des cellules pendant 14 jours et sans exposition au GCV (ESSAI a)

Les résultats de la charge virale en fonction de la dose infectieuse initiale et de la durée après infection sont présentés sur la figure 31 (souche A).

Les résultats correspondant des numérations des cellules lymphoblastoïdes sont présentés sur la figure 32 (souche A). Des résultats identiques ont été retrouvés sur la souche B (données non montrées).

L'infection par le CMV des cellules lymphoblastoïdes était bien effective : pour preuve les charges virales qui ont augmenté entre J0 (2 heures après l'infection) et J7 pour les doses infectieuses de 1 et 10 MOI.

Par contre, la diminution de la charge virale entre J7 et J15 peut être corrélée à une diminution de la croissance cellulaire ; elle montre que l'infection de 14 jours sans traitement est trop toxique sur les cellules. Cette première durée d'infection (sans traitement) avait été choisie pour « approcher » les conditions cliniques mais elle devra être raccourcie pour préserver la croissance cellulaire.

Ces résultats sont à prendre avec précaution, car les cellules témoin non infectées montrent aussi une croissance diminuée entre J7 et J14; suggérant des conditions de cultures non optimales pour des durées supérieures à 7 jours.

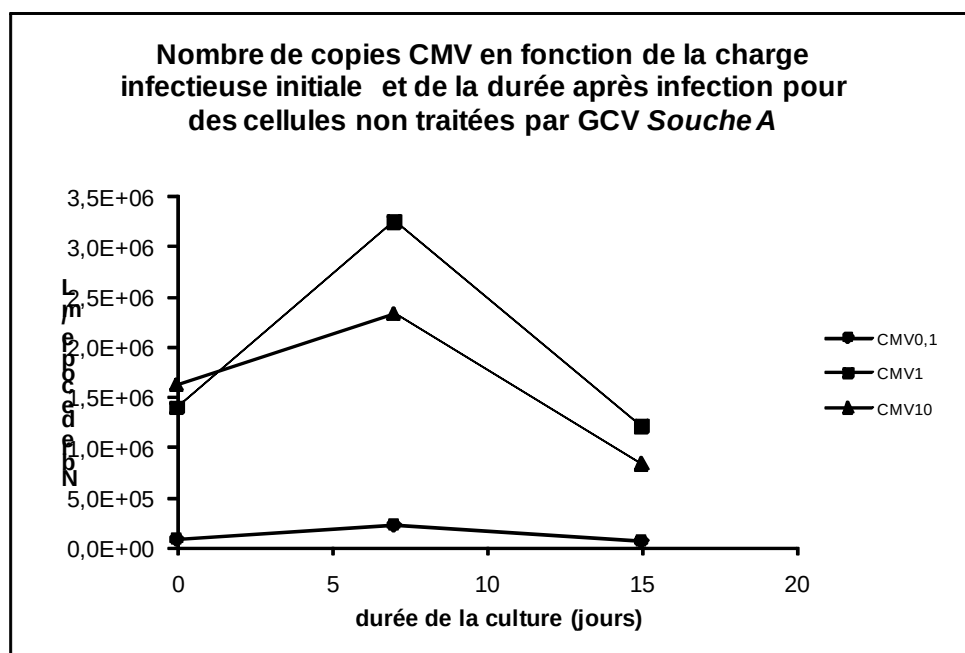


Figure 31 : Effet de la dose infectieuse initiale sur la charge virale CMV- cellules non traitées par le GCV

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été infectées par le CMV à J0 à la dose infectieuse de 0,1MOI (●), 1 MOI (■), 10 MOI (▲). La culture cellulaire a été poursuivie pendant 14 jours au total. Le nombre de copies virales (réalisé par PCR) a été mesuré à J0 et J2. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures.

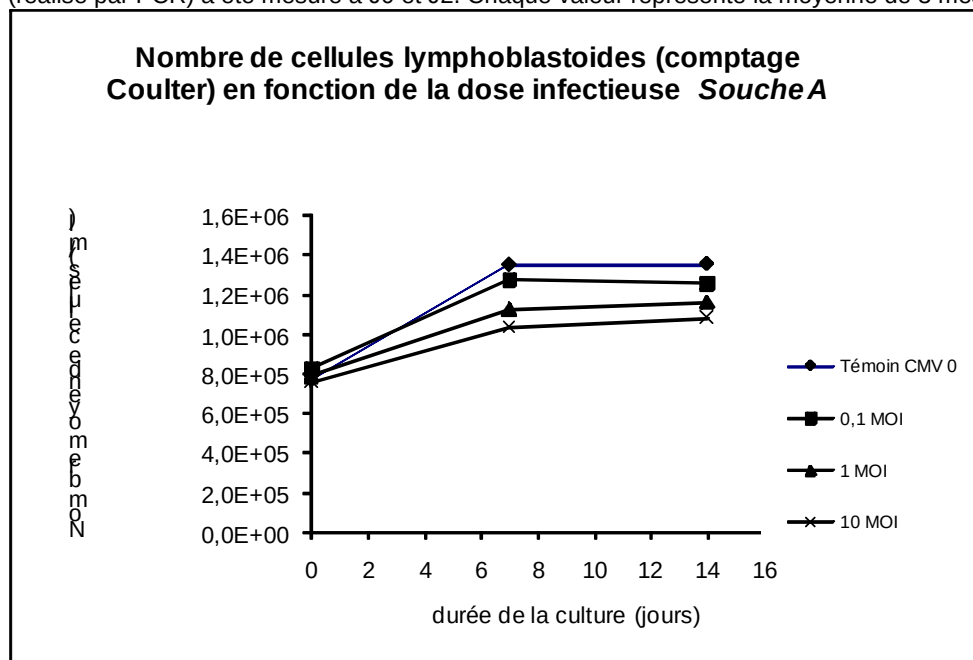


Figure 32 Effet de la dose infectieuse en CMV sur la croissance cellulaire – cellules non exposées au GCV.

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été infectées par le CMV à J0 à la dose infectieuse de 0,1MOI (■), 1 MOI (▲), 10 MOI (×). En plus, des cellules « témoin » n'ont pas été infectées par le CMV (◆). La culture cellulaire a

été poursuivie pendant 14 jours au total. Le nombre de cellules (mesure par compteur Coulter) a été mesuré à J0, J7, et J14. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures.

3.4.3.2. Essai préliminaire pour définir la dose infectieuse optimale : Infection des cellules (2 heures de contact) suivi d'un traitement par GCV : ESSAI b

Les résultats (figure 33) ont montré que la charge virale à 48 heures dépendait de la concentration d'exposition au GCV : la charge virale était la plus importante pour des cellules non traitées (GCV 0), alors qu'elle diminuait pour les cellules traitées à 1 mg/L et 10 mg/L

Ces résultats étaient retrouvés pour les 2 doses infectieuses testées : 0,1 et 0,01 MOI.

Il semble se dégager un effet de l'intensité du traitement des cellules par GCV sur la charge virale en CMV, ces résultats devant être confirmés sur des durées plus longues (7 jours et 14 jours). Ces résultats confirment que l'exposition au GCV des cellules immédiatement après l'infection par le CMV est à conserver pour les essais futurs.

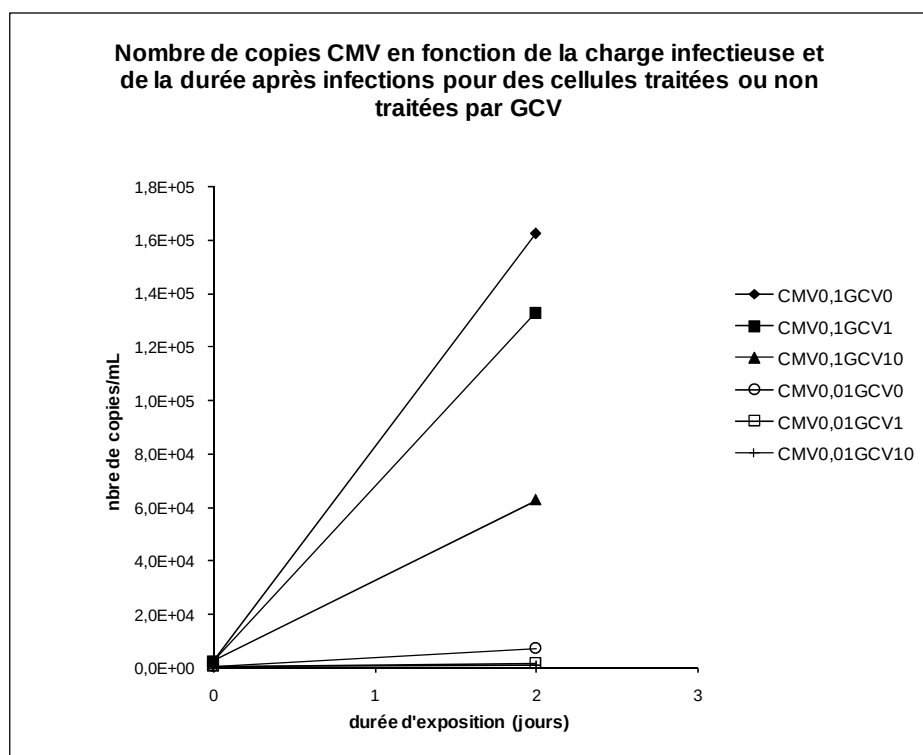


Figure 33 Effet de la dose infectieuse en CMV et de l'exposition au GCV sur la croissance cellulaire.

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été infectées par le CMV à J0 à la dose infectieuse de 0,1MOI ou 0,01 MOI. Après 2 heures de contacts, les cellules ont été lavées et immédiatement exposées au GCV (1 et 10 mg/L). En plus, des cellules « témoin » n'ont pas été exposées au GCV. La culture cellulaire a été poursuivie pendant 2 jours au total. Le nombre de copies virales (réalisé par PCR) a été mesuré à J0, et J2. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures.

3.4.4. Essais préliminaires de toxicité

3.4.4.1. Etude de toxicité du GCV seul : Essai A

Les résultats sont présentés pour une des souches étudiées (souche B), des résultats similaires ont été obtenus pour la souche A (données non montrées).

L'exposition au GCV était associée à une inhibition de la croissance cellulaire à J7 et J14. L'effet est dépendant de la concentration (de 1 à 20 mg/L), comme le montrent les figures 34b et c. Une exposition brève de 48 heures avec le GCV ne semble pas influencer la croissance cellulaire (figure 34a), quelle que soit la concentration en GCV testée.

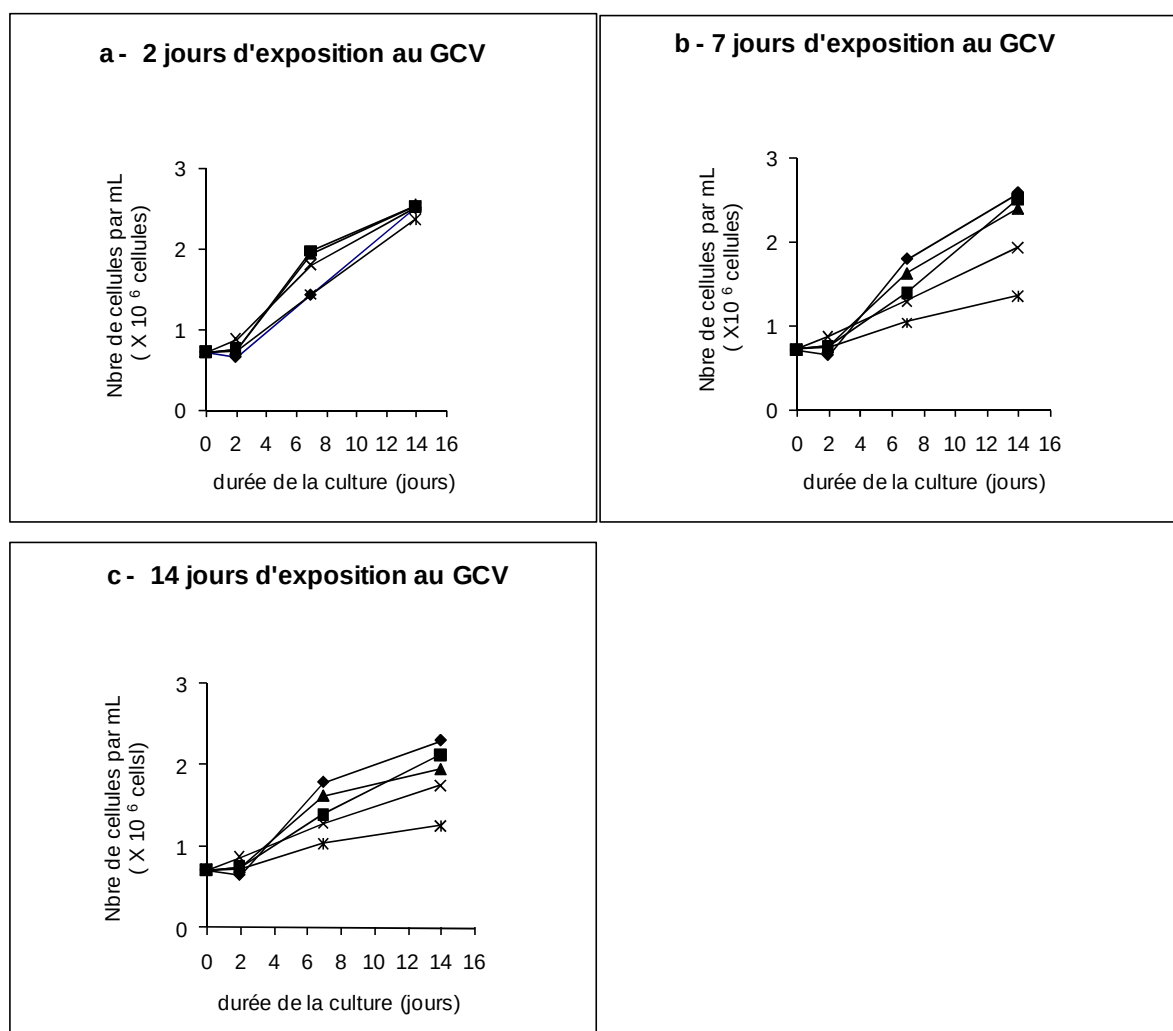


Figure 34 : Effet du ganciclovir (GCV) sur la croissance cellulaire.

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été exposées au GCV pendant 2 jours (a), 7 jours (b), ou 14 jours (c). Les concentrations d'exposition ont été 1 mg/L (■), 5 mg/L (▲), 10 mg/L (×), ou 20 mg/L (*). En plus, des cellules

« témoin » n'ont pas été exposées au GCV (◆). La culture cellulaire a été poursuivie pendant 14 jours au total (indépendamment de la durée d'exposition au GCV). Le nombre de cellules (mesure par compteur Coulter) a été mesuré à J0, J2, J7, et J14. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures.

Une corrélation entre la concentration en GCV et la toxicité cellulaire pour des durées d'exposition supérieures à 48 heures (figure 35b et c ; $p < 0,001$) a été mise en évidence ; par contre, la toxicité ne semblait pas liée à la concentration d'exposition au GCV pour les plus courtes durées d'exposition (24 et 48 heures ; figure 35a).

Pour compléter ces résultats, la comparaison de la dose la plus faible 1 mg/L avec la dose la plus forte 20 mg/L a montré une différence significative uniquement pour des expositions supérieures ou égales à 1 semaine ($p = 0,04$ pour des expositions de 7 et 14 jours). Ils sont présentés sur les figures 36a (nombre absolu) et 36b (exprimé en pourcentage de cellules par rapport à des cellules témoin non exposées au GCV).

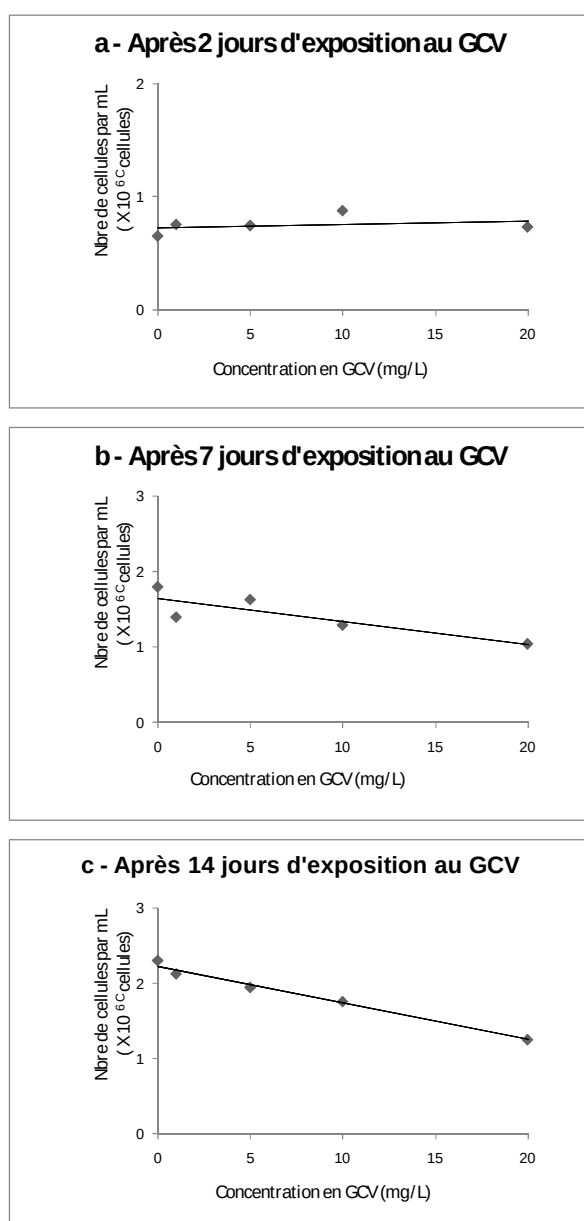


Figure 35 : Nombre de cellules versus concentration en ganciclovir (GCV).

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été exposées au GCV pendant 2 jours (a), 7 jours (b), ou 14 jours (c). Le nombre de cellules a été mesuré (compteur Coulter) à la fin de l'exposition au GCV (2, 7 ou 14 jours). Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures. L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: (a) $r^2 = 0.091$, test de la pente, $p = 0.27$; (b) $r^2 = 0.73$, test de la pente, $p < 0.001$; (c) $r^2 = 0.98$, test de la pente $p < 0.001$.

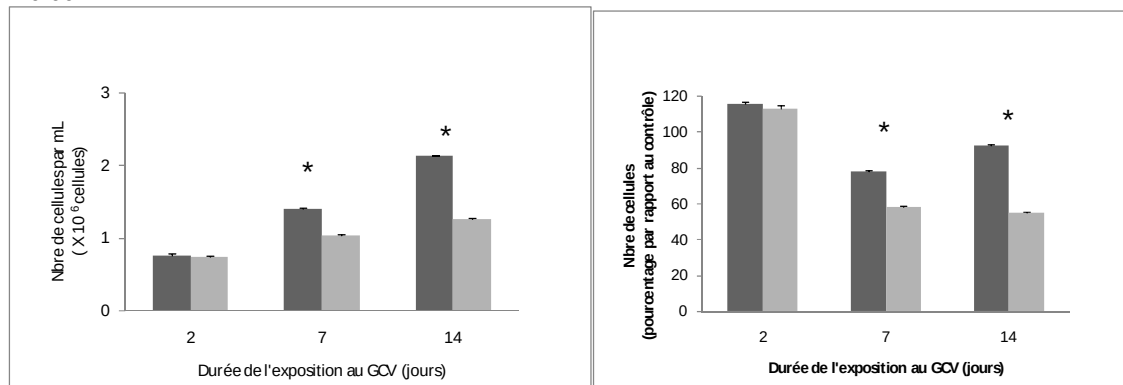


Figure 36 : Effet de la concentration en ganciclovir (GCV) sur la toxicité cellulaire pour des durées d'exposition de 2, 7 ou 14 jours.

Les concentrations d'exposition ont été de 1 mg/L (■) ou 20 mg/L (□) de GCV. Les cellules lymphoblastoïdes B ont été incubées avec le GCV pendant 2, 7, ou 14 jours. Le nombre de cellules a été mesuré (compteur Coulter) à J2, J7 ou J14. Les valeurs sont exprimées en moyenne ($n = 3$). * $p = 0.04$.

Les résultats sont exprimés en nombre de cellules (à gauche) ou en rapport du nombre cellules exposées au GCV par rapport à des cellules témoin non exposées (à droite)

Enfin la figure 37 souligne le caractère temps-dépendant de la toxicité du GCV sur les cellules lymphoblastoïdes. L'effet temps dépendant est retrouvé pour toutes les concentrations ($p = 0,01$ pour 1 mg/L, et $p < 0,001$ pour 5, 10 et 20 mg/L).

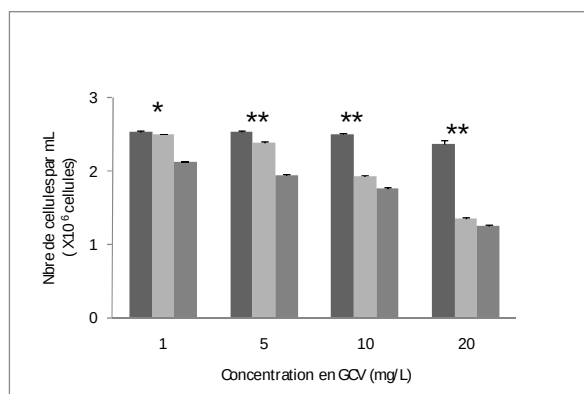


Figure 37 : Effet de la durée d'exposition au GCV sur la toxicité cellulaire pour des concentrations croissantes en ganciclovir (GCV).

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été incubées avec le GCV pendant 2 (■), 7 (□), ou 14 (▒) jours. Le nombre de cellules a été mesuré (compteur Coulter) après 14 jours de culture cellulaire (indépendamment de la durée d'exposition au GCV). Les valeurs sont exprimées en moyenne + erreur type ($n = 3$)

* $p = 0.015$, ** $p < 0.001$

Les résultats sont exprimés en nombre de cellules (à gauche) ou en rapport du nombre cellules exposées au GCV par rapport à des cellules témoin non exposées (à droite)

Les résultats de cet essai préliminaire ont montré que des expositions courtes sont moins toxiques que des expositions longues, et pour des concentrations de 1 à 20 mg/L.

Il est intéressant de remarquer qu'une exposition intense à 20 mg/L pendant 48 heures n'est finalement pas plus toxique qu'une exposition à 1 mg/L (concentrations résiduelles cibles en routine clinique).

Ces premiers résultats *in vitro* montrent l'intérêt de limiter la durée d'exposition pour préserver les cellules sanguines de la toxicité du GCV.

Peu de publications ont montré les avantages d'un traitement intensif versus les schémas conventionnels utilisés en pratique clinique. Nous avons publié un cas clinique sur la réussite d'un traitement « haute dose » (24 mg/kg/j) pendant une durée de 5 jours de GCV dans le cadre d'une infection à HHV6 (sans effets indésirables).

Les principales études *in vitro* (comme déjà vu dans la partie bibliographique) concernent surtout des cultures de cellules non hématologiques (cellules fibroblastiques, cellules Vero et HELA). Ces études, réalisées avant la commercialisation du GCV avaient pour principal objectif d'étudier le métabolisme du GCV sur des cellules infectées et non infectées par le CMV (ou l'HSV). On peut cependant supposer que la toxicité du GCV est due, au moins en partie, à son métabolite actif le GCVTP et il était donc intéressant de comparer la transformation du GCV en GCVTP sur des cellules infectées et non infectées.

St Clair *et al.* (1987) ont rapporté des taux indétectables de GCVTP dans les cellules non infectées y compris pour des concentrations élevées en GCV, comparables aux concentrations de notre étude (25 mg/L).

D'autres publications (Smee *et al.*, 1985) ont montré des taux 100 fois plus faibles dans les cellules non infectées par rapport aux cellules infectées (pour des concentrations d'exposition comprises entre 2,5 et 12,5 mg/L).

Par contre, Biron *et al.* (1985) ont observé un taux équivalent en GCVTP dans des cellules infectées et non infectées pendant les 48 premières heures après ajout du GCV dans le milieu de culture, puis une proportion 10 fois supérieure dans les cellules infectées versus non infectées (pour des concentrations d'exposition à 12,5 mg/L. Freitas *et al.* (1984) retrouvent cette même proportion de GCVTP entre cellules infectées et non infectées.

Enfin, l'inhibition de la croissance cellulaire de cellules non infectées a été rapportée par Smee *et al.* (1987) pour des concentrations de 30 mg/L (supérieures à celles de notre étude). Finalement ces modèles cellulaires semblent être moins sensibles à la toxicité du GCV que les cellules hématologiques.

Justement, peu d'études de toxicité sur cellules hématologiques ont été publiées. Nous n'avons retrouvé que 3 études dans la littérature. Elles concernaient des PBMC, des précurseurs CFU-granulocyte/macrophage et des précurseurs BFU-E. L'équipe de Somadossi a montré que le GCV avait une toxicité directe et dose dépendante sur les cellules de la lignée myélocytaire et erythrocytaire pour des concentrations d'exposition très faibles (0,8 mg/L) (Somadossi *et al.*, 1987) ; Heagy *et al.* ont montré que le GCV inhibait l'incorporation de la thymidine dans la cellule dès 1 mg/L (Heagy *et al.*, 1991). Il est important de souligner que ces concentrations toxiques *in vitro* correspondent exactement aux concentrations cibles recherchées en thérapeutique.

Un certain nombre d'hypothèses pourrait expliquer cette toxicité élevée : une conversion accrue du GCV en GCVTP dans ce type de cellules malgré l'absence de kinases *viro* induites logiquement nécessaires. Il faut aussi supposer qu'une fois le GCVTP formé il entrerait en interaction avec l'ADN polymérase cellulaire (pour laquelle il présente une affinité beaucoup plus faible que pour la polymérase virale). Les cellules progénitrices de la moelle osseuse se multipliant très rapidement par rapport à d'autres types de cellules (Heagy *et al.*, 1991 ; Somadossi *et al.*, 1987), cela pourrait s'accompagner d'une augmentation du métabolisme et de l'activité des kinases cellulaires.

A chaque fois ces études ont porté sur la relation concentration-effet et se sont placées à un temps donné, sans caractériser la relation entre la durée d'exposition et la toxicité.

Les limites et les perspectives suite à ces premiers résultats sont les suivantes :

Nous n'avons effectué pour ce travail que des mesures par compteur Coulter des cellules à différents jours d'analyse : il sera nécessaire de les compléter par des mesures de la viabilité cellulaire (appareil malheureusement non disponible pour les premières analyses). Le GCVTP n'a pas pu être quantifié ; cette quantification aurait aidé à la compréhension du mécanisme de toxicité. Enfin, cette étude a été réalisée sur des cellules lymphoblastoïdes non infectées par le CMV, aussi il est prévu de mener le même type d'étude sur cellules infectées de manière à voir si des expositions plus courtes (et plus intenses) sont aussi efficaces que des expositions « classiques » (longues et de faible intensité) en terme d'efficacité anti virale (cf. essais C et D).

Enfin même si l'étude a porté sur 2 souches distinctes, il est nécessaire de réitérer cet essai de toxicité de manière à confirmer ces premiers résultats intéressants (cf résultats essais B et D).

3.4.4.2. Etude de toxicité du GCV seul : Essai B

3.4.4.2.1. Numérations cellulaires par compteur COULTER (cellules totales)

Les résultats présentés sur les figures 38 à 41 ont confirmé ceux de l'essai A, avec cependant des différences moins marquées (entre les intensités et entre les durées de traitement).

L'exposition au GCV était associée à une inhibition de la croissance cellulaire à J7 et J14, dépendante de la concentration (de 1 à 20 mg/L), comme le montrent les figures 39c et d. Une exposition brève jusqu'à 48 heures avec le GCV ne semblait pas influencer la croissance cellulaire (figure 39a et b), quelque soit la concentration en GCV.

Une corrélation entre la concentration en GCV et la toxicité cellulaire pour des durées d'exposition supérieures à 7 jours (figure 40d, $p = 0,02$) a été montrée, par contre la toxicité ne semblait pas liée à la concentration d'exposition au GCV pour des durées d'exposition allant jusqu'à 7 jours (figure 40a, b et c).

La comparaison de la dose la plus faible 1mg/L avec la dose la plus forte 20 mg/L montrait une différence uniquement pour des expositions supérieures ou égales à 1 semaine (pour des expositions de 7 et 14 jours). Cette différence n'était pas statistiquement significative (figure 41).

Enfin la figure 42 souligne le caractère temps-dépendant de la toxicité du GCV uniquement pour l'exposition la plus forte en GCV (20mg/L). L'effet temps dépendant n'a pas été retrouvé pour les autres concentrations (1, 5, 10 et 20 mg/L) alors que c'était le cas dans l'essai A.

Ces résultats sont dans l'ensemble nettement moins significatifs que ceux de l'essai A, avec plusieurs explications possibles : d'abord, les milieux ont été dilués à J7 (de manière à maintenir une concentration cellulaire $< 1,5 \times 10^6$ cell/ml) et il n'a pas été ajouté de GCV dans les flacons de la série 4 exposés pendant 14 jours), donc la concentration de GCV a été diluée avec le risque de minorer les résultats de toxicité. Ensuite la viabilité des cellules était moins bonne que pour l'essai précédent (mais donnée non vérifiable car les mesures de viabilité n'avaient pas été effectuées)

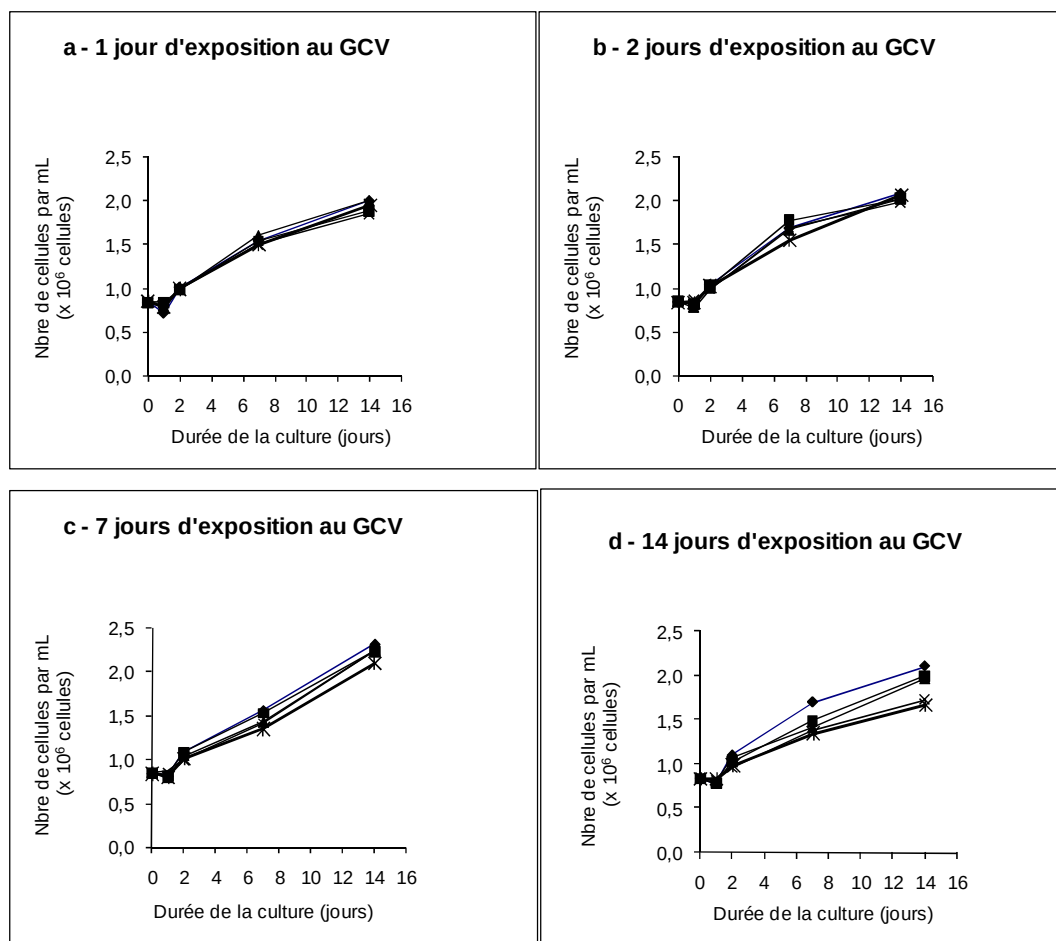


Figure 38 Effet du ganciclovir (GCV) sur la croissance cellulaire.

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été exposées au GCV pendant 1 jour (a), 2 jours (b), 7 jours (c) ou 14 jours (d). Les concentrations d'exposition ont été de 1 mg/L (■), 5 mg/L (▲), 10 mg/L (×), ou 20 mg/L (*). En plus, des cellules « témoin » n'ont pas été exposées au GCV (◆). La culture cellulaire a été poursuivie pendant 14 jours au total (indépendamment de la durée d'exposition au GCV). Le nombre de cellules (mesure par compteur Coulter) a été mesuré à J0, J1, J2, J7, et J14. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures.

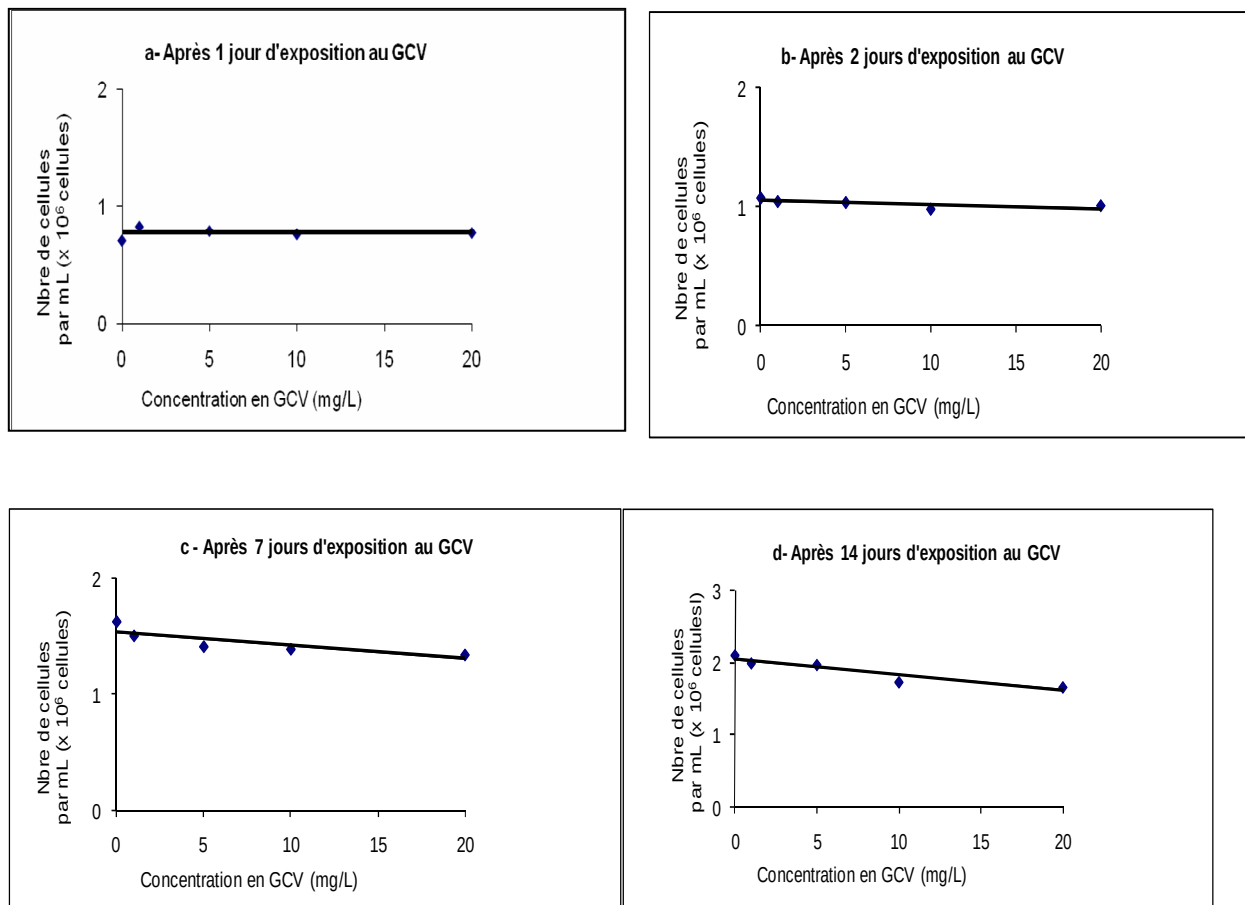


Figure 39 Nombre de cellules versus concentration en ganciclovir (GCV).

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été exposées au GCV pendant 1 jour (a), 2 jours (b), 7 jours (c), ou 14 jours (d). Le nombre de cellules a été mesuré (compteur Coulter) à la fin de l'exposition au GCV (2, 7 ou 14 jours). Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures. L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: (a) $r^2 = 0.0022$, NS ; (b) $r^2 = 0.49$, NS; (c) $r^2 = 0.70$, NS ; (d) $r^2 = 0.88$, $p=0.02$

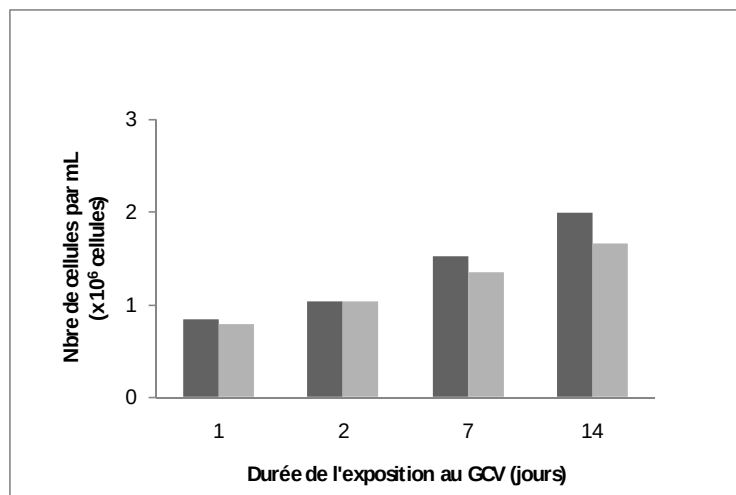


Figure 40 Effet de la concentration en ganciclovir (GCV) sur la toxicité cellulaire pour des durées d'exposition de 1, 2, 7 ou 14 jours.

Les concentrations d'exposition ont été de 1 mg/L (■) ou 20 mg/L (▒) de GCV. Les cellules lymphoblastoïdes B ont été incubées avec le GCV pendant 1, 2, 7, ou 14 jours. Le nombre de cellules a été mesuré (compteur Coulter) à J2, J7 ou J14. Les valeurs sont exprimées en moyenne ($n = 3$). Résultats non statistiquement significatifs.

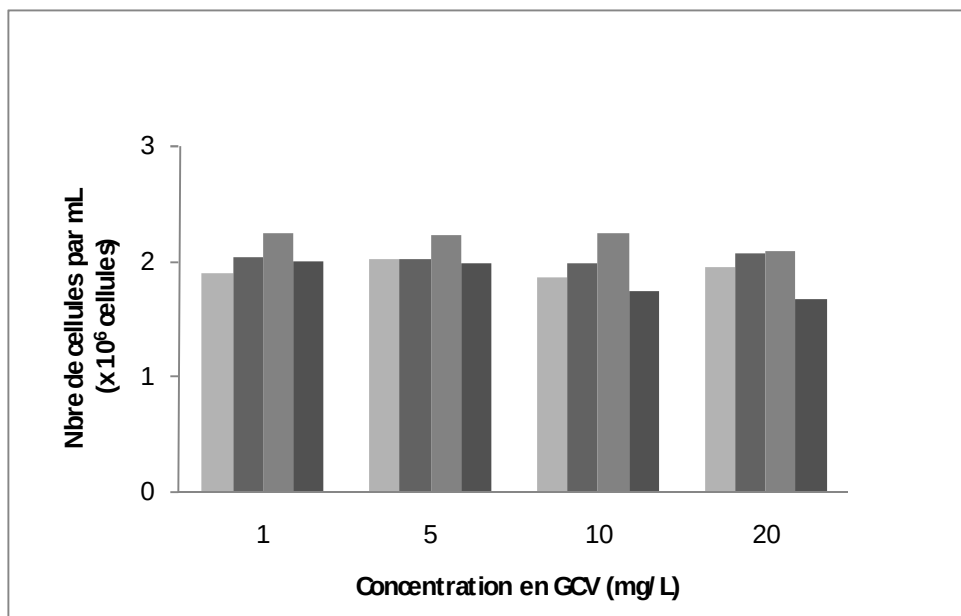


Figure 41 : Effet de la durée d'exposition au GCV sur la toxicité cellulaire pour des concentrations croissantes en ganciclovir (GCV).

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été incubées avec le GCV pendant 1 (■), 2 (■), 7 (■), ou 14 (■) jours. Le nombre de cellules a été mesuré (compteur Coulter) après 14 jours de culture cellulaire (indépendamment de la durée d'exposition au GCV). Les valeurs sont exprimées en moyenne + erreur type (n = 3). Les résultats sont exprimés en nombre de cellules (à gauche) ou en rapport du nombre cellules exposées au GCV par rapport à des cellules témoin non exposées (à droite). Résultats non statistiquement significatifs.

3.4.4.2.2. Numération cellulaire par compteur ADAM (cellules totales et cellules vivantes)

La figure 42 représente les profils du nombre total de cellules comptées par ADAM d'une part et par COULTER d'autre part en fonction de la concentration en GCV. Les courbes de régression montraient des profils parallèles, avec des valeurs mesurées inférieures pour ADAM par rapport à COULTER. La méthode de comptage par ADAM étant plus spécifique (intercalant fluorescent dans l'ADN cellulaire et comptage de cette fluorescence), il était logique que le nombre de cellules comptées soit inférieur à celui obtenu par compteur coulter (qui compte uniquement à partir de la taille des particules). Les résultats montraient également à J14 (comme montré pour le comptage COULTER sur la figure 40) une corrélation entre concentration et nombre de cellules mesurées pour l'exposition au GCV la plus longue (14 jours). Aucune corrélation n'a été retrouvée à J14 pour les durées d'expositions inférieures à 14 jours (1, 2 et 7 jours).

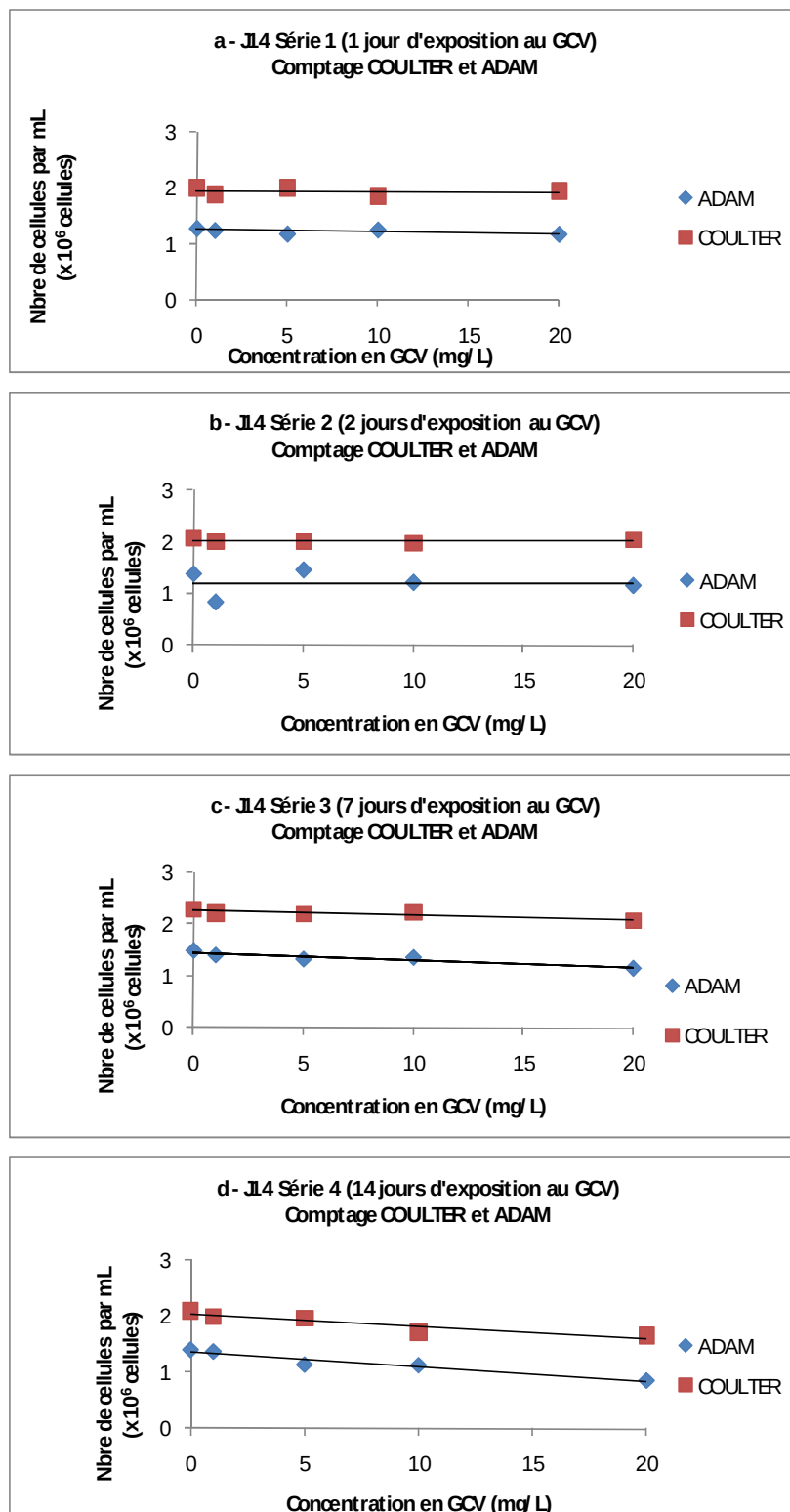


Figure 42 : Nombre de cellules versus concentration en GCV après 14 jours de culture cellulaire

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été exposées au GCV pendant 1 jour (a), 2 jours (b), 7 jours (c), ou 14 jours (d). Le nombre de cellules a été mesuré (compteur Coulter et ADAM) à J14. Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures. L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: (a) $r^2 = 0,079$ et $0,49$ pour Adam et Coulter respectivement, NS ; (b) $r^2 = 0,0064$ et $0,003$, NS ; (c) $r^2 = 0,81$ et $0,87$; $p = 0,004$ et $0,002$ respectivement ; (d) $r^2 = 0,88$ et $0,94$, $p = 0,02$ et $0,007$ respectivement.

Les figures 43 et 44 montrent que les 2 méthodes de comptage du nombre total de cellules (ADAM et COULTER) sont équivalentes.

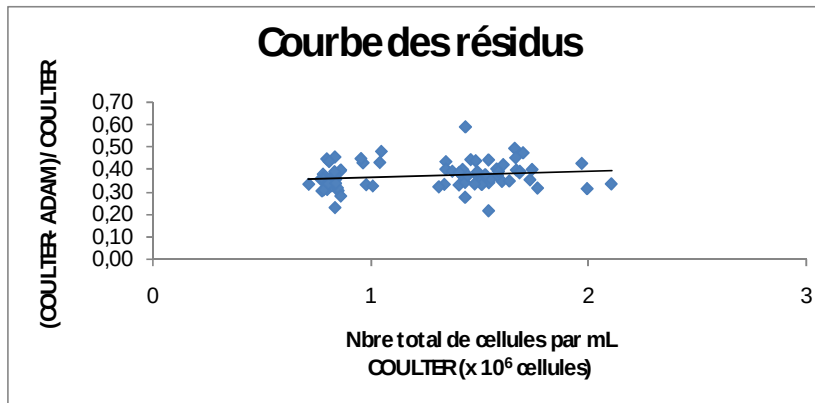


Figure 43 : Nombre total de cellules mesuré par COULTER versus ADAM : erreur résiduelle entre les 2 méthodes de mesure.

Toutes les mesures du nombre de cellules réalisées par les 2 méthodes ont été comparées. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures.

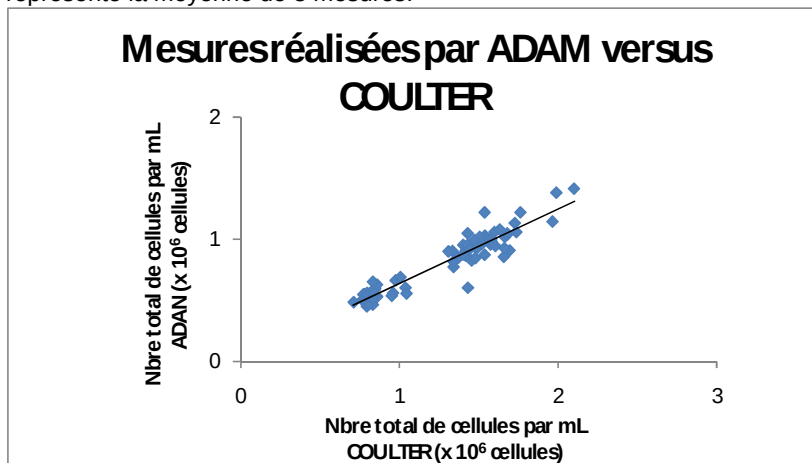


Figure 44 : Corrélation entre le nombre total de cellules mesuré par COULTER versus ADAM.

Toutes les mesures du nombre de cellules réalisées par les 2 méthodes ont été comparées. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures. L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: $r^2 = 0.90$, $p < 0,001$.

La viabilité cellulaire (figure 45) n'était que peu corrélée au nombre total de cellules mesurées au moins pour les cellules exposées jusqu'à 7 jours au GCV. Pour les cellules exposées pendant 14 jours, la viabilité augmentait avec le nombre total de cellules comptées (mais résultats non significatifs).

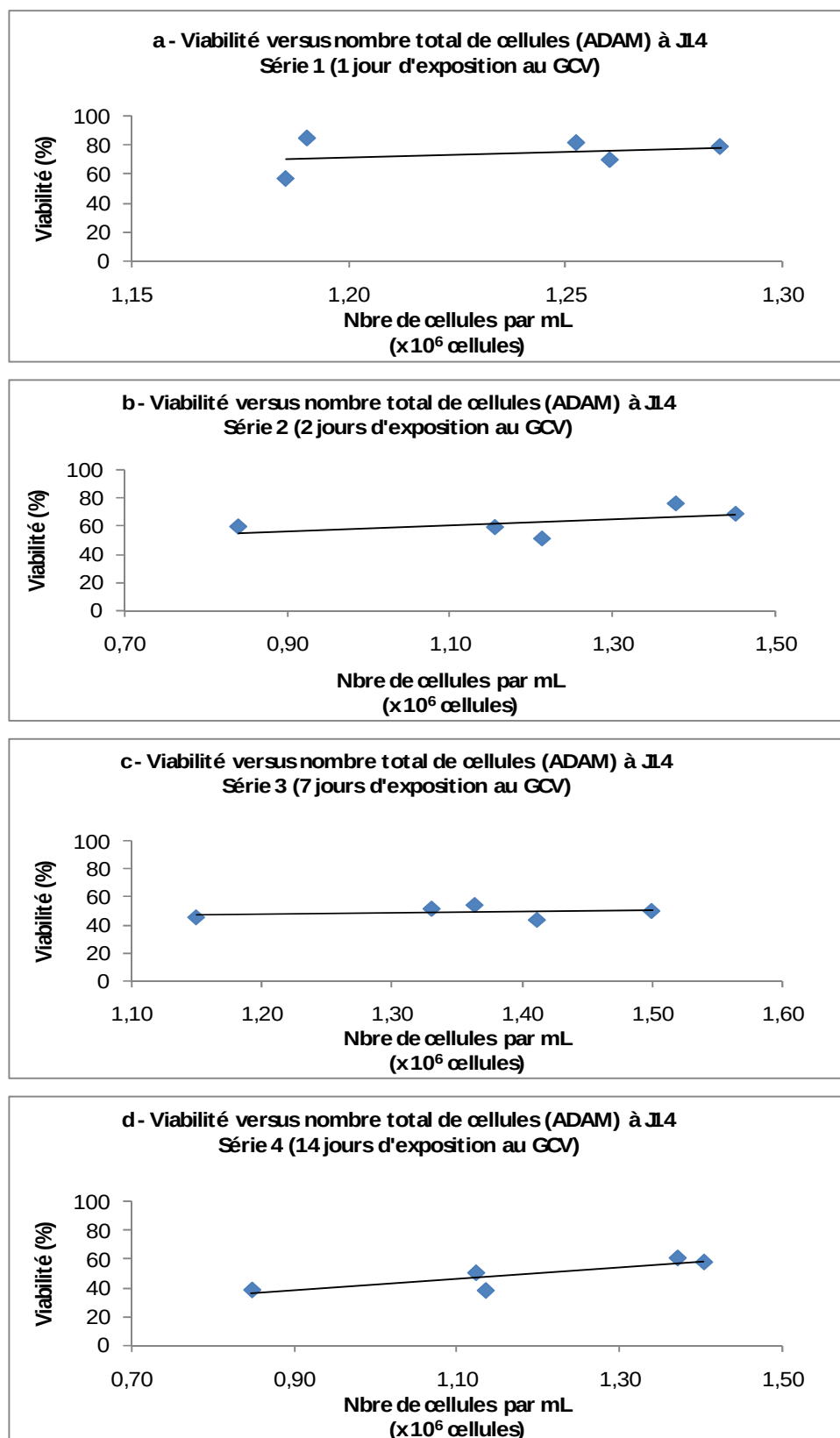


Figure 45 : Viabilité cellulaire versus nombre totale de cellules (mesures réalisées par le compteur ADAM).

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été exposées au GCV pendant 1 jour (a), 2 jours (b), 7 jours (c), ou 14 jours (d). Le nombre total de cellules a été mesuré (compteur ADAM) à J14. Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures. La viabilité cellulaire (analysée par le compteur ADAM) correspond ici à : (cellules totales mesurées -

cellules mortes mesurées)/cellules totales mesurées. L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: (a) $r^2 = 0.10$, NS; (b) $r^2 = 0.30$, NS; (c) $r^2 = 0.06$, NS ; (d) $r^2 = 0.73$, NS

La viabilité cellulaire (figure 46) n'est pas corrélée statistiquement à la concentration en GCV et ce quelque soit la durée d'exposition au GCV.

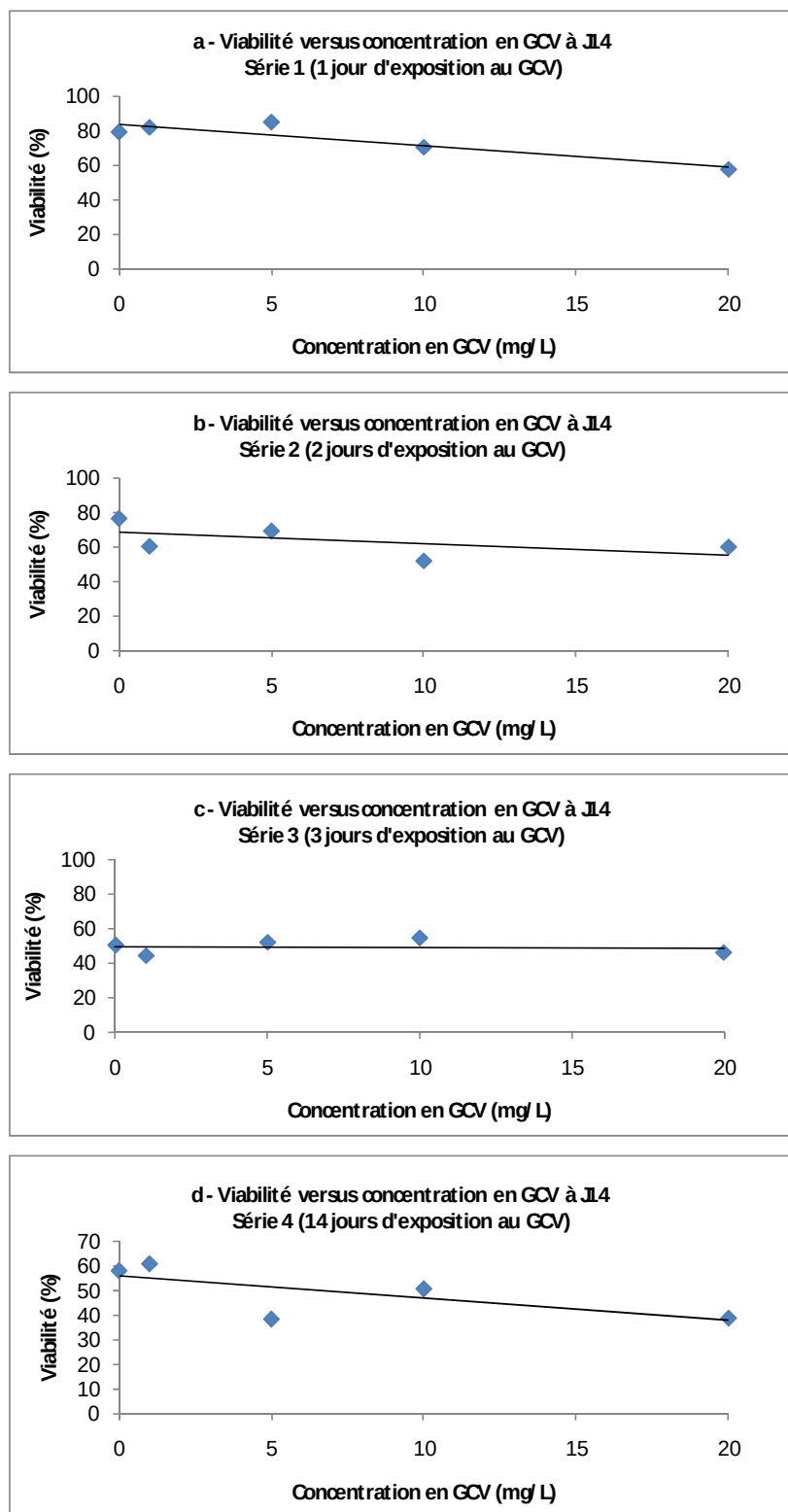


Figure 46 Viabilité cellulaire versus concentration en GCV (mesures réalisées par le compteur ADAM).

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été exposées au GCV pendant 1 jour (a), 2 jours (b), 7 jours (c), ou 14 jours (d). La viabilité cellulaire a été analysée par le compteur ADAM à J14. Elle correspond ici à : (cellules totales

mesurées - cellules mortes mesurées)/cellules totales mesurées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures. L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: (a) $r^2 = 0.83$, NS ; (b) $r^2 = 0.28$, NS; (c) $r^2 = 0.005$, NS ; (d) $r^2 = 0,50$, NS.

Par contre, le nombre de cellules vivantes (en % par rapport aux cellules vivantes non exposées au GCV et traitées dans les mêmes conditions) était corrélé à la concentration en GCV pour des durées d'exposition supérieures à 7 jours ($p=0,04$ pour la durée d'exposition à 14 jours, figure 47)

Ces résultats mettent en évidence le caractère temps-dépendant de la durée d'exposition au GCV sur la toxicité cellulaire (avec le comptage de cellules vivantes), ce qui n'avait pas encore été mis en évidence clairement avec les autres essais.

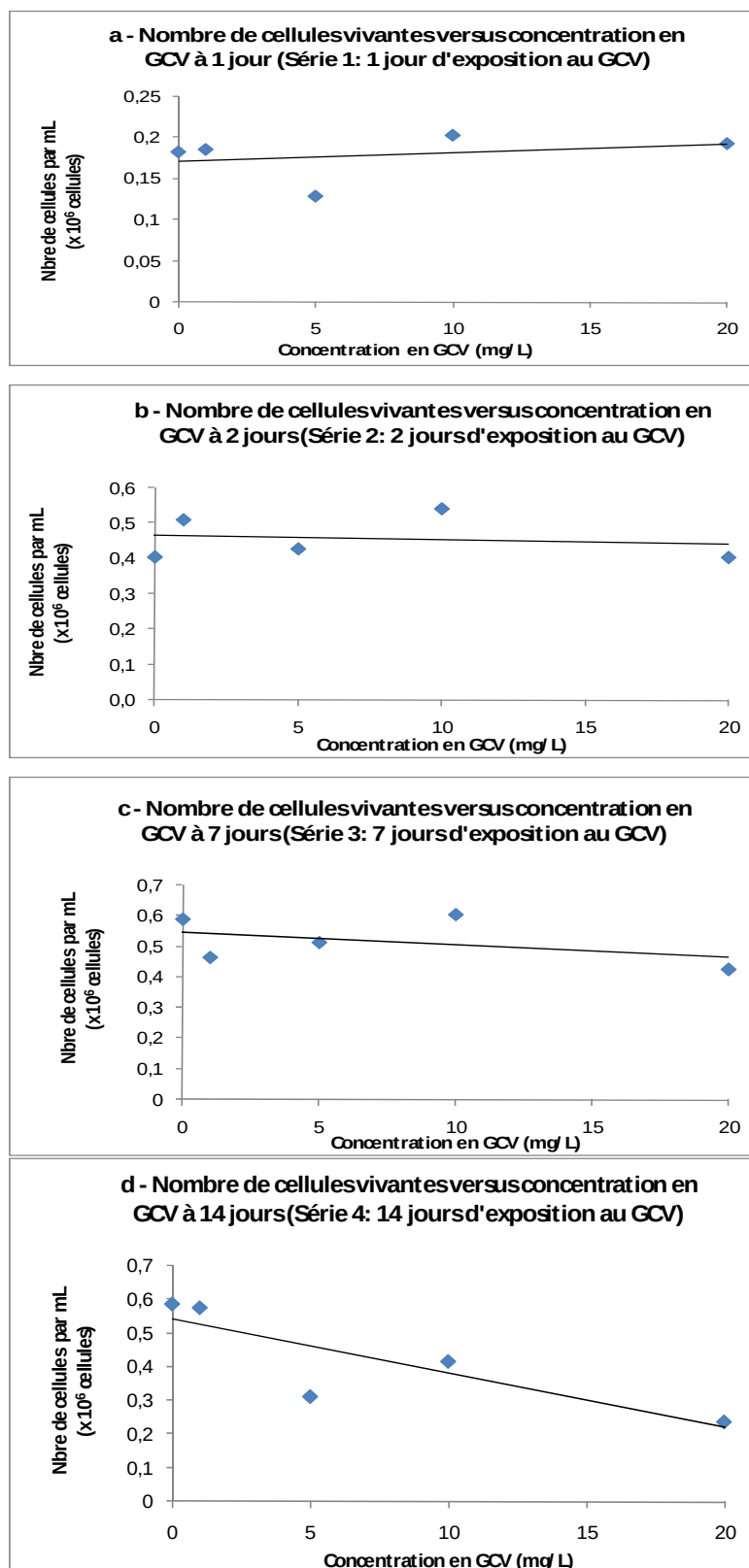


Figure 47 Nombre de cellules vivantes versus concentration en ganciclovir (GCV)

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été exposées au GCV pendant 1 jour (a), 2 jours (b), 7 jours (c), ou 14 jours (d). Le nombre de cellules vivantes a été analysé par le compteur ADAM à la fin de chaque durée d'exposition au GCV (J1, J2, J7, J14). Le nombre de cellules vivantes correspond ici à : (cellules totales mesurées - cellules mortes mesurées). Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures.

L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: (a) $r^2 = 0.092$, NS; (b) $r^2 = 0.10$, NS; (c) $r^2 = 0.20$, NS; (d) $r^2 = 0.71$, $p = 0.04$.

A J7 (figure 48) l'effet de la concentration en GCV sur le nombre de cellules vivantes était net pour les durées d'exposition de 1 et de 2 jours. Par contre, cet effet n'était pas retrouvé pour la durée d'exposition de 7 jours où le nombre de cellules vivantes était élevé pour les concentrations intermédiaires de 5 et 10 mg/L (par rapport à la plus faible concentration de 1 mg/L). A J14, l'effet de la concentration en GCV sur le nombre de cellules vivantes n'a pas été clairement mis en évidence (figure 49).

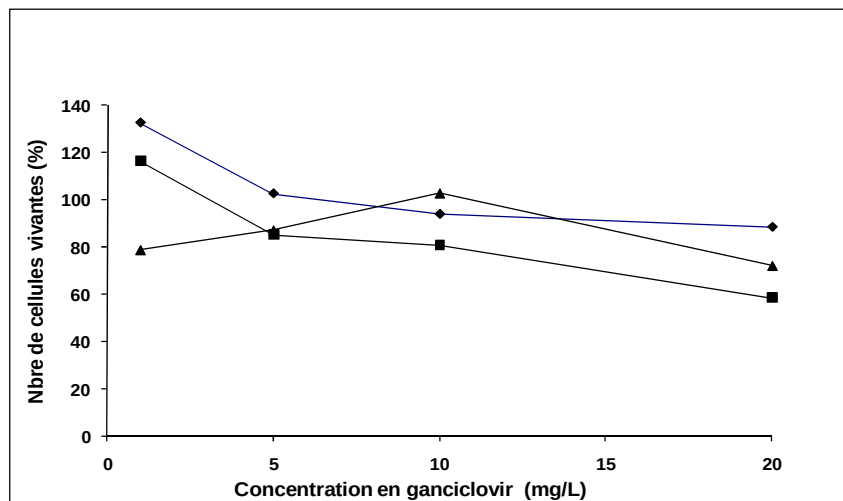


Figure 48 : Effet de la concentration en GCV sur la viabilité cellulaire (exprimée en % par rapport à des cellules non traitées) après 7 jours de culture cellulaire.

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été exposées au GCV pendant 1 jour (◆), 2 jours (■), ou 7 jours (▲). Le nombre de cellules vivantes (cellules totales mesurées - cellules mortes mesurées) a été analysé par le compteur ADAM à J7. Le pourcentage de cellules vivantes correspond ici au rapport entre le nombre de cellules vivantes exposées au GCV (1, 5, 10 et 20 mg/L) et le nombre de cellules vivantes en l'absence d'exposition au GCV. Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures. L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: (◆) $r^2 = 0.44$, NS; (■) $r^2 = 0.85$, $p=0.03$; (▲) $r^2 = 0.19$, NS.

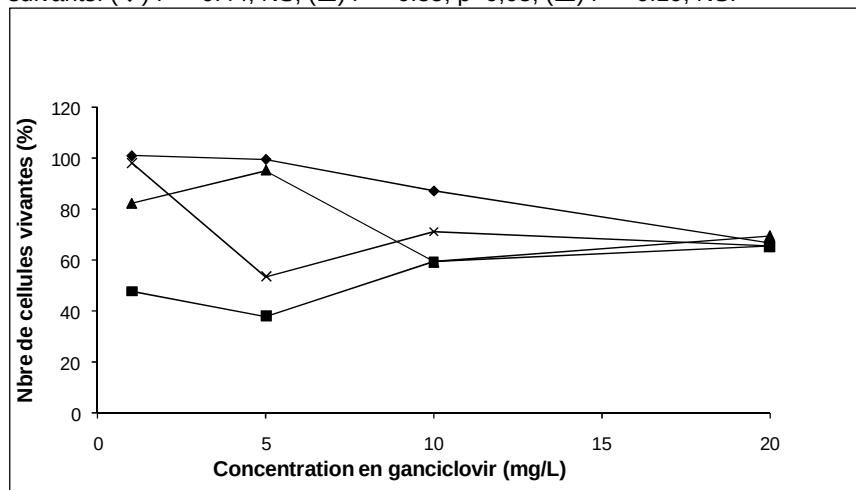


Figure 49 : Effet de la concentration en GCV sur la viabilité cellulaire (exprimée en % par rapport à des cellules non traitées) après 14 jours de culture cellulaire.

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été exposées au GCV pendant 1 jour (◆), 2 jours (■), 7 jours (▲) ou 14 jours (×). Le nombre de cellules vivantes (cellules totales mesurées - cellules mortes mesurées) a été analysé par le compteur ADAM à J14. Le pourcentage de cellules vivantes correspond ici au rapport entre le nombre de cellules vivantes exposées au GCV (1, 5, 10 et 20 mg/L) et le nombre de cellules vivantes en l'absence d'exposition au GCV. Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures. L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: (◆) $r^2 = 0.95$, $p = 0.005$; (■) $r^2 = 0.02$, NS; (▲) $r^2 = 0.47$, NS; (×) $r^2 = 0.37$, NS.

La viabilité des cellules lymphoblastoïdes non exposées au GCV présentait une valeur initiale de 70%, alors qu'il était attendu une meilleure viabilité des cellules en début de culture. Ensuite les évolutions de la viabilité ont été variables en fonction des durées avant lavage et changement de milieu (1, 2, 7 ou 14 jours). Les meilleures viabilités à 14 jours ont été obtenues pour les cellules « lavées » à 1 jour et 2 jours après l'initiation de la culture. Cela signifie que les conditions de cultures ne sont pas optimales car on ne devrait pas avoir autant de différence entre les séries. Le milieu de culture aurait dû être changé plus tôt pour les séries lavées à 7 jours et sans lavage pendant 14 jours.

La viabilité inférieure à 60% pour les séries J7 et J14 peut expliquer aussi les résultats peu significatifs pour des cellules exposées au GCV (effet du GCV masqué par une mauvaise viabilité cellulaire retrouvée y compris sur les témoins non exposés)

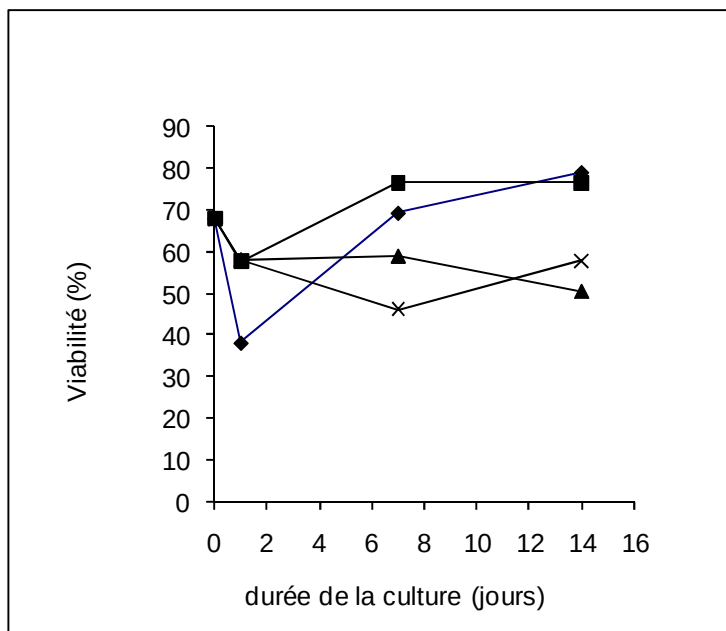


Figure 50 Viabilité de cellules non exposées au GCV versus durée de la culture cellulaire

Les cellules lymphoblastoïdes n'ont pas été exposées au GCV mais ont été lavées (conditions de culture identiques à celles des cellules exposées au GCV à J1 (◆), J2 (■), J7 (▲) ; Les cellules exposées pendant 14 jours (×) n'ont pas été lavées.

3.4.5. Essais préliminaires d'efficacité : Essai C

3.4.5.1. Numérations cellulaires (compteur COULTER)

Comme le montre la figure 51, il semblerait qu'il y ait un ralentissement de la croissance cellulaire au cours du temps et indépendamment de l'infection par le CMV et de l'exposition au GCV. En effet, la croissance cellulaire du « témoin » (cellules non infectées par le CMV et non exposées au GCV) a été stoppée entre J7 et J14. Cela signifie que les conditions de cultures des cellules lymphoblastoïdes n'étaient pas optimales.

Cet arrêt de la croissance est expliqué par le fait que le milieu des cellules témoins n'a pas été complété à J7 ; alors que la concentration des cellules était déjà très importante ($>2 \times 10^6$ cellules/mL). Il aurait été nécessaire de diluer le milieu de culture à J7 pour avoir des concentrations cellulaires voisines de 1×10^6 cellules/ml pour maintenir la croissance cellulaire.

Pour les cellules infectées par le CMV et indépendamment de la concentration en GCV la croissance était fortement inhibée à partir de J0 (3 jours post infection et avant ajout du GCV dans le milieu de culture)

Pour la série exposée pendant 7 jours (figure 51c) au GCV, il semble y avoir une reprise de la croissance à J2 à des concentrations fortes en GCV (10 et 20 mg/L). Cependant ces résultats n'ont pas été retrouvés pour la série exposée pendant 2 jours (figure 51a), ce qui rend l'interprétation des résultats délicate.

La plus longue durée d'exposition (7 jours, figure 51c) a entraîné une inhibition de la croissance (pour toutes les concentrations de GCV testées) plus importante à J14 que les durées d'exposition plus courtes (1 et 2 jours, figures 51 a et b respectivement).

La toxicité du GCV est telle qu'aucune différence sur la toxicité cellulaire ne peut être mise en évidence entre des cellules exposées ou non au GCV (et encore moins entre des concentrations croissantes de GCV)

Les numérations cellulaires ont été complétées par des examens microscopiques (données non montrées) qui ont mis en évidence un nombre important de cellules mortes (information complémentaire du comptage cellulaire par Coulter)

Deux explications sont possibles : soit la dose infectieuse choisie est trop forte (cependant elle a été déterminée et optimisée lors de l'essai a), soit la durée de l'infection avant traitement par GCV est trop longue avec une toxicité irréversible du GCV sur les cellules lymphoblastoïdes B.

C'est cette dernière hypothèse qui paraît la plus probable ; en effet, le paramètre « durée entre infection et exposition au GCV » n'avait pas été encore testé et malheureusement aucune donnée n'était disponible dans la littérature pour guider notre choix.

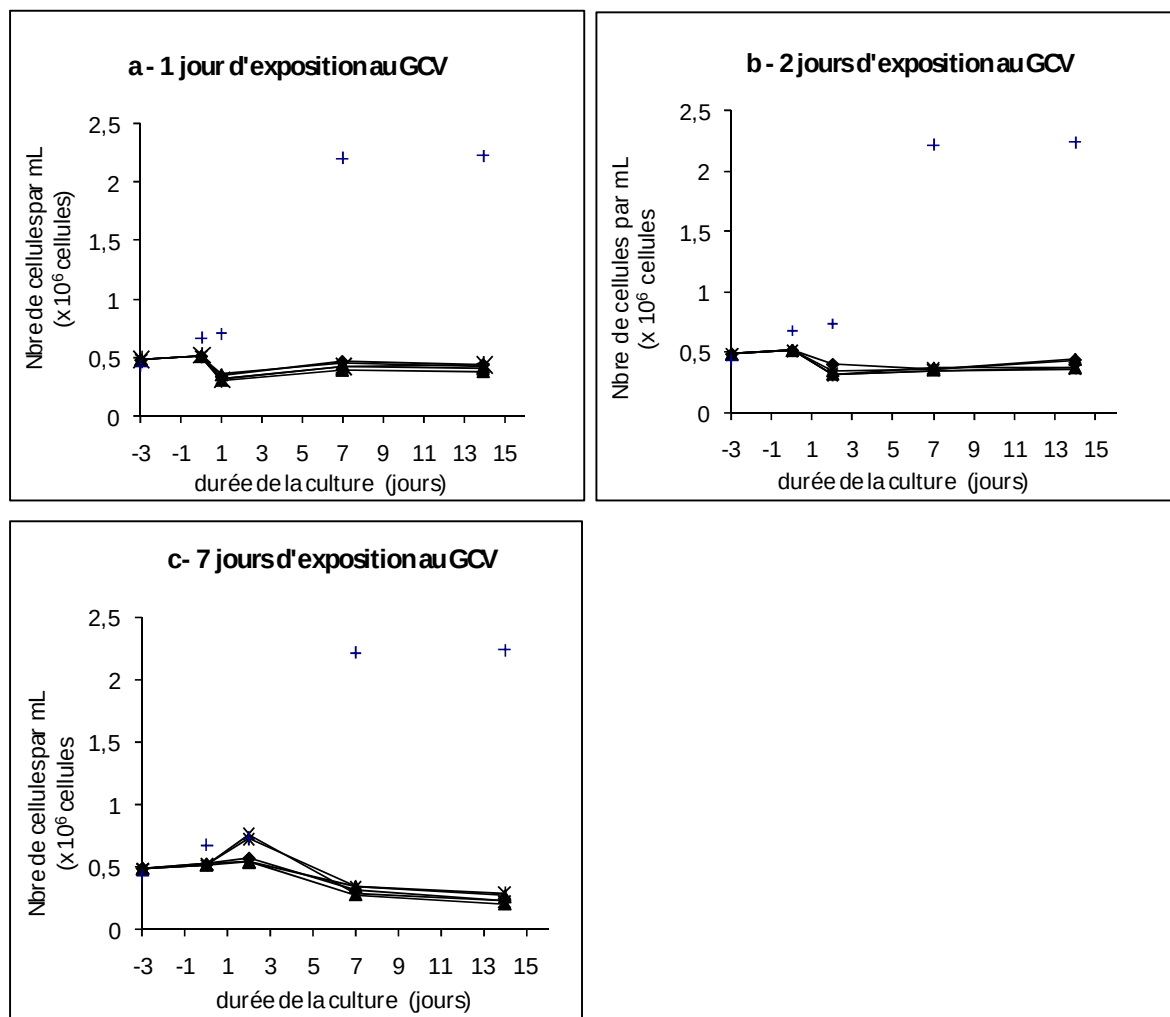


Figure 51 Effet du ganciclovir (GCV) sur la croissance cellulaire.

Les cellules lymphoblastoïdes B infectées par le CMV à J-3 ont été exposées au GCV à partir de J0. La durée d'exposition au GCV a été de 1 jour (a), 2 jours (b), ou 7 jours (c). Les concentrations d'exposition ont été 1 mg/L (■), 5 mg/L (▲), 10 mg/L (×), ou 20 mg/L (*). En plus, des cellules « témoin » infectées par le CMV n'ont pas été exposées au GCV (◆). Enfin, des cellules n'ont été ni infectées par le CMV ni exposées au GCV (+). La culture cellulaire a été poursuivie pendant 14 jours au total (indépendamment de la durée d'exposition au GCV). Le nombre de cellules (mesure par compteur Coulter) a été mesuré à J-3, J0, J1, J2, J7 et J14. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures.

3.4.5.2. Evolution de la charge virale

Jusqu'à 5 jours post-infection, les cellules non traitées par GCV présentaient une charge virale plus importante que les cellules traitées (figure 52a, bet c). Après 5 jours, une diminution des charges virales a été observée. Il n'existait alors plus de différence entre les cellules exposées et non exposées au GCV.

Ces résultats signifient qu'à cause de la forte toxicité cellulaire due au CMV, le virus ne trouve plus le « matériel cellulaire » nécessaire à sa multiplication (d'où la diminution de charge virale) ; cette diminution de charge virale est donc à rapprocher de la toxicité cellulaire (figure 51).

Comme déjà remarqué d'après les numérations cellulaires (figure 51), il est nécessaire pour les futurs essais de limiter la période d'infection sans traitement par GCV pour préserver le pool de cellules.

La mise en évidence de l'effet toxique du au GCV n'était pas possible (pas de cellules exposées au GCV et non infectées par le CMV) ; en plus la toxicité massive du CMV sur les cellules a empêché d'apprécier l'effet antiviral du GCV.

L'influence de la concentration et durée d'exposition au GCV sur la charge virale n'a pas pu être mise en évidence dans cet essai.

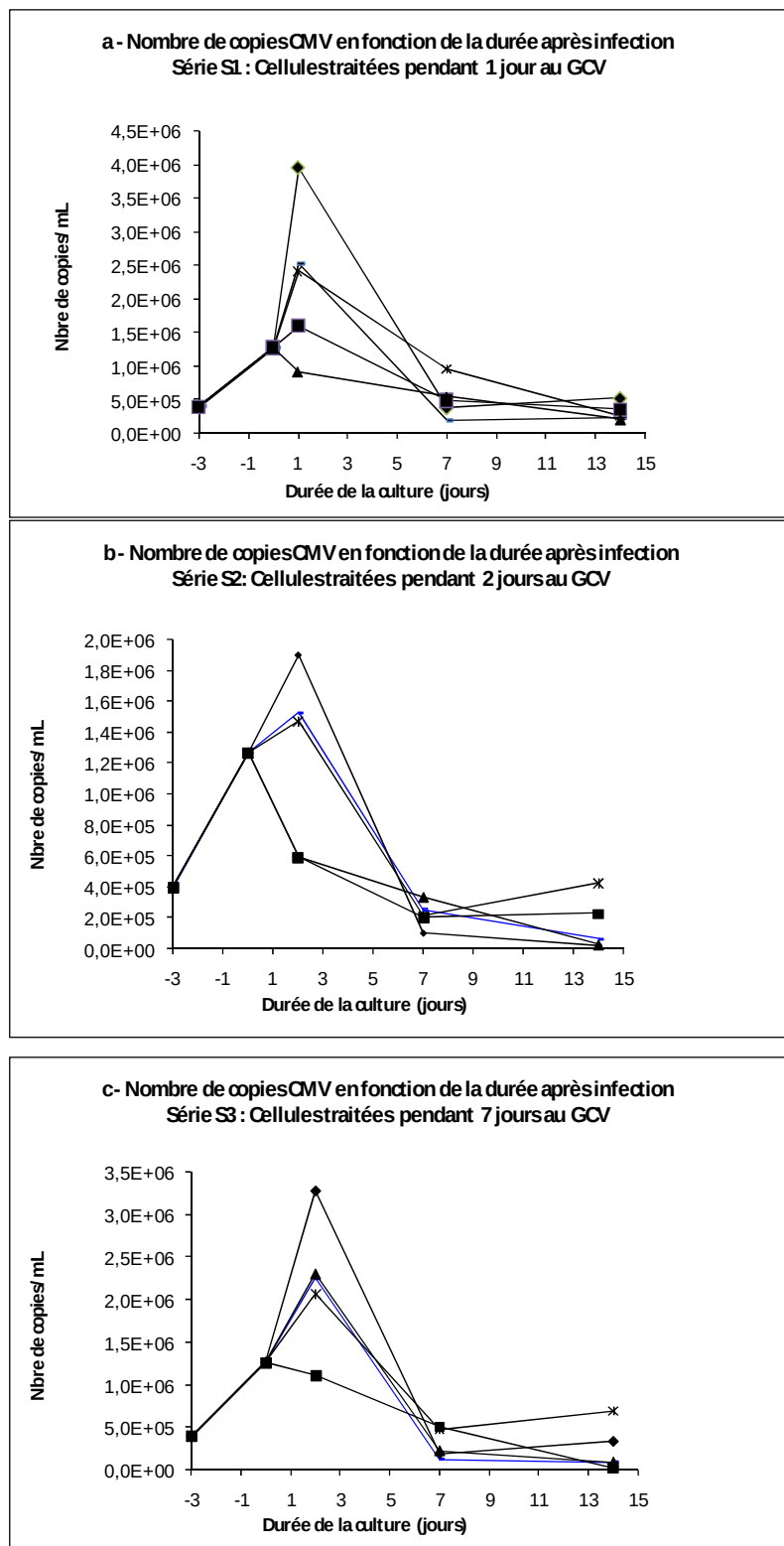


Figure 52 Effet du ganciclovir sur la charge virale CMV (nombre de copies /mL)

Les cellules lymphoblastoïdes B infectées par le CMV à J-3 ont été exposées au GCV à partir de J0. La durée d'exposition au GCV a été de 1 jour (a), 2 jours (b), ou 7 jours (c). Les concentrations d'exposition ont été 1 mg/L (■), 5 mg/L (▲), 10 mg/L (×), ou 20 mg/L (*). En plus, des cellules « témoin » infectées par le CMV n'ont pas été exposées au GCV (◆). La culture cellulaire a été poursuivie pendant 14 jours au total (indépendamment de la durée d'exposition au GCV). La charge virale a été mesurée par PCR à J-3, J0, J2, J7, et J14. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures.

3.4.6. Essais finaux de toxicité et d'efficacité : Essai D

3.4.6.1. Toxicité sur cellules lymphoblastoïdes non infectées

3.4.6.1.1. Numération cellulaire par compteur COULTER

Les essais ont été menés sur 2 souches cellulaires distinctes qui ont conduit à des résultats similaires. Pour simplifier la lecture, seuls les résultats obtenus sur la souche A ont été présentés dans les résultats.

Comme pour les essais préliminaires de toxicité A et B, les résultats (figure 53) montrent une relation entre la concentration en GCV et la croissance cellulaire. Contrairement aux essais A et B, cette relation concentration-dépendante apparaît dès 48 heures d'exposition, même si la différence entre les concentrations est moins marquée (figure 53 b) que pour les durées d'exposition supérieures (figures 53 c et d).

Les résultats sont plus nets que pour l'essai B et se rapprochent de ceux de l'essai A (avec en plus un effet du GCV à 48 heures jamais trouvé auparavant).

Il est à noter que les cellules témoins non exposées au GCV ont maintenu une croissance forte entre J7 et J14.

Le maintien de la croissance est dû en partie à un nouveau protocole d'entretien des cultures de cellules à J7 : dans tous les flacons a été ajouté un volume correspondant au volume initial (cellules maintenues à environ 1×10^6 cellules/ml) ce qui a entraîné une dilution des cellules au demi. Pour les cellules de la série 4 : exposition au GCV pendant 14 jours, le volume nécessaire de solution de GCV à 1mg/mL a été ajouté pour obtenir des concentrations finales de 1, 5, 10 et 20 mg/L.

La figure 54 exprime les mêmes résultats en valeurs relatives : nombre de cellules exposées au GCV par rapport à des cellules non exposées mais traitées exactement dans les mêmes conditions.

Ces résultats soulignent l'influence de la durée d'exposition sur la toxicité du GCV : à 14 jours des concentrations à 5 mg/L sont déjà très toxiques sur les cellules avec un pourcentage de cellules inférieur à 70%. On retrouve peu d'influence de cette même concentration pour les durées jusqu'à 7 jours.

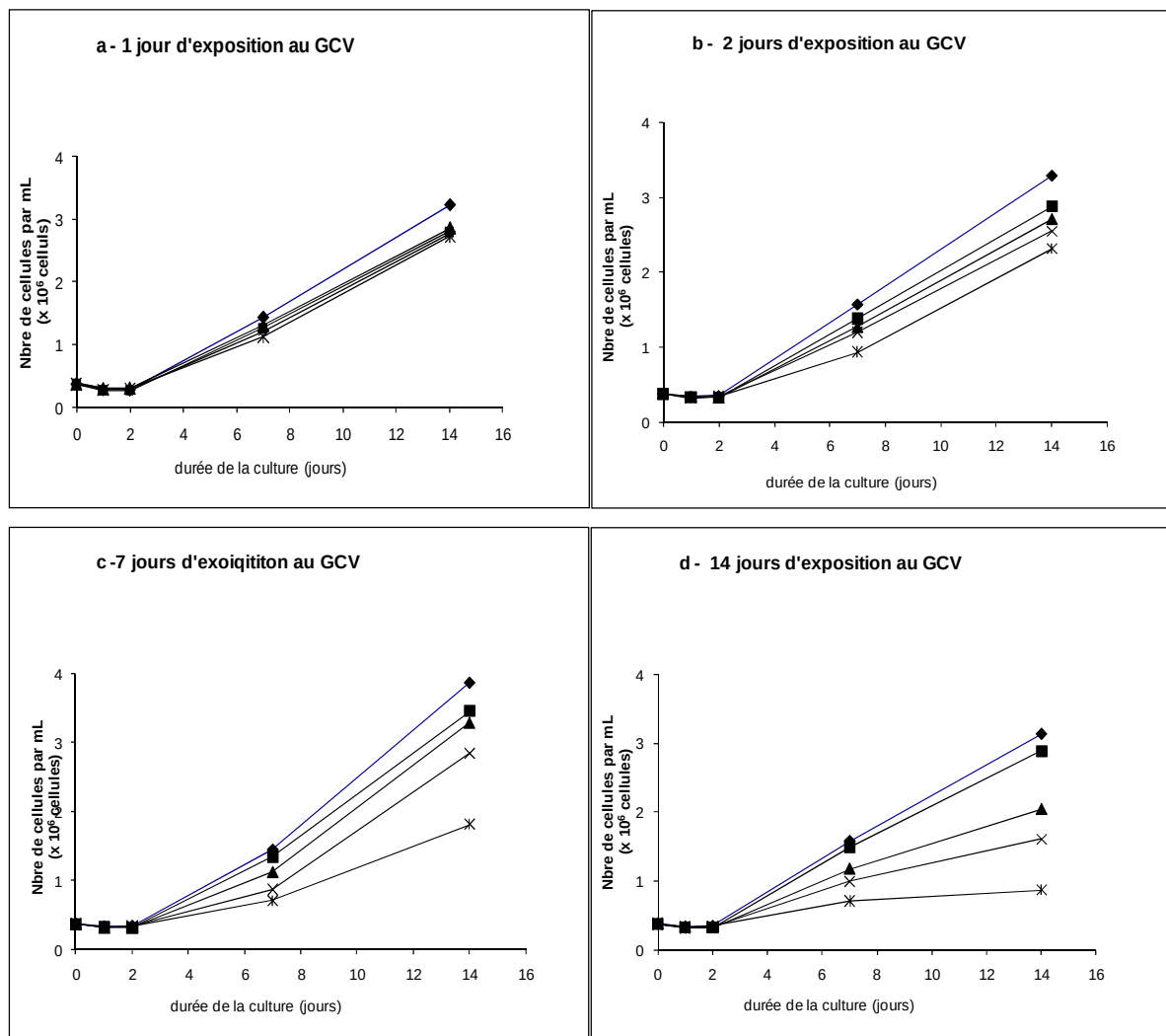


Figure 53 Effet du ganciclovir (GCV) sur la croissance cellulaire (exprimé en nombre de cellules) – cellules non infectées par le CMV.

Les cellules lymphoblastoïdes B non infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 1 jour (a), 2 jours (b), 7 jours (c), ou 14 jours (d). Les concentrations d'exposition ont été 1 mg/L (■), 5 mg/L (▲), 10 mg/L (×), ou 20 mg/L (*). En plus, des cellules « témoin » n'ont pas été exposées au GCV (◆). La culture cellulaire a été poursuivie pendant 14 jours au total (indépendamment de la durée d'exposition au GCV). Le nombre de cellules (mesure par compteur Coulter) a été mesuré à J0, J1, J2, J7, et J14. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures.

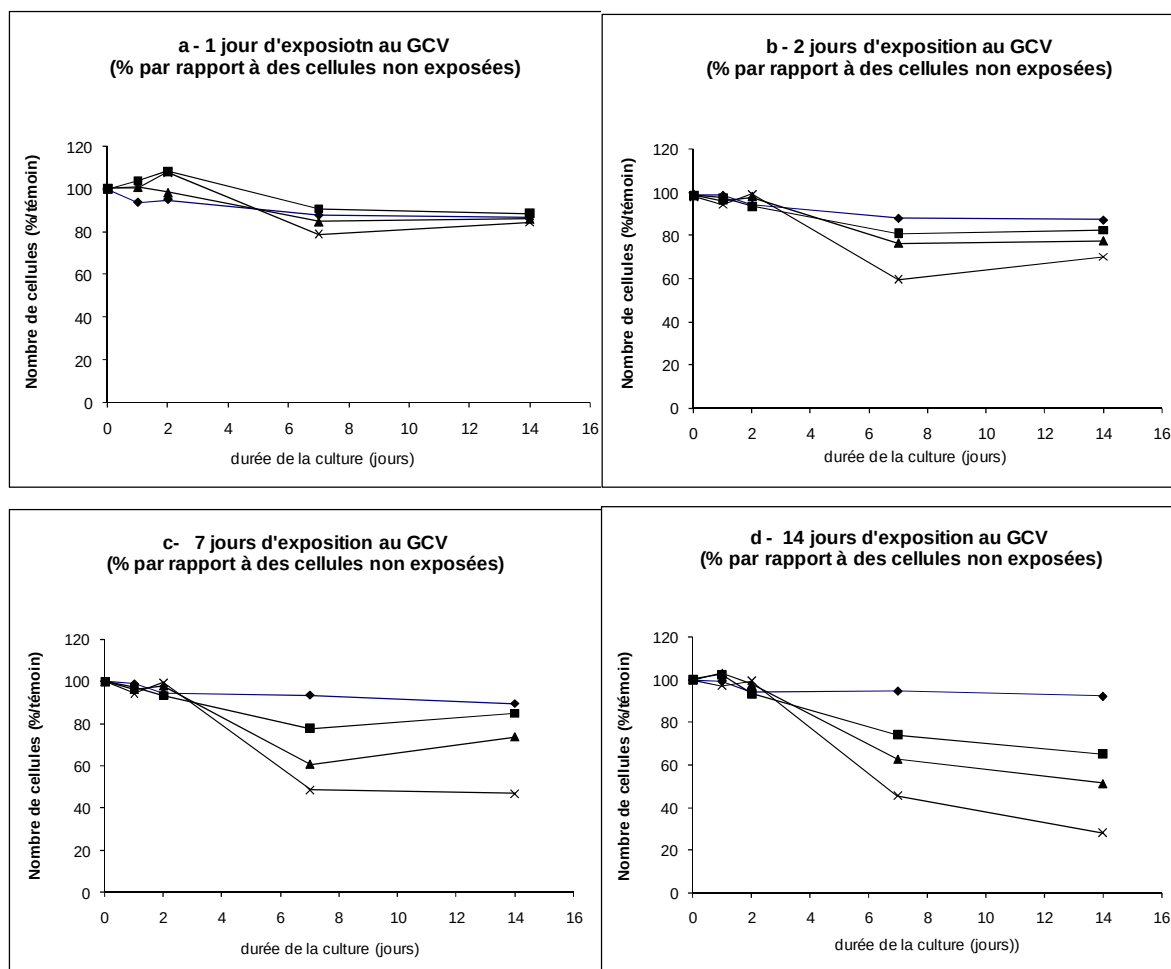


Figure 54 : Effet du ganciclovir (GCV) sur la croissance cellulaire (exprimé en % du nombre de cellules « témoin » non exposées au GCV) – cellules non infectées par le CMV.

Les cellules lymphoblastoïdes B non infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 1 jour (a), 2 jours (b), 7 jours (c), ou 14 jours (d). Les concentrations d'exposition ont été 1 mg/L (◆), 5 mg/L (■), 10 mg/L (▲), ou 20 mg/L (×). En plus, des cellules « témoin » n'ont pas été exposées au GCV. La culture cellulaire a été poursuivie pendant 14 jours au total (indépendamment de la durée d'exposition au GCV). Le nombre de cellules (mesure par compteur Coulter) a été mesuré à J0, J1, J2, J7, et J14. Les valeurs expriment le nombre de cellules (pour chaque concentration testée) en pourcentage du nombre de cellules « témoin » non exposées au GCV. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures. Le pourcentage de cellule

La corrélation entre nombre de cellules et concentration en GCV est significative pour des cellules exposées pendant plus de 48 heures (figures 55 c et d). Donc le caractère concentration - dépendant de la toxicité est très lié à la durée d'exposition.

Au contraire, pour des durées d'exposition courtes (comme déjà vu pour les essais A et B), nous n'avons pas trouvé de liaison entre l'intensité de la concentration et la toxicité cellulaire. Ces résultats sont confirmés par la comparaison en termes de toxicité de la concentration la plus basse (1mg/L) à la concentration la plus haute (20 mg/L) pour différentes durées d'exposition (figure 56) : une différence significative est obtenue pour des durées d'exposition supérieures à 48 heures (7 et 14 jours), alors qu'une concentration forte n'est pas plus toxique qu'une concentration basse pour des durées d'exposition inférieures.

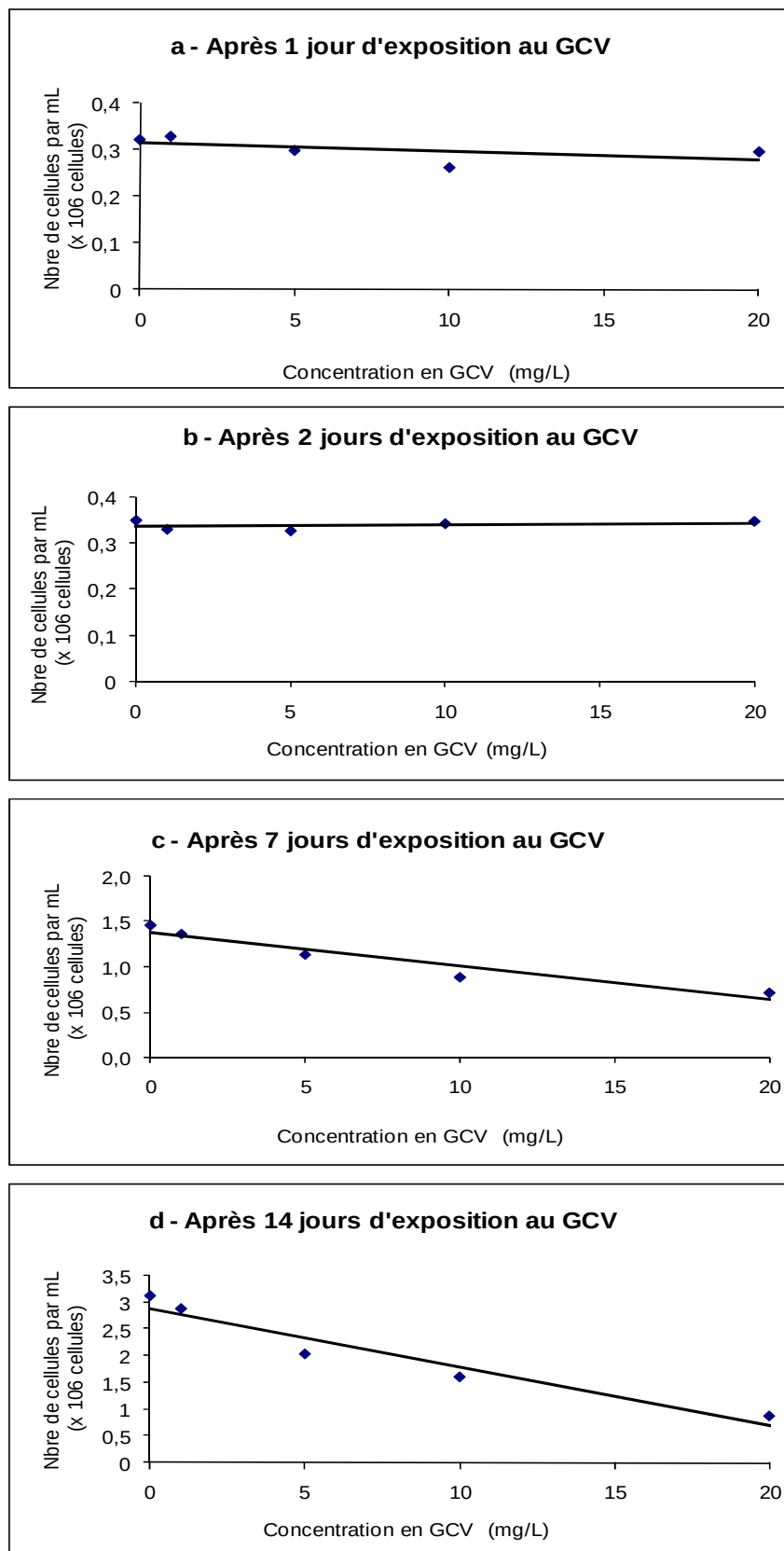


Figure 55 Nombre de cellules versus concentration en ganciclovir (GCV) – cellules non infectées par le CMV.

Les cellules lymphoblastoïdes B non infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 1 jour (a), 2 jours (b), 7 jours (c), ou 14 jours (d). Le nombre de cellules a été mesuré (compteur Coulter) à la fin de l'exposition au GCV (1, 2, 7 ou 14 jours). Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures. L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: (a) $r^2 = 0.33$, NS; (b) $r^2 = 0.13$, NS; (c) $r^2 = 0.92$, $p=0,01$; (d) $r^2 = 0.93$, $p=0,008$.

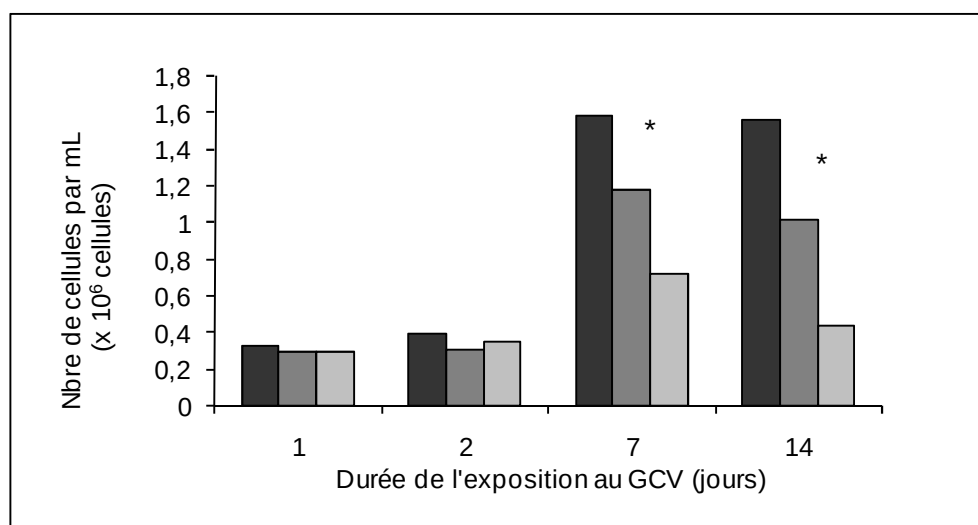


Figure 56 Effet de la concentration en ganciclovir (GCV) sur la toxicité cellulaire pour des durées d'exposition de 1, 2, 7 ou 14 jours – cellules non infectées par le CMV.

Les concentrations d'exposition ont été de 1 mg/L (■) ou 20 mg/L (■) de GCV ; des cellules « témoin » n'ont pas été exposées au GCV (■). Les cellules lymphoblastoïdes B ont été incubées avec le GCV pendant 1, 2, 7, ou 14 jours. Le nombre de cellules a été mesuré (compteur Coulter) à J1, J2, J7 ou J14. Les valeurs sont exprimées en moyenne + erreur type (n = 3). * p = 0.04.

Les mesures complémentaires de la viabilité obtenue par ADAM ont permis de mesurer les cellules vivantes (le comptage par Coulter est moins spécifique)

Ces mesures ont confirmé les résultats obtenus par le compteur Coulter, à savoir qu'il existe une relation entre la dose et la toxicité (objectivée par la mesure du nombre de cellules vivantes) à J7 et J14 (figures 57 et 58)

Les mesures n'ont pas pu être réalisées avant J7 car le nombre de cellules mesurées était trop faible (en deçà du range de linearité de la méthode ADAM).

Même pour des concentrations d'exposition faible, une durée de 14 jours a entraîné une chute de la viabilité à 60% (comparativement à 100 % pour le témoin non exposé) ; si la durée d'exposition était de 7 jours, la viabilité a été nettement supérieure : 85% (comparativement à 100 % pour le témoin non exposé)

La mesure de la viabilité a confirmé la toxicité du GCV sur les cellules lymphoblastoïdes.

3.4.6.1.2. Numération cellulaire et viabilité par compteur ADAM

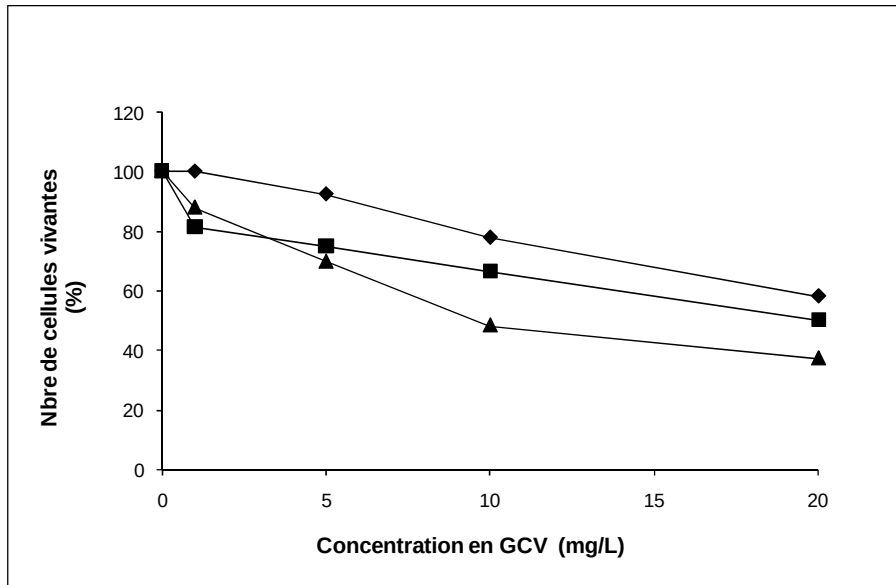


Figure 57 : Effet de la concentration en GCV sur la viabilité cellulaire (exprimée en % par rapport à des cellules non traitées) après 7 jours de culture cellulaire – cellules non infectées par le CMV.

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été exposées au GCV pendant 1 jour (◆), 2 jours (■), ou 7 jours (▲). Le nombre de cellules vivantes (cellules totales mesurées - cellules mortes mesurées) a été analysé par le compteur ADAM à J7. Le pourcentage de cellules vivantes correspond ici au rapport entre le nombre de cellules vivantes exposées au GCV (1, 5, 10 et 20 mg/L) et le nombre de cellules vivantes en l'absence d'exposition au GCV. Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures.

L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: (◆) $r^2 = 0.99$, $p < 0.001$; (■) $r^2 = 0.87$, $p = 0.02$; (▲) $r^2 = 0.88$, $p = 0.02$.

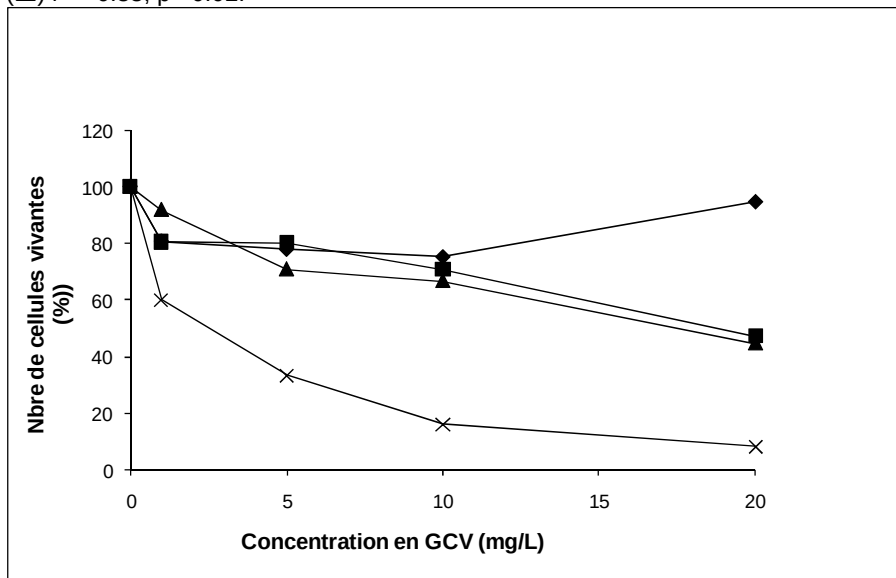


Figure 58 : Effet de la concentration en GCV sur la viabilité cellulaire (exprimée en % par rapport à des cellules non traitées) après 14 jours de culture cellulaire – cellules non infectées par le CMV.

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été exposées au GCV pendant 1 jour (◆), 2 jours (■), 7 jours (▲) ou 14 jours (×). Le nombre de cellules vivantes (cellules totales mesurées - cellules mortes mesurées) a été analysé par le compteur ADAM à J14. Le pourcentage de cellules vivantes correspond ici au rapport entre le nombre de cellules vivantes exposées au GCV (1, 5, 10 et 20 mg/L) et le nombre de cellules vivantes en l'absence d'exposition au GCV. Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures.

L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: (◆) $r^2 = 0.007$, NS; (■) $r^2 = 0.90$, $p = 0.02$; (▲) $r^2 = 0.92$, $p = 0.01$; (×) $r^2 = 0.70$, $p = 0.045$.

L'équivalence des performances (figures 59 à 61) des compteurs Coulter et Adam pour la mesure du nombre total de cellules a été confirmée (des résultats similaires avaient déjà été montrés dans l'essai B).

La viabilité est liée au nombre de cellules totales comptées par ADAM (figure 60), cela reste vrai quand le comptage du nombre de cellules totales est réalisé par Coulter (figure 61).

Ces résultats nous montrent qu'il est légitime d'utiliser l'appareil COULTER pour mesurer le nombre de cellules, car même s'il est moins précis que l'appareil ADAM (avec le risque de numérer en plus des cellules mortes ou d'autres particules), la corrélation donnée sur la figure 61 montre qu'il reste un appareil de mesure fiable et confirme la pertinence des essais préliminaires A et B (sans mesure de la viabilité).

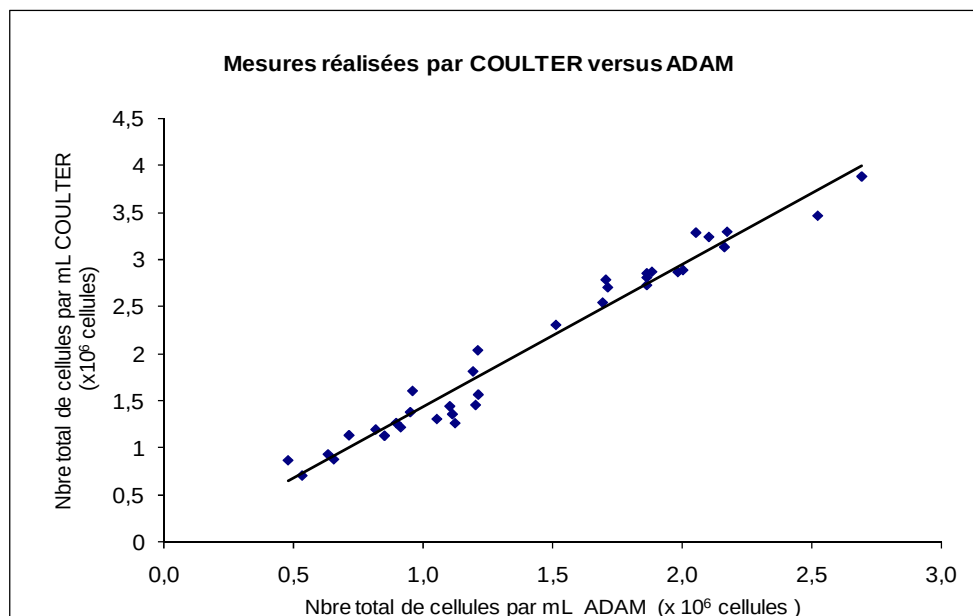


Figure 59 : Corrélation entre le nombre total de cellules mesuré par COULTER versus ADAM- cellules non infectées par le CMV.

Toutes les mesures du nombre de cellules réalisées par les 2 méthodes ont été comparées. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures. L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: $r^2 = 0.97$, $p < 0.001$.

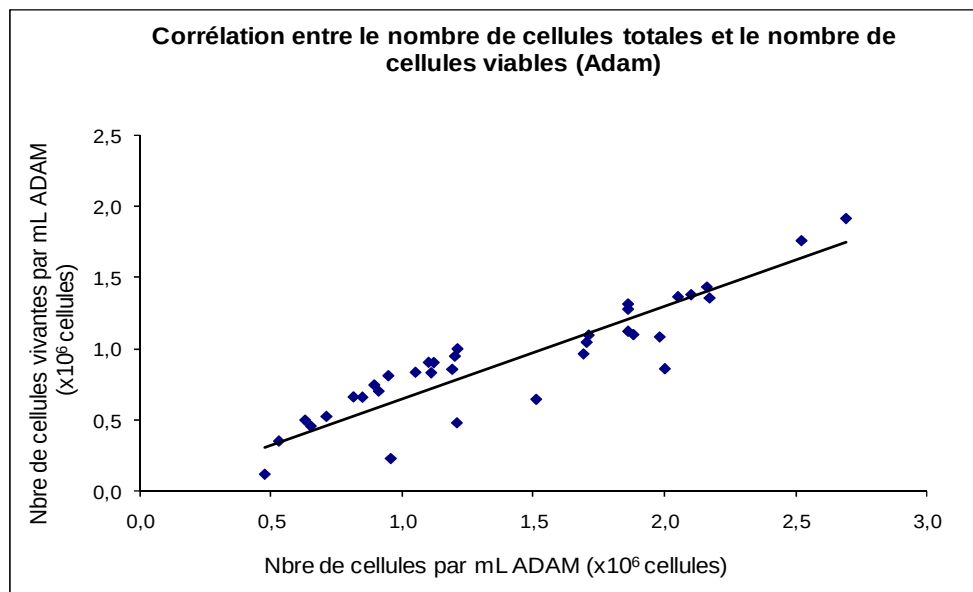


Figure 60 : Corrélation entre le nombre de cellules vivantes versus nombre total de cellules (mesurées par le compteur ADAM) – cellules non infectées par le CMV.

Toutes les mesures du nombre de cellules vivantes (compteur ADAM) et les mesures du nombre total de cellules (compteur ADAM) ont été comparées (pour les différentes concentrations et durées d'incubation testées). Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures. L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: $r^2 = 0.82$, $p < 0.001$.

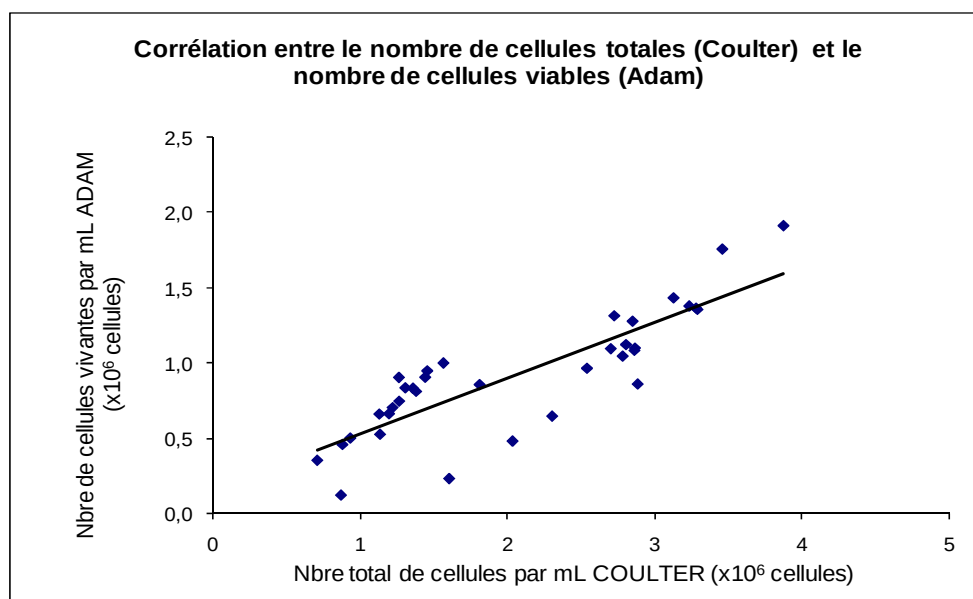


Figure 61 Corrélation entre le nombre de cellules vivantes (mesurées par le compteur ADAM) versus nombre total de cellules (mesurées par le compteur COULTER) – cellules non infectées par le CMV.

Toutes les mesures du nombre de cellules vivantes (compteur ADAM) et les mesures du nombre total de cellules (compteur COULTER) ont été comparées. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures. L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: $r^2 = 0.72$, $p < 0.001$. A VERIFIER

La viabilité des cellules lymphoblastoïdes est diminuée pour des durées de culture supérieures à 7 jours (figure 62). La viabilité a chuté de 80% à 65-75% à J14. Ces résultats ont été montrés pour des cellules non traitées par le GCV et soulignent encore une fois les limites du maintien de la culture cellulaire sur 14 jours.

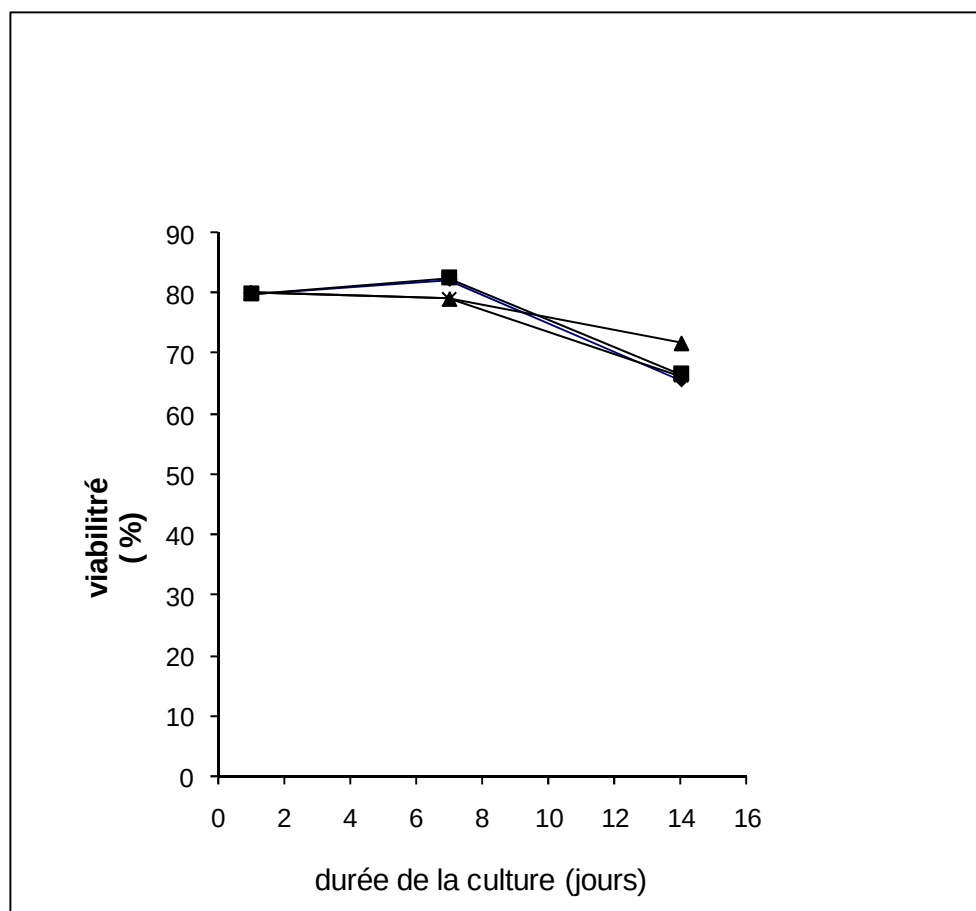


Figure 62 Viabilité de cellules non exposées au GCV versus durée de la culture cellulaire – cellules non infectées par le CMV

Les cellules lymphoblastoïdes n'ont pas été exposées au GCV mais ont été lavées (conditions de culture identiques à celles des cellules exposées au GCV) à J1 (◆), J2 (■), J7 (▲) ; Les cellules exposées pendant 14 jours (×) n'ont pas été lavées.

3.4.6.1.3. Examen microscopique des cellules

L'examen microscopique des cellules a été réalisé à J0 (données non montrées), J7 et J14. Les photos réalisées (à J7 et J14) sont retrouvées figures 63 à 68.

Après 7 jours de cultures (figures 63 à 65), les amas cellulaires (clusters) étaient nombreux et les cellules ne présentaient pas d'altération (observations au plus fort grossissement). L'influence de la concentration en GCV n'était pas évidente pour les expositions les plus courtes (1 et 2 jours, figures 63 et 64) ; par contre, la taille des clusters a semblé dépendante de la concentration en GCV (figures 65 a et e) pour la durée d'exposition la plus longue (7 jours). En tout cas, l'observation au fort grossissement à J7 a montré des cellules en phase de croissance pour toutes les expositions et concentrations testées.

Après 14 jours de culture, les amas cellulaires étaient moins nombreux et de taille moins importante (par rapport à l'observation à 7 jours). Cependant, les cellules (même si

moins nombreuses) présentaient les mêmes aspects qu'à J7 (bonne viabilité, cellules en phase de multiplication active). Une différence qualitative et quantitative à J14 en fonction de la durée d'exposition (J1, J2, J7, J14) n'a pas été mise en évidence.

L'examen microscopique donne des informations complémentaires sur la viabilité des cellules (morphologie, taille des clusters) par rapport à un comptage Coulter seul. La technique est cependant moins précise que la viabilité réalisée par ADAM.

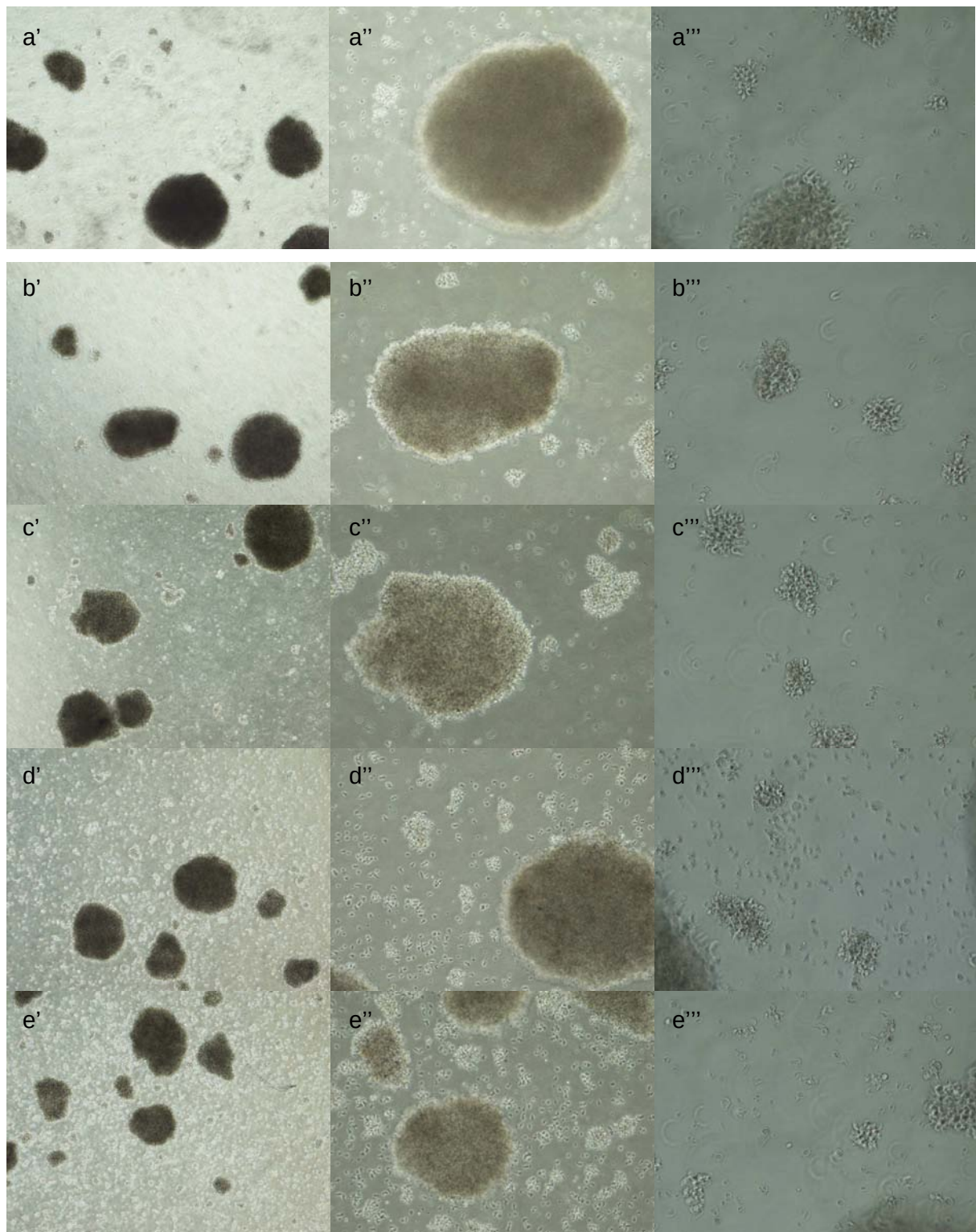


Figure 63 Microscopie électronique : Photos des cellules non infectées à J7 (cellules exposées 1 jour au GCV).

Les cellules lymphoblastoïdes B non infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 1 jour aux concentrations suivantes : 1 mg/L (b), 5 mg/L (c), 10 mg/L (d), ou 20 mg/L (e). Des cellules témoins n'ont pas été exposées au GCV (a). L'examen microscopique et les photos ont été réalisés après 7 jours de culture. Les différents grossissements utilisés ont été x 40 ('), x100 ('), x 200 (').

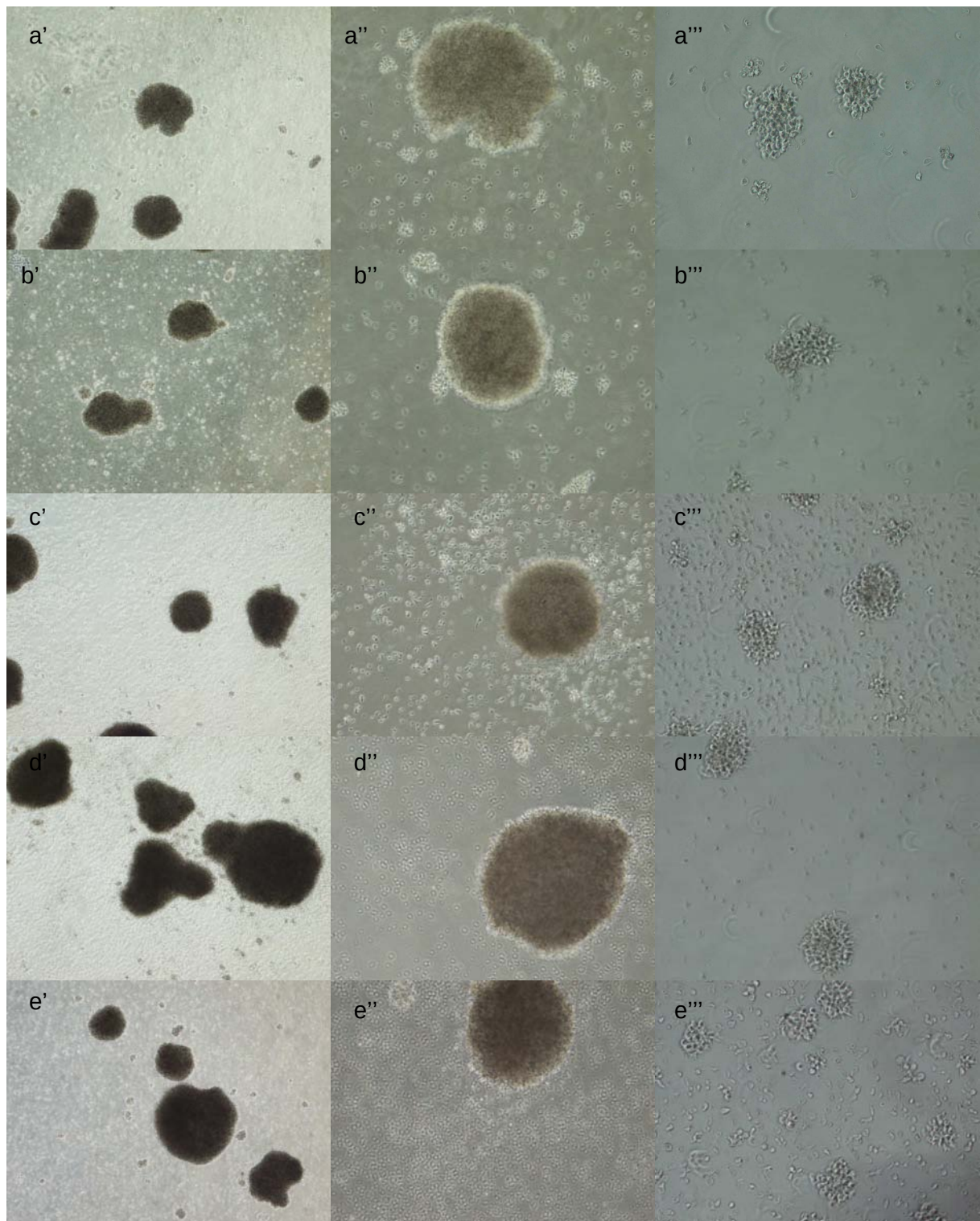


Figure 64 Microscopie électronique : Photos des cellules non infectées à J7 (cellules exposées 2 jours au GCV).

Les cellules lymphoblastoïdes B non infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 2 jours aux concentrations suivantes : 1 mg/L (b), 5 mg/L (c), 10 mg/L (d), ou 20 mg/L (e). Des cellules témoins n'ont pas été exposées au GCV (a). L'examen microscopique et les photos ont été réalisés après 7 jours de culture. Les différents grossissements utilisés ont été x 40 ('), x 100 ('), x 200 (').

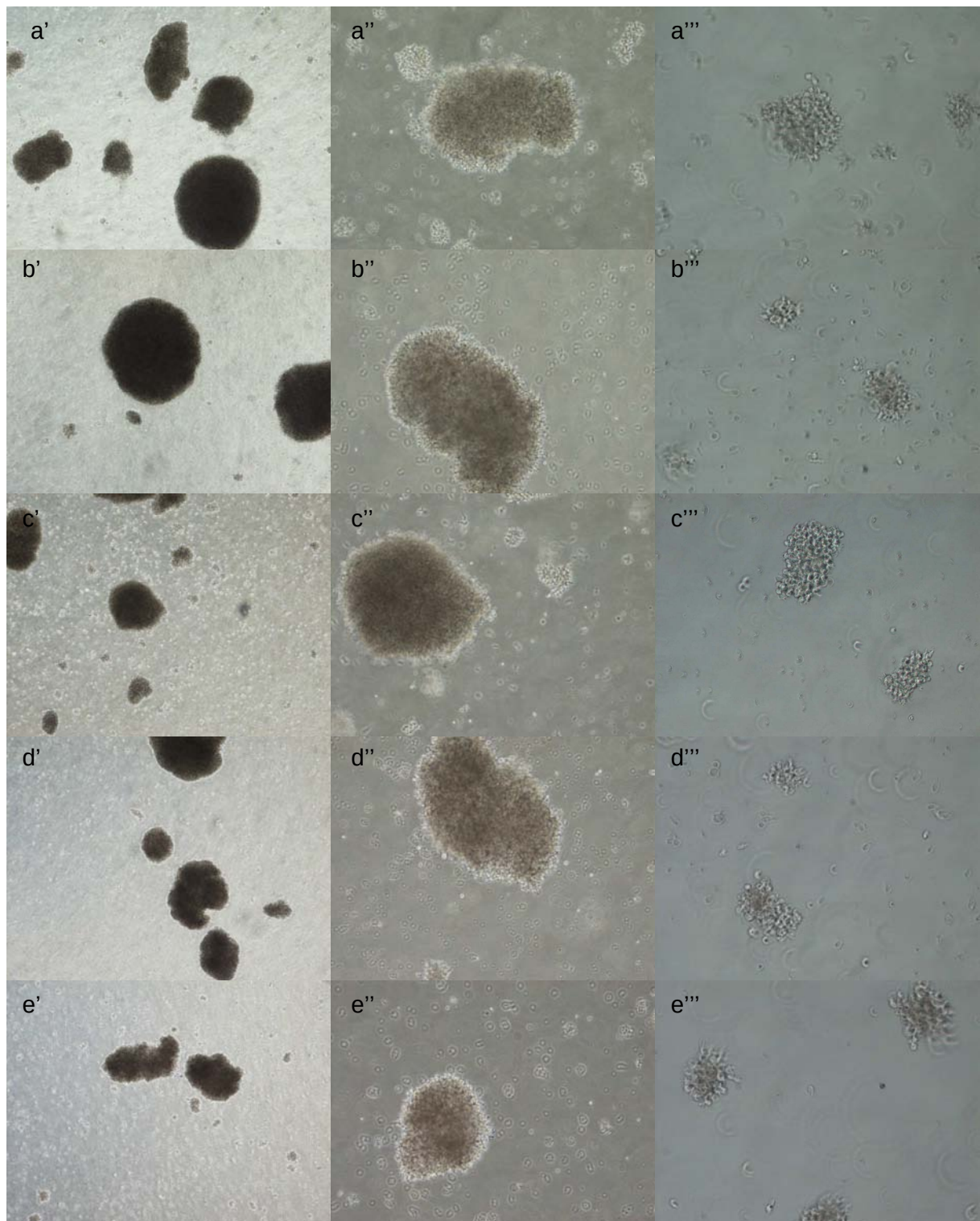


Figure 65: Microscopie électronique : Photos des cellules non infectées à J7 (cellules exposées 7 jours au GCV).

Les cellules lymphoblastoïdes B non infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 7 jours aux concentrations suivantes : 1 mg/L (b), 5 mg/L (c), 10 mg/L (d), ou 20 mg/L (e). Des cellules témoins n'ont pas été exposées au GCV (a). L'examen microscopique et les photos ont été réalisés après 7 jours de culture. Les différents grossissements utilisés ont été x 40 ('), x 100 (''), x 200 ('').



Figure 66: Microscopie électronique : Photos des cellules non infectées à J14 (cellules exposées 1 jour au GCV).

Les cellules lymphoblastoïdes B non infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 1 jour aux concentrations suivantes : 1 mg/L(b), 5 mg/L (c), 10 mg/L (d), ou 20 mg/L (e). Des cellules témoins n'ont pas été exposées au GCV (a). L'examen microscopique et les photos ont été réalisés après 14 jours de culture. Le grossissement x 200 a été utilisé.



Figure 67 Microscopie électronique : Photos des cellules non infectées à J14 (cellules exposées 2 jours au GCV).

Les cellules lymphoblastoïdes B non infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 2 jours aux concentrations suivantes : 1 mg/L(b), 5 mg/L (c), 10 mg/L (d), ou 20 mg/L (e). Des cellules témoins n'ont pas été exposées au GCV (a). L'examen microscopique et les photos ont été réalisés après 14 jours de culture. Le grossissement x 200 a été utilisé.

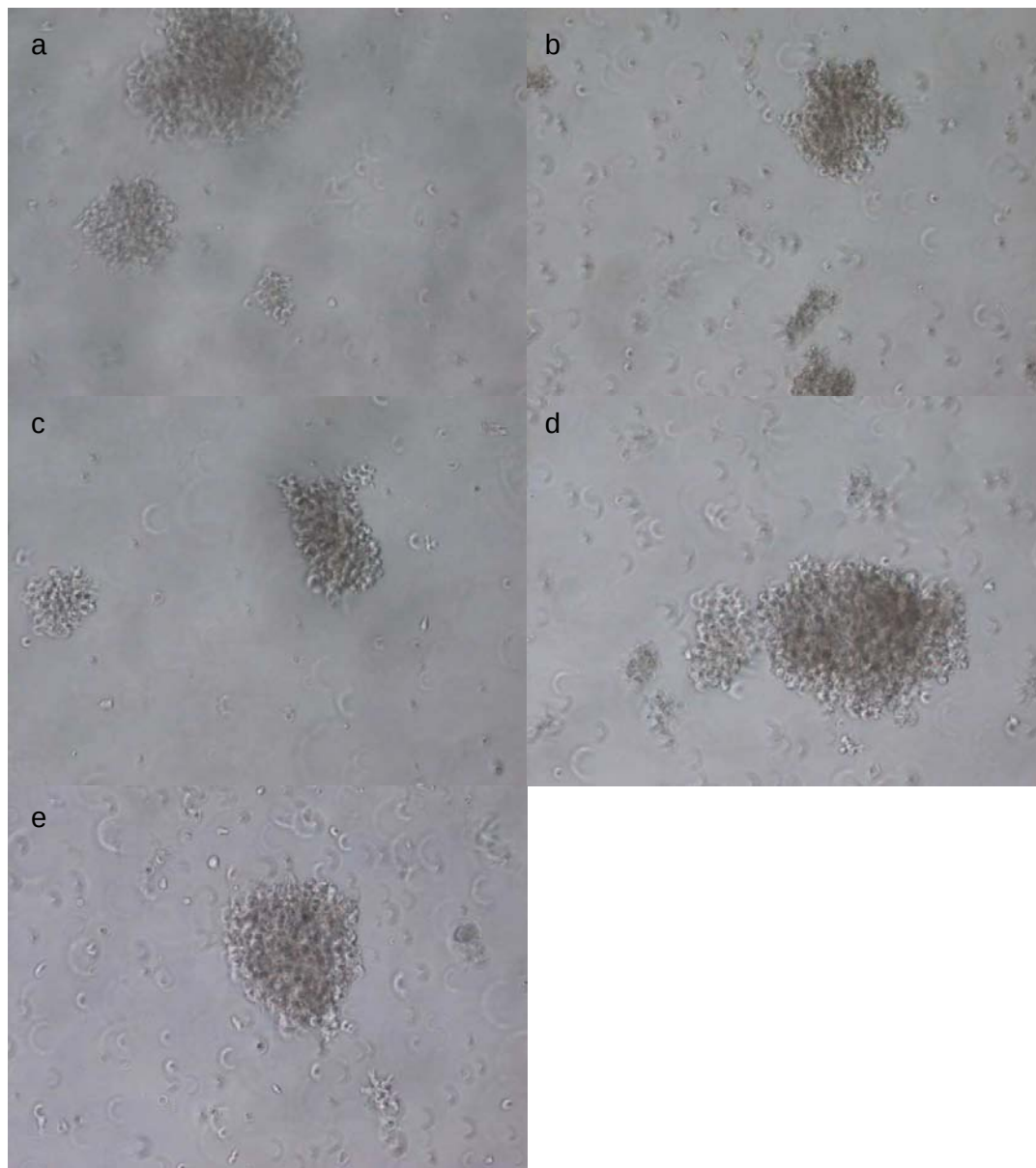


Figure 68 : Microscopie électronique : Photos des cellules non infectées à J14 (cellules exposées 7 jours au GCV).

Les cellules lymphoblastoïdes B non infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 7 jours aux concentrations suivantes : 1 mg/L(b), 5 mg/L (c), 10 mg/L (d), ou 20 mg/L (e). Des cellules témoins n'ont pas été exposées au GCV (a). L'examen microscopique et les photos ont été réalisés après 14 jours de culture. Le grossissement x 200 a été utilisé.

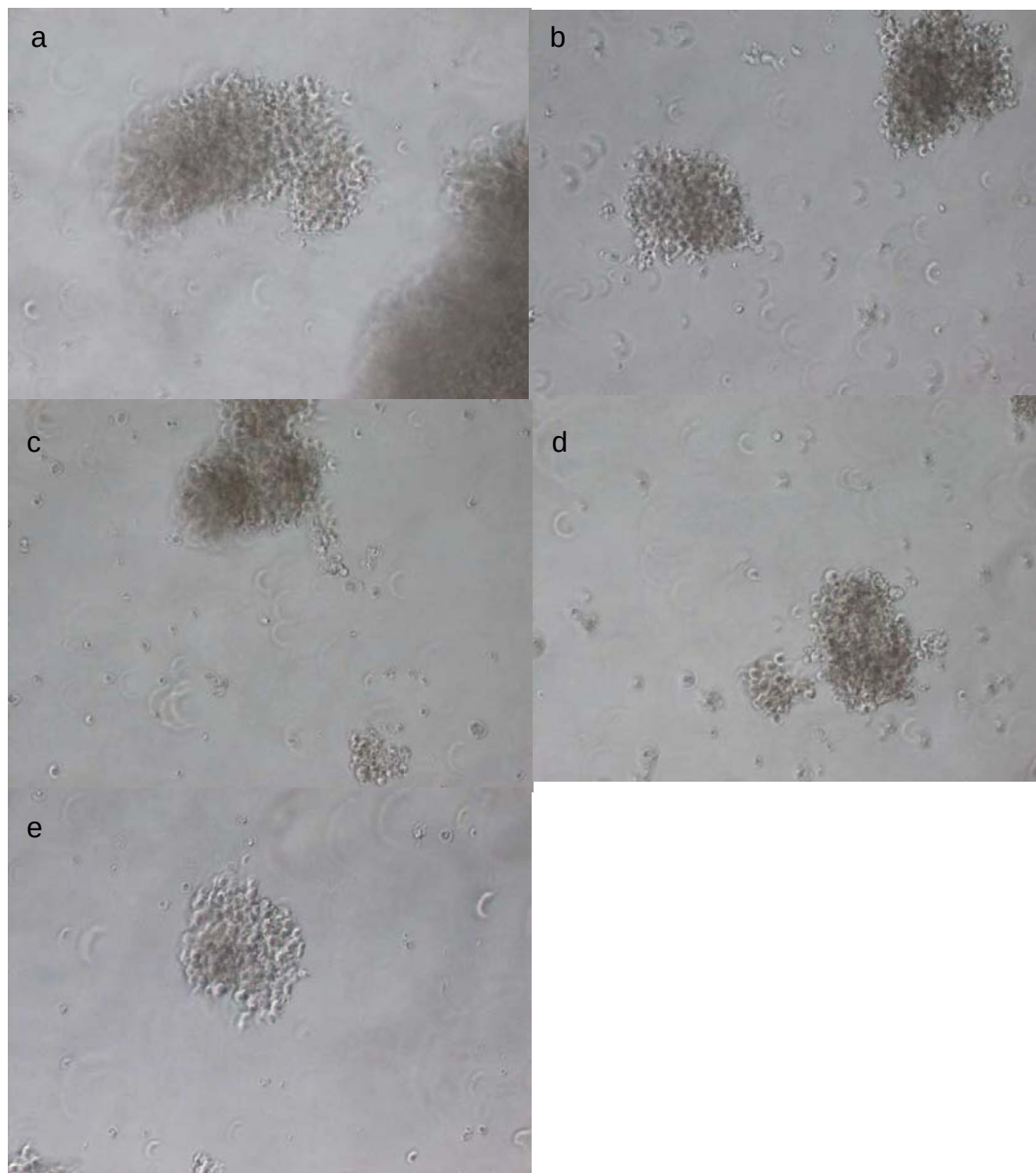


Figure 69 : Microscopie électronique : Photos des cellules non infectées à J14 (cellules exposées 14 jours au GCV).

Les cellules lymphoblastoïdes B non infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 14 jours aux concentrations suivantes : 1 mg/L (b), 5 mg/L (c), 10 mg/L (d), ou 20 mg/L (e). Des cellules témoins n'ont pas été exposées au GCV (a). L'examen microscopique et les photos ont été réalisés après 14 jours de culture. Le grossissement x 200 a été utilisé.

3.4.6.2. *Toxicité et efficacité sur cellules infectées*

3.4.6.2.1. Numération cellulaire par compteur COULTER

L'infection par le CMV a stoppé la croissance cellulaire indépendamment de l'exposition au GCV ; les profils obtenus ont été assez similaires quelque soit la durée d'exposition au GCV (figure 70a, b, c et d) avec une tendance à une inhibition de la croissance cellulaire concentration dépendante jusqu'à 7 jours (figures 63a, b et c) mais non retrouvée pour l'exposition au GCV pendant 14 jours (figure 63d).

Cependant, contrairement aux résultats de l'essai préliminaire C, l'effet du GCV sur la croissance cellulaire a pu être distingué, malgré la toxicité importante du CMV.

Après 14 jours d'exposition au GCV et à J14 (figure 63 d), la concentration en GCV à 10 mg/L a été liée à un nombre de cellules plus important (que pour les autres concentrations d'exposition). Cependant, ce résultat reste difficilement interprétable d'autant qu'il n'a pas été retrouvé sur l'autre souche cellulaire traitée dans les mêmes conditions (données non montrées).

La figure 71 exprime des résultats relatifs : nombre de cellules exposées au GCV par rapport à des cellules non exposées mais traitées exactement dans les mêmes conditions. Elle confirme l'influence de la concentration jusqu'à J7.

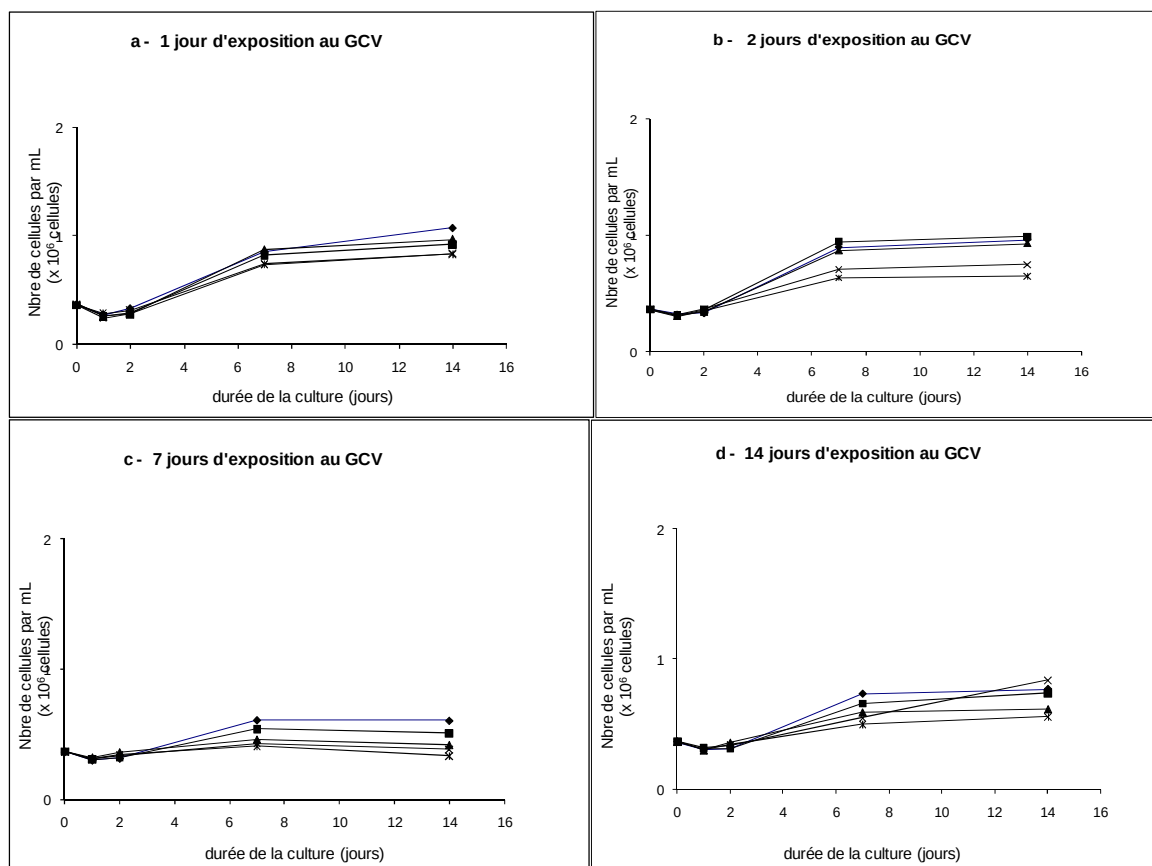


Figure 70 Effet du ganciclovir (GCV) sur la croissance cellulaire - cellules infectées par le CMV.

Les cellules lymphoblastoïdes B infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 1 jour (a), 2 jours (b), 7 jours (c), ou 14 jours (d). Les concentrations d'exposition ont été 1 mg/L (■), 5 mg/L (▲), 10 mg/L (×), ou 20 mg/L (*). En plus, des cellules « témoin » n'ont pas été exposées au GCV (◆). La culture cellulaire a été poursuivie pendant 14 jours au total (indépendamment de la durée d'exposition au GCV). Le nombre de cellules (mesure par compteur Coulter) a été mesuré à J0, J1, J2, J7, et J14. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures.

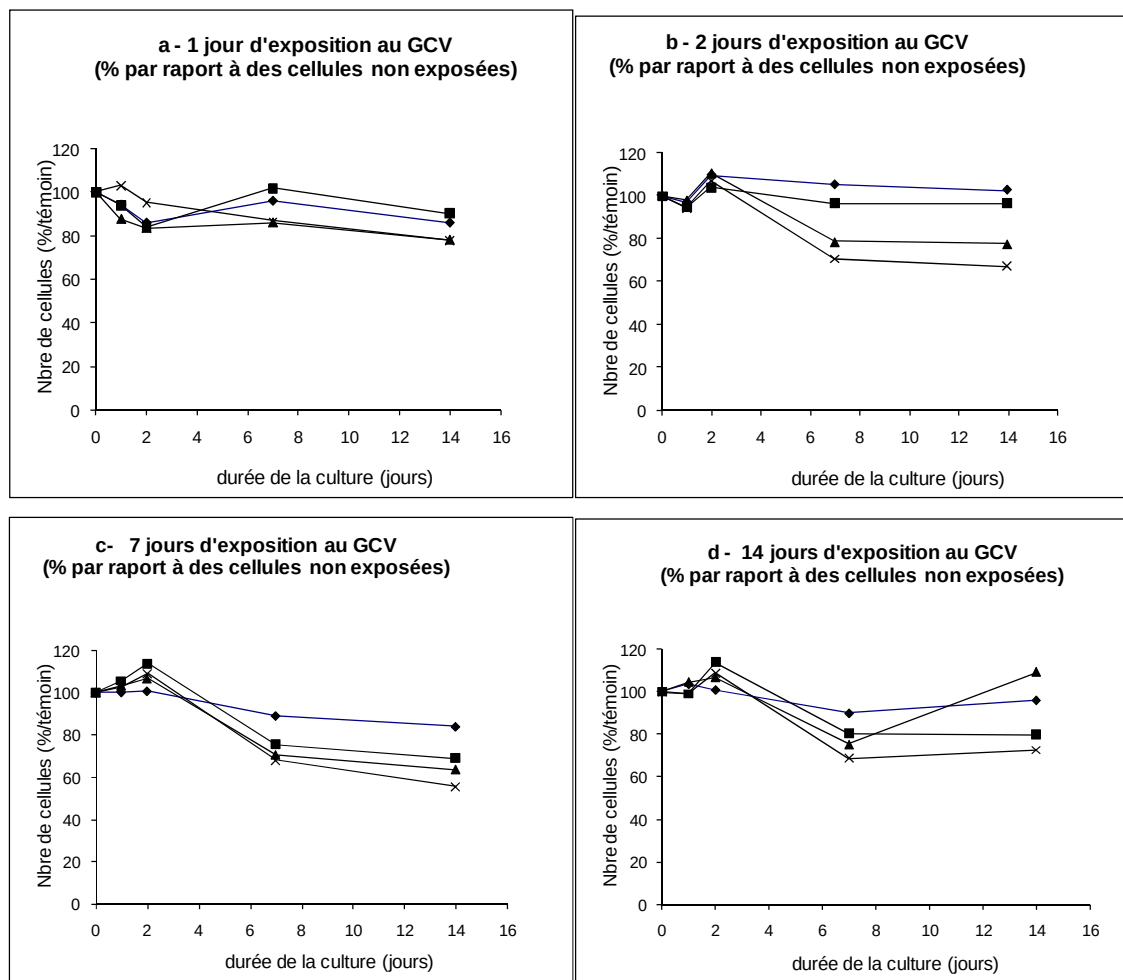


Figure 71 : Effet du ganciclovir (GCV) sur la croissance cellulaire (exprimé en % du nombre de cellules « témoin » non exposées au GCV) – cellules infectées par le CMV.

Les cellules lymphoblastoïdes B non infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 1 jour (a), 2 jours (b), 7 jours (c), ou 14 jours (d). Les concentrations d'exposition ont été 1 mg/L (◆), 5 mg/L (■), 10 mg/L (▲), ou 20 mg/L (×). En plus, des cellules « témoin » n'ont pas été exposées au GCV. La culture cellulaire a été poursuivie pendant 14 jours au total (indépendamment de la durée d'exposition au GCV). Le nombre de cellules (mesure par compteur Coulter) a été mesuré à J0, J1, J2, J7, et J14. Les valeurs expriment le nombre de cellules (pour chaque concentration testée) en pourcentage du nombre de cellules « témoin » non exposées au GCV. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures. Le pourcentage de cellule

Aucune corrélation significative n'a pu être mise en évidence entre la concentration en GCV et la toxicité cellulaire (figure 72) et quelque soit la durée d'exposition au GCV. Cependant la toxicité cellulaire provenant essentiellement de l'infection par le CMV, il n'est pas étonnant de « perdre » la relation concentration-toxicité au profit d'une relation infection-toxicité plus forte.

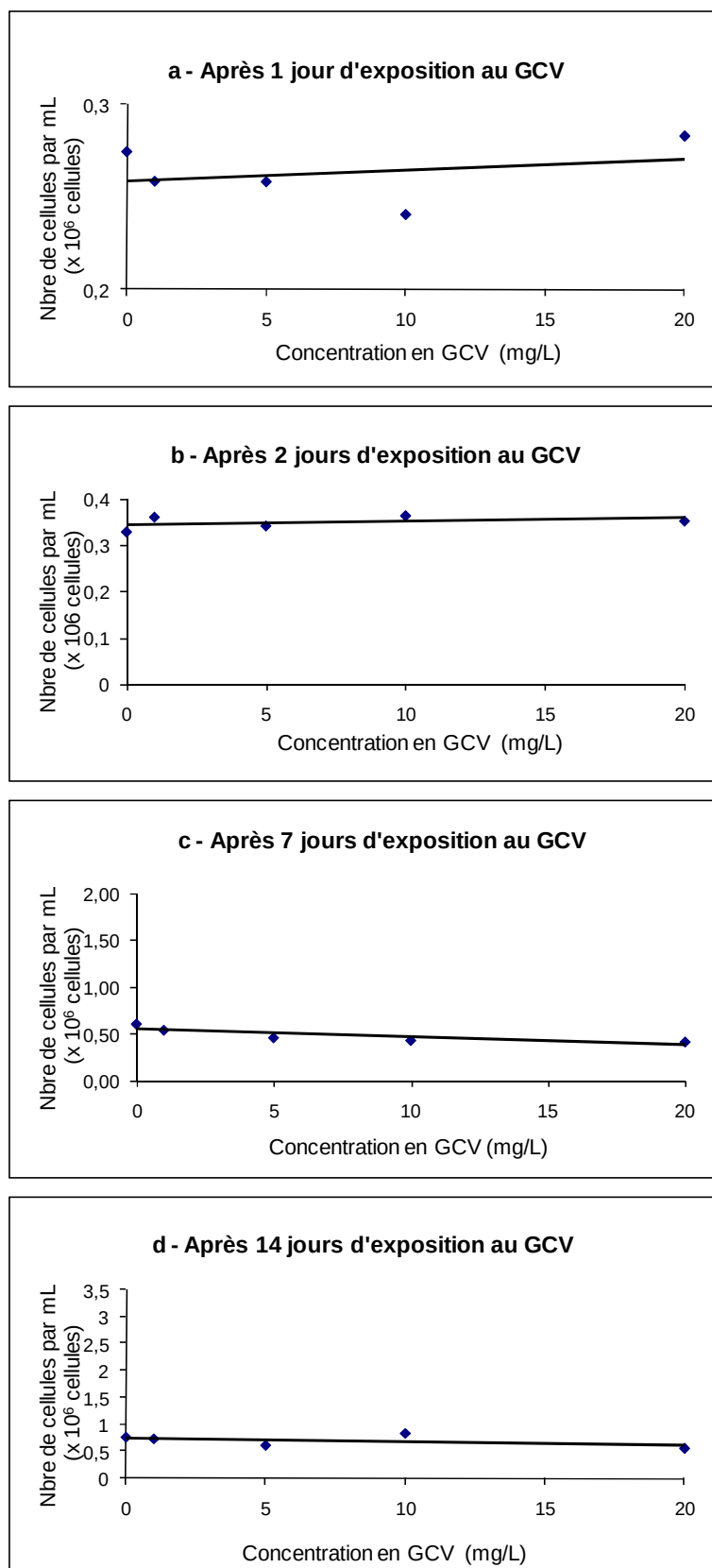


Figure 72 : Nombre de cellules versus concentration en ganciclovir (GCV) – cellules infectées par le CMV.

Les cellules lymphoblastoïdes B infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 1 jour (a), 2 jours (b), 7 jours (c), ou 14 jours (d). Le nombre de cellules a été mesuré (compteur Coulter) à la fin de l'exposition au GCV (1, 2, 7 ou 14 jours). Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures. L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: (a) $r^2 = 0.08$, NS; (b) $r^2 = 0.13$, NS; (c) $r^2 = 0.70$, NS; (d) $r^2 = 0.27$, NS.

3.4.6.2.2. Numération cellulaire et viabilité par compteur ADAM

Après 7 jours de culture cellulaire la viabilité n'a pas paru liée à la concentration en GCV (figure 73). Les résultats montraient pour la concentration de 5mg/L et des durées d'exposition inférieures à 7 jours une augmentation de la viabilité cellulaire, qui aurait pu signifier que cette concentration permettait de lutter contre le CMV et donc aussi d'empêcher sa toxicité ; cependant ces résultats n'ont pas été retrouvés sur la souche B (données non montrées) et restent donc difficilement interprétables.

Après 14 jours de culture cellulaire, la viabilité était fortement liée au GCV pour des expositions de 1 jour ($p = 0,02$); pour les expositions plus longues, elle semblait liée à la concentration jusqu'à 10 mg/L puis stable pour la concentration supérieure (20 mg/L) (Figure 74) ; Il se pourrait que la toxicité importante à 10 et 20 mg/L soit contrebalancée à 20 mg/L par une efficacité plus importante contre le CMV (et donc une diminution de la toxicité virale ?).

Si la corrélation concentration en GCV- viabilité n'a pas été mise en évidence, le nombre de cellules vivantes a toujours été plus faible pour des cellules exposées par rapport à des cellules non exposées et même pour les plus faibles concentrations en GCV. Les résultats sont cependant à interpréter avec précautions, étant donné le nombre faible de cellules pour l'analyse par ADAM.

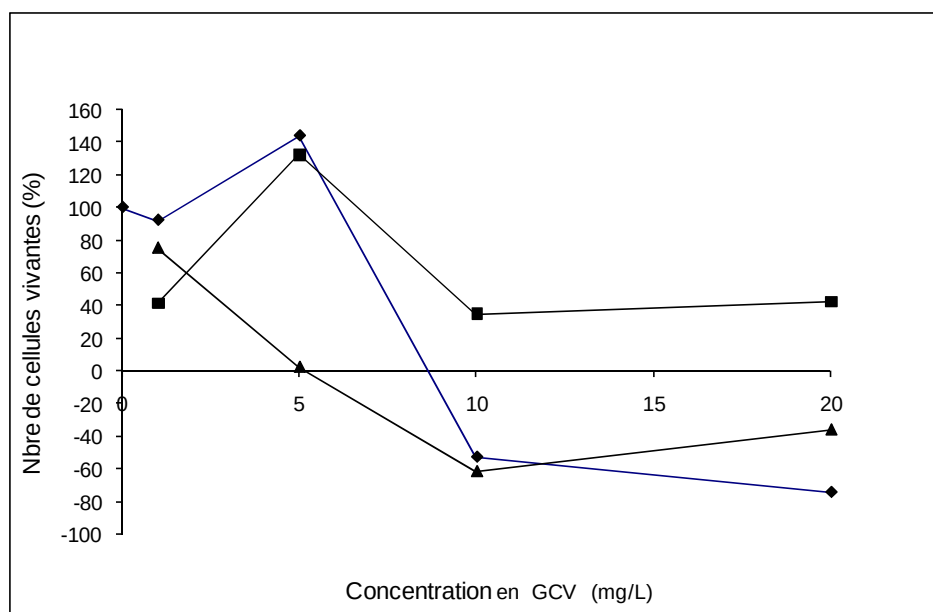


Figure 73 : Effet de la concentration en GCV sur la viabilité cellulaire (exprimée en % par rapport à des cellules non traitées) après 7 jours de culture cellulaire – cellules infectées par le CMV.

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été exposées au GCV pendant 1 jour (◆), 2 jours (■), ou 7 jours (▲). Le nombre de cellules vivantes (cellules totales mesurées - cellules mortes mesurées) a été analysé par le compteur ADAM à J7. Le pourcentage de cellules vivantes correspond ici au rapport entre le nombre de cellules vivantes exposées au GCV (1, 5, 10 et 20 mg/L) et le nombre de cellules vivantes en l'absence d'exposition au GCV. Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures.

L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: (a) $r^2 = 0.71$, NS; (b) $r^2 = 0.09$, NS; (c) $r^2 = 0.53$, NS.

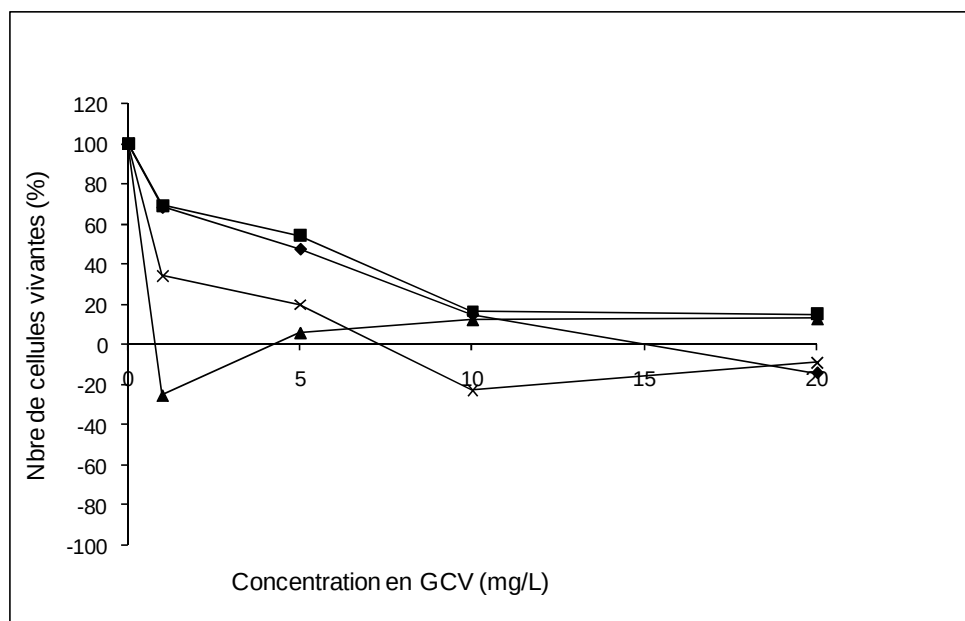


Figure 74 : Effet de la concentration en GCV sur la viabilité cellulaire (exprimée en % par rapport à des cellules non traitées) après 14 jours de culture cellulaire – cellules infectées par le CMV.

Les cellules lymphoblastoïdes B ont été exposées au GCV pendant 1 jour (◆), 2 jours (■), 7 jours (▲) ou 14 jours (×). Le nombre de cellules vivantes (cellules totales mesurées - cellules mortes mesurées) a été analysé par le compteur ADAM à J14. Le pourcentage de cellules vivantes correspond ici au rapport entre le nombre de cellules vivantes exposées au GCV (1, 5, 10 et 20 mg/L) et le nombre de cellules vivantes en l'absence d'exposition au GCV. Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures. L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: (a) $r^2 = 0.90$, $p = 0.02$; (b) $r^2 = 0.76$, $p = 0.045$; (c) $r^2 = 0.06$, NS ; (d) $r^2 = 0.55$, NS.

La corrélation entre les 2 méthodes de mesure (ADAM et COULTER) n'a pas été établie ($r^2 = 0.36$, NS, figure 75), avec 2 explications possibles : la présence de nombreuses cellules mortes a pu entraîner un comptage en surnombre des cellules (si les cellules mortes étaient de taille proche des cellules vivantes) par le compteur COULTER ; Le nombre de cellules était beaucoup plus faible que pour les cultures de cellules non infectées et on s'est retrouvé dans les limites basses de quantification de l'appareil ADAM avec une précision moins bonne des mesures.

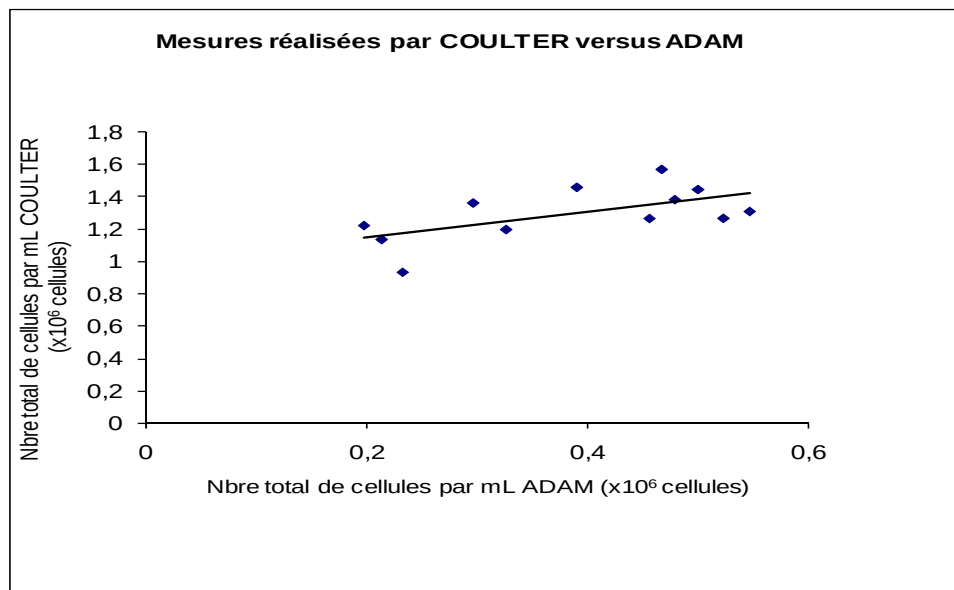


Figure 75 : Corrélation entre le nombre total de cellules mesuré par COULTER versus ADAM- cellules infectées par le CMV.

Toutes les mesures du nombre de cellules réalisées par les 2 méthodes ont été comparées. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures. L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: $r^2 = 0.36$, NS.

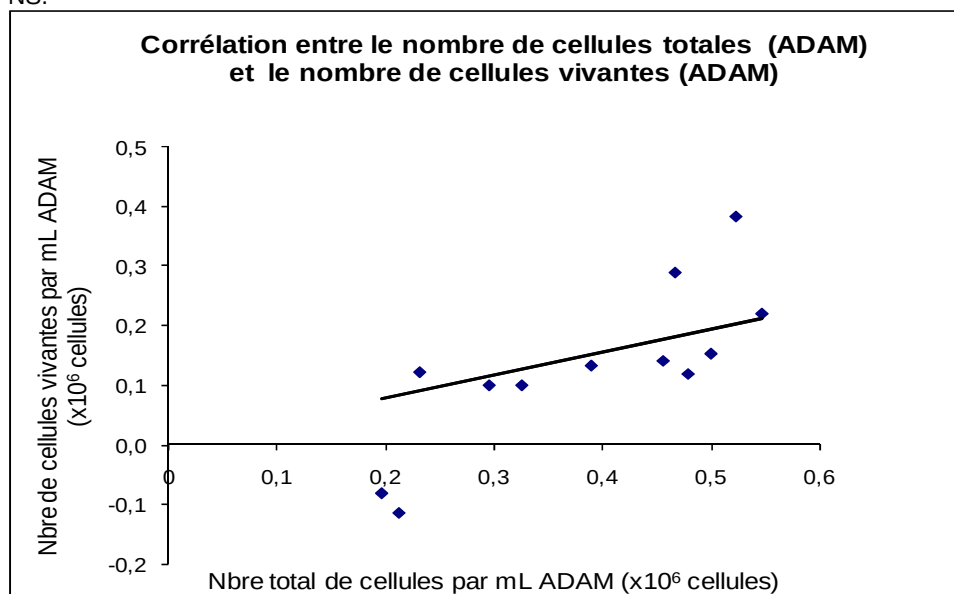


Figure 76 : Corrélation entre le nombre de cellules vivantes versus nombre total de cellules (mesurées par le compteur ADAM) – cellules infectées par le CMV.

Toutes les mesures du nombre de cellules vivantes (compteur ADAM) et les mesures du nombre total de cellules (compteur ADAM) ont été comparées. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures. L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: $r^2 = 0.63$, $p=0.02$.

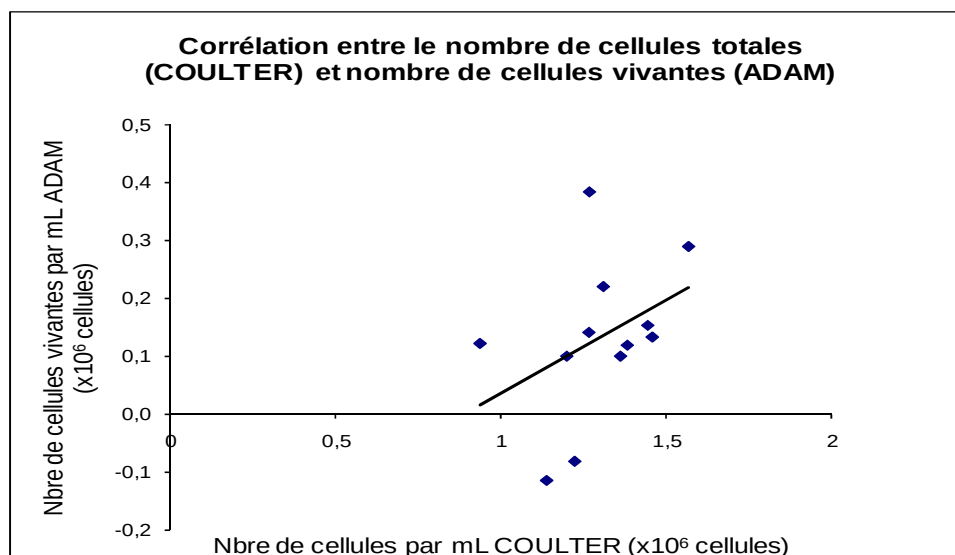


Figure 77 : Corrélation entre le nombre de cellules vivantes (mesurées par le compteur ADAM) versus nombre total de cellules (mesurées par le compteur COULTER) – cellules infectées par le CMV.

Toutes les mesures du nombre de cellules vivantes (compteur ADAM) et les mesures du nombre total de cellules (compteur COULTER) ont été comparées. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures. L'analyse par régression linéaire a donné les résultats suivants: $r^2 = 0.15$, NS.

3.4.6.2.3. Charge virale

D'après la figure 78 et contrairement à l'essai prélimaire C d'efficacité, la charge virale à J7 était liée à la concentration initiale en GCV pour des expositions au GCV de 1 et 2 jours (figures 78a et b) avec une reprise de la croissance virale uniquement pour la plus faible concentration (1 mg/L) et non retrouvée pour les autres concentrations (5, 10 et 20 mg/L)

Ces premiers résultats d'efficacité montrent que des expositions courtes mais de moyenne à forte intensité sont capables d'inhiber la multiplication virale (pas de reprise de la croissance virale après arrêt de l'exposition).

Pour des expositions plus longues, le caractère concentration-dépendant à J7 n'a pas été retrouvé comme le montrent les figures 78 c et d ; il semble dans ce cas que la durée d'exposition ait plus d'influence que l'intensité d'exposition sur l'effet antiviral.

Les résultats à J14 ont montré une charge virale basse, mais indépendamment de l'exposition au GCV. Comme dans l'essai d'efficacité C, il semble que la toxicité du CMV empêche le renouvellement cellulaire et donc limite la multiplication virale à long terme à défaut de cellules- hôtes en quantité suffisante.

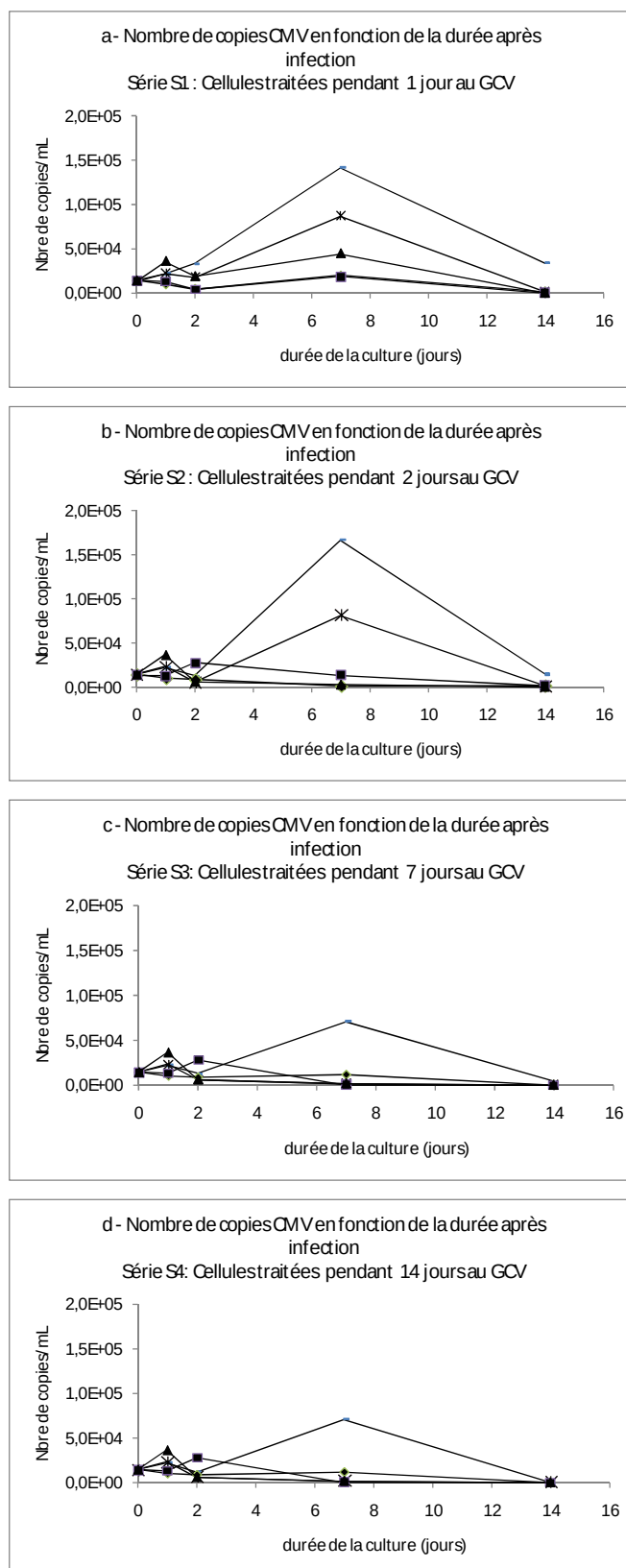


Figure 78 : Effet du ganciclovir sur la charge virale CMV (nombre de copies /mL) a b c
Les cellules lymphoblastoïdes B infectées par le CMV à J0 et exposées au GCV à J0. La durée d'exposition au GCV a été de 1 jour (a), 2 jours (b), ou 7 jours (c). Les concentrations d'exposition ont été 1 mg/L (*), 5 mg/L (◆), 10 mg/L (■), ou 20 mg/L (▲). En plus, des cellules « témoin » infectées par le CMV n'ont pas été exposées au GCV (-). La culture cellulaire a été poursuivie pendant 14 jours au total (indépendamment de la durée d'exposition au GCV). La charge virale a été mesurée par PCR à J-3, J0, J2, J7, et J14. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures.

3.4.6.2.4. Examen microscopique des cellules

L'examen microscopique des cellules a été réalisé à J0 (données non montrées), J7 et J14. Les photos réalisées (à J7 et J14) sont retrouvées figures 79 à 85.

Après 7 jours de cultures (figures 79 à 81), les amas cellulaires (clusters) étaient rares et les cellules présentaient une viabilité (observations au plus fort grossissement) nettement inférieure à celle observée à J7 pour des cellules non infectées par le CMV (figures 86 et 87). Cette différence entre les cellules infectées et non infectées montre la toxicité forte du CMV et son effet inhibiteur de la croissance cellulaire. L'influence de la concentration en GCV était visible pour les séries exposées pendant 2 et 7 jours : la taille des clusters semblait diminuer avec des concentrations croissantes en GCV (figures 80 a''' et e''' ; figures 81 a''' et e'''). Contrairement à ce qui avait été observé pour les cellules non infectées par le CMV, un effet de la durée d'exposition en GCV (1,2 ou 7 jours) sur la croissance cellulaire était observé. Plus la durée était longue (figure 81), plus les amas cellulaires étaient rares. Les amas cellulaires étaient très sombres par rapport à ceux des cellules non infectées aux mêmes temps (figure 86) : ils correspondaient à une proportion importante de cellules mortes.

Après 14 jours de culture (figures 82 à 85), les amas cellulaires présentaient des caractéristiques équivalentes à l'observation à 7 jours. Les cellules présentaient le même aspect. Une différence qualitative et quantitative à J14 en fonction de la concentration en GCV n'a pas été mise en évidence. Comme à J7 il semble que plus la durée d'exposition au GCV était longue, plus les amas cellulaires étaient rares et de petite taille (figures 82 et 85).

L'examen microscopique donne des informations en accord avec les résultats du comptage des cellules par COULTER et de la viabilité par ADAM. Ces résultats nous montrent aussi les limites de la poursuite de la culture cellulaire sur 14 jours alors que la croissance dès J7 est stoppée avec un nombre de cellules mortes très important.

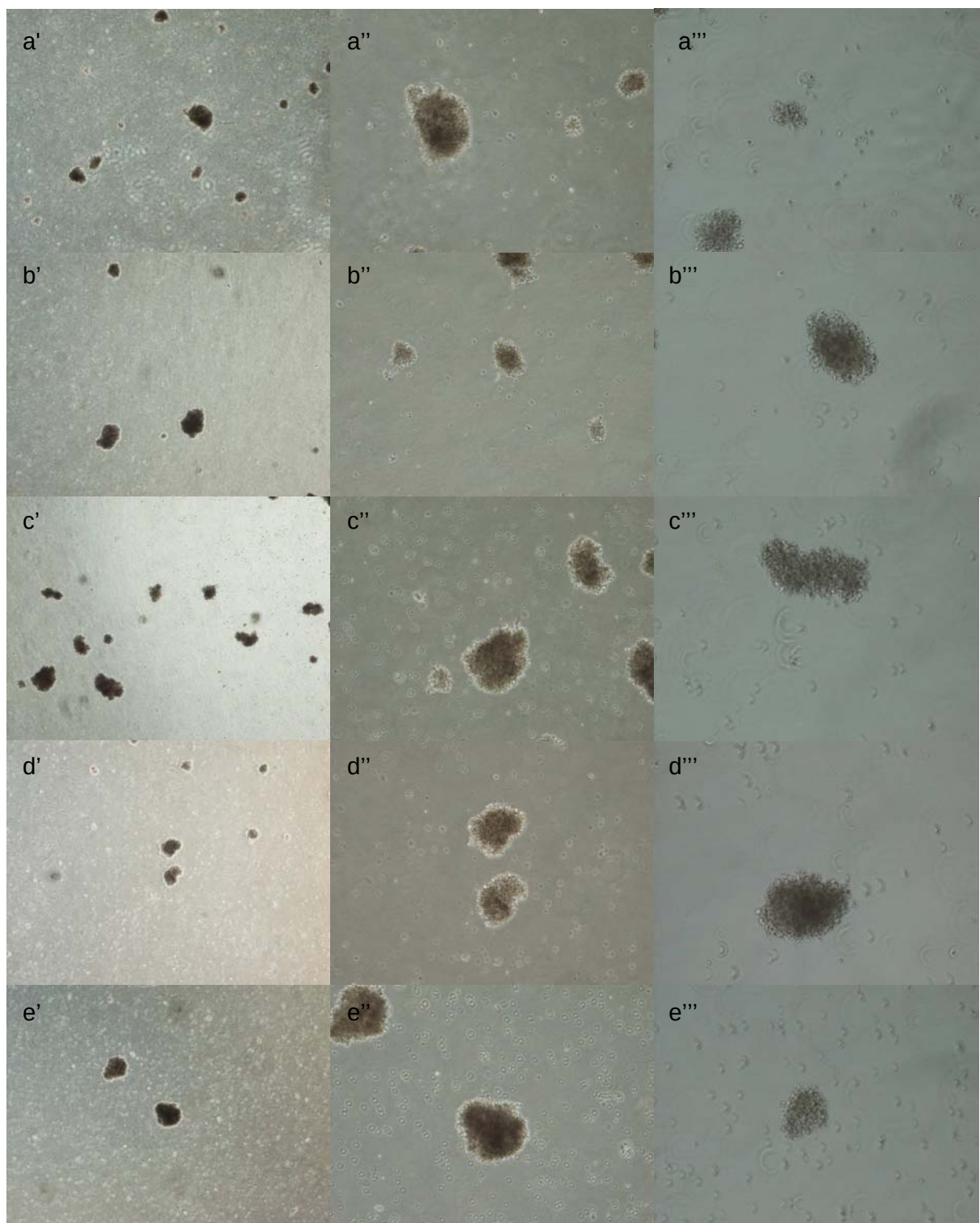


Figure 79 : Microscopie électronique : Photos des cellules infectées à J7 (cellules exposées 1 jour au GCV).

Les cellules lymphoblastoïdes B infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 1 jour aux concentrations suivantes : 1 mg/L (b), 5 mg/L (c), 10 mg/L (d), ou 20 mg/L (e). Des cellules témoins n'ont pas été exposées au GCV (a). L'examen microscopique et les photos ont été réalisés après 7 jours de culture. Les différents grossissements utilisés ont été x 40 ('), x 100 (''), x 200 (''').

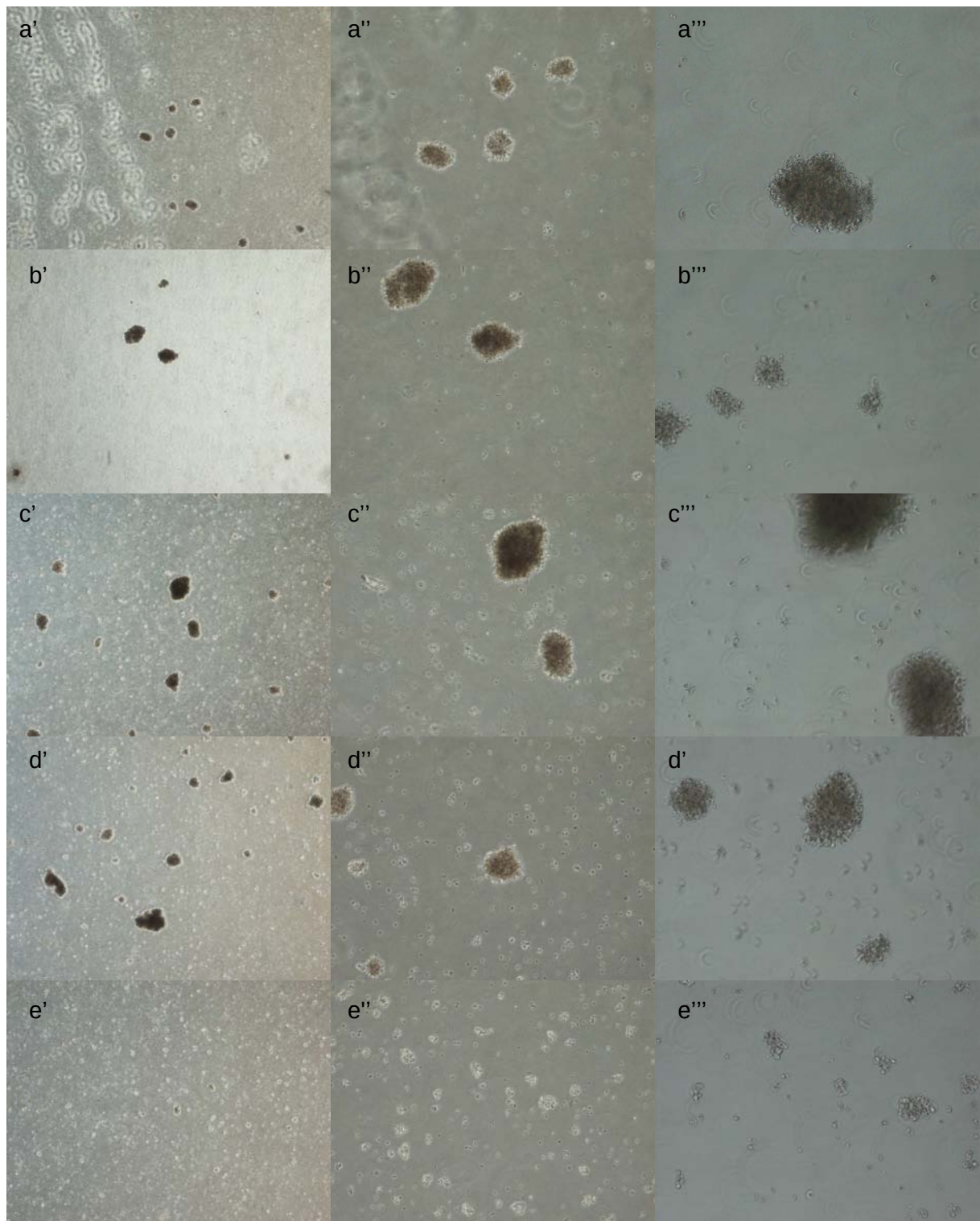


Figure 80 Microscopie électronique : Photos des cellules infectées à J7 (cellules exposées 2 jours au GCV).

Les cellules lymphoblastoïdes B infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 2 jours aux concentrations suivantes : 1 mg/L(b), 5 mg/L (c), 10 mg/L (d), ou 20 mg/L (e). Des cellules témoins n'ont pas été exposées au GCV (a). L'examen microscopique et les photos ont été réalisés après 7 jours de culture. Les différents grossissements utilisés ont été x40 ('), x 100 (''), x 200 ('''').

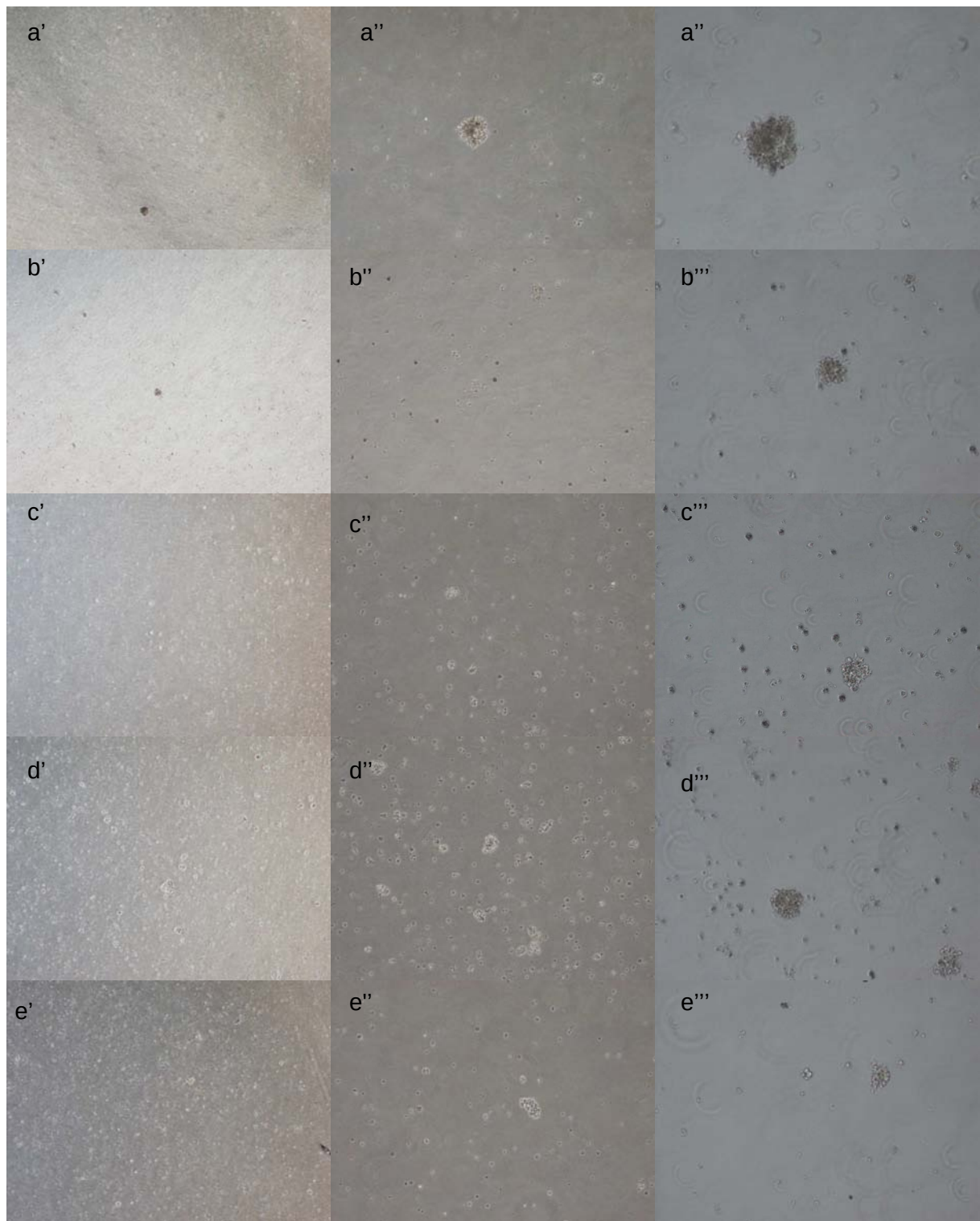


Figure 81 : Microscopie électronique : Photos des cellules infectées à J7 (cellules exposées 7 jours au GCV).

Les cellules lymphoblastoïdes B infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 7 jours aux concentrations suivantes : 1 mg/L(b), 5 mg/L (c), 10 mg/L (d), ou 20 mg/L (e). Des cellules témoins n'ont pas été exposées au GCV (a). L'examen microscopique et les photos ont été réalisés après 7 jours de culture. Les différents grossissements utilisés ont été x 40 ('), x 100 ('), x 200 (').

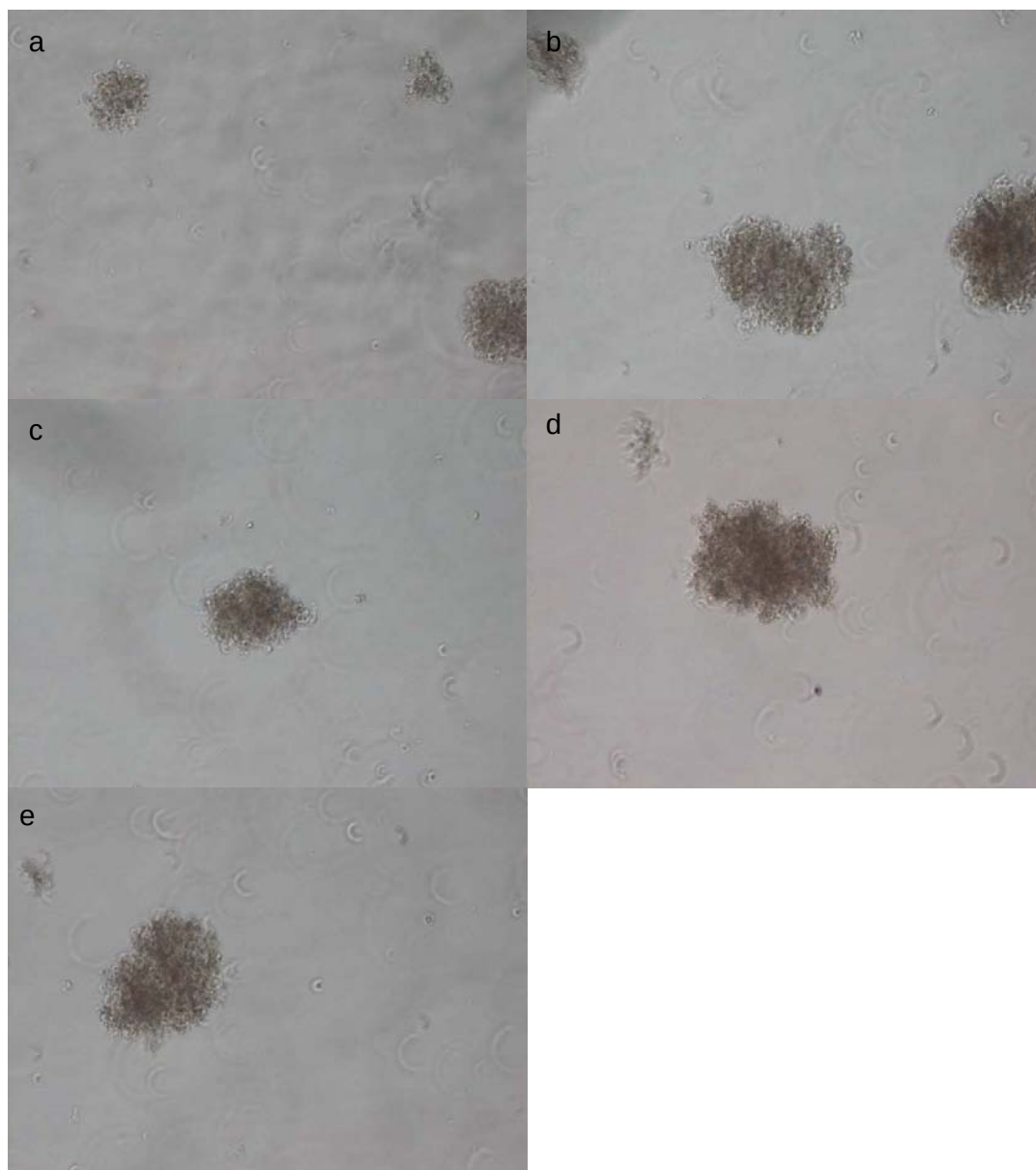


Figure 82 : Microscopie électronique : Photos des cellules infectées à J14 (cellules exposées 1 jour au GCV).

Les cellules lymphoblastoïdes B infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 1 jour aux concentrations suivantes : 1 mg/L(b), 5 mg/L (c), 10 mg/L (d), ou 20 mg/L (e). Des cellules témoins n'ont pas été exposées au GCV (a). L'examen microscopique et les photos ont été réalisés après 14 jours de culture. Le grossissement x 200 a été utilisé.

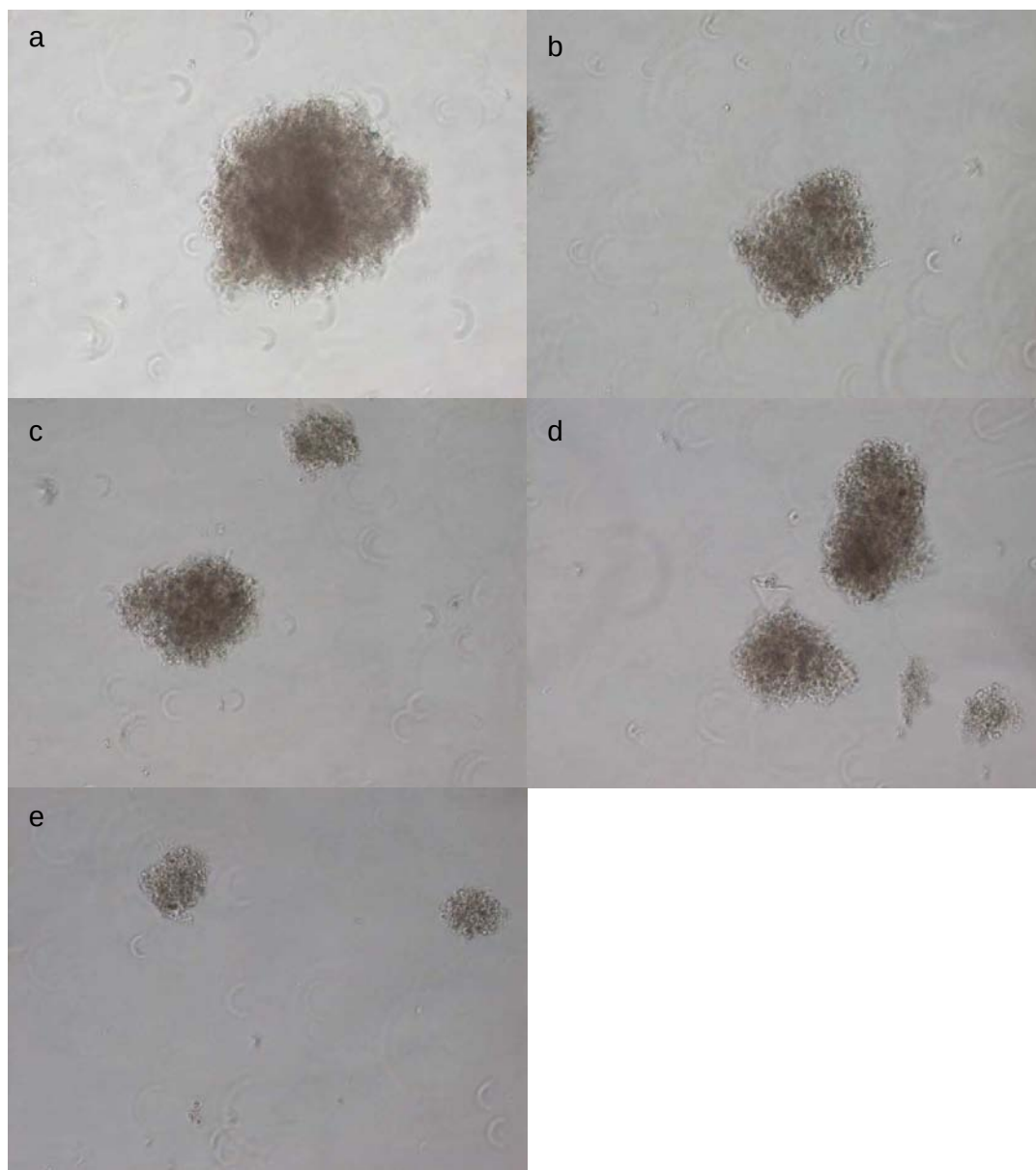


Figure 83 : Microscopie électronique : Photos des cellules infectées à J14 (cellules exposées 2 jours au GCV).

Les cellules lymphoblastoïdes B infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 2 jours aux concentrations suivantes : 1 mg/L(b), 5 mg/L (c), 10 mg/L (d), ou 20 mg/L (e). Des cellules témoins n'ont pas été exposées au GCV (a). L'examen microscopique et les photos ont été réalisés après 14 jours de culture. Le grossissement x 200 a été utilisé.



Figure 84 : Microscopie électronique : Photos des cellules infectées à J14 (cellules exposées 7 jours au GCV).

Les cellules lymphoblastoïdes B infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 7 jours aux concentrations suivantes : 1 mg/L (b), 5 mg/L (c), 10 mg/L (d), ou 20 mg/L (e). Des cellules témoins n'ont pas été exposées au GCV (a). L'examen microscopique et les photos ont été réalisés après 14 jours de culture. Le grossissement x 200 a été utilisé.

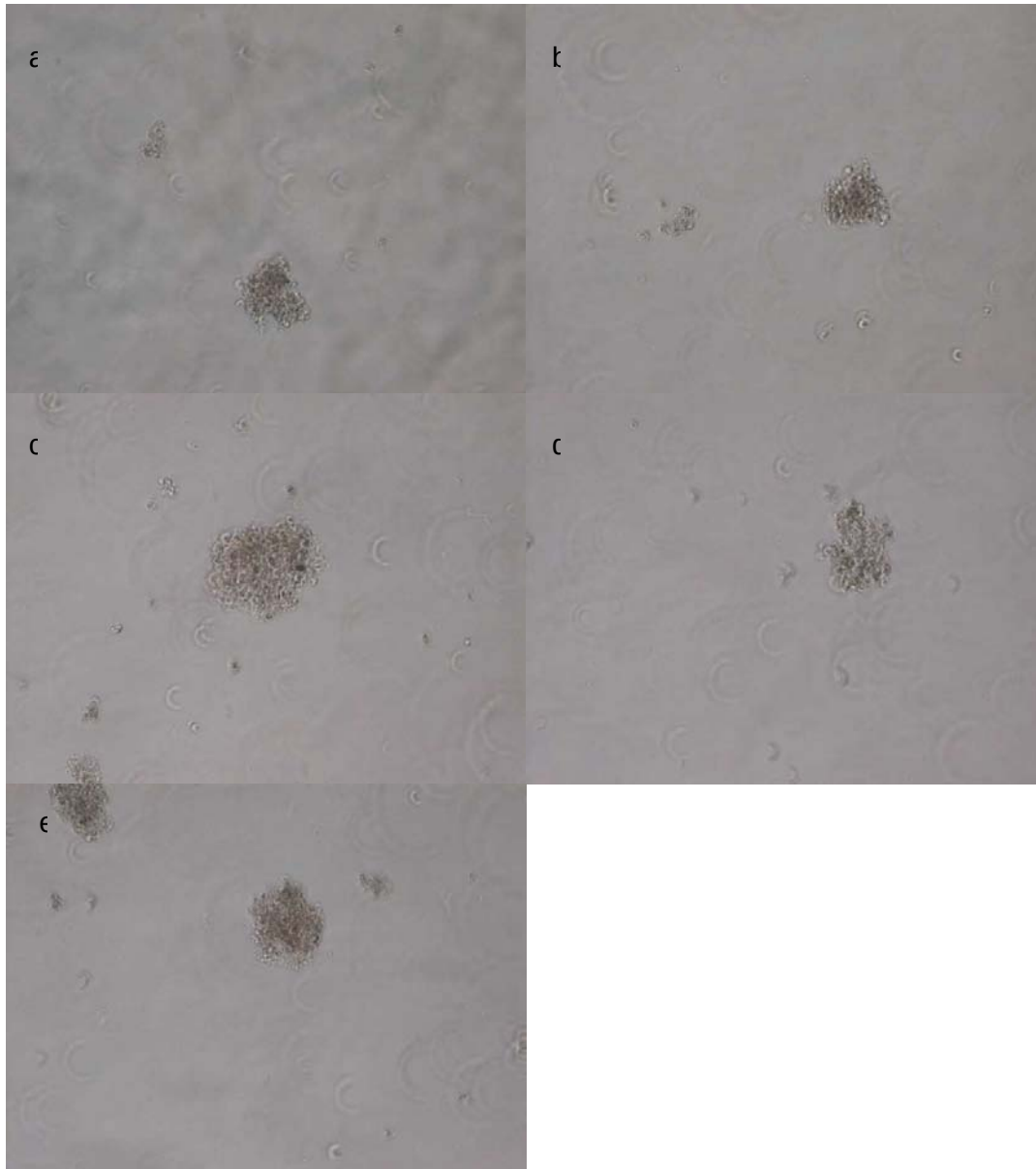


Figure 85 : Microscopie électronique : Photos des cellules infectées à J14 (cellules exposées 14 jours au GCV).

Les cellules lymphoblastoïdes B infectées par le CMV ont été exposées au GCV pendant 14 jours aux concentrations suivantes : 1 mg/L(b), 5 mg/L (c), 10 mg/L (d), ou 20 mg/L (e). Des cellules témoins n'ont pas été exposées au GCV (a). L'examen microscopique et les photos ont été réalisés après 14 jours de culture. Le grossissement x 200 a été utilisé.

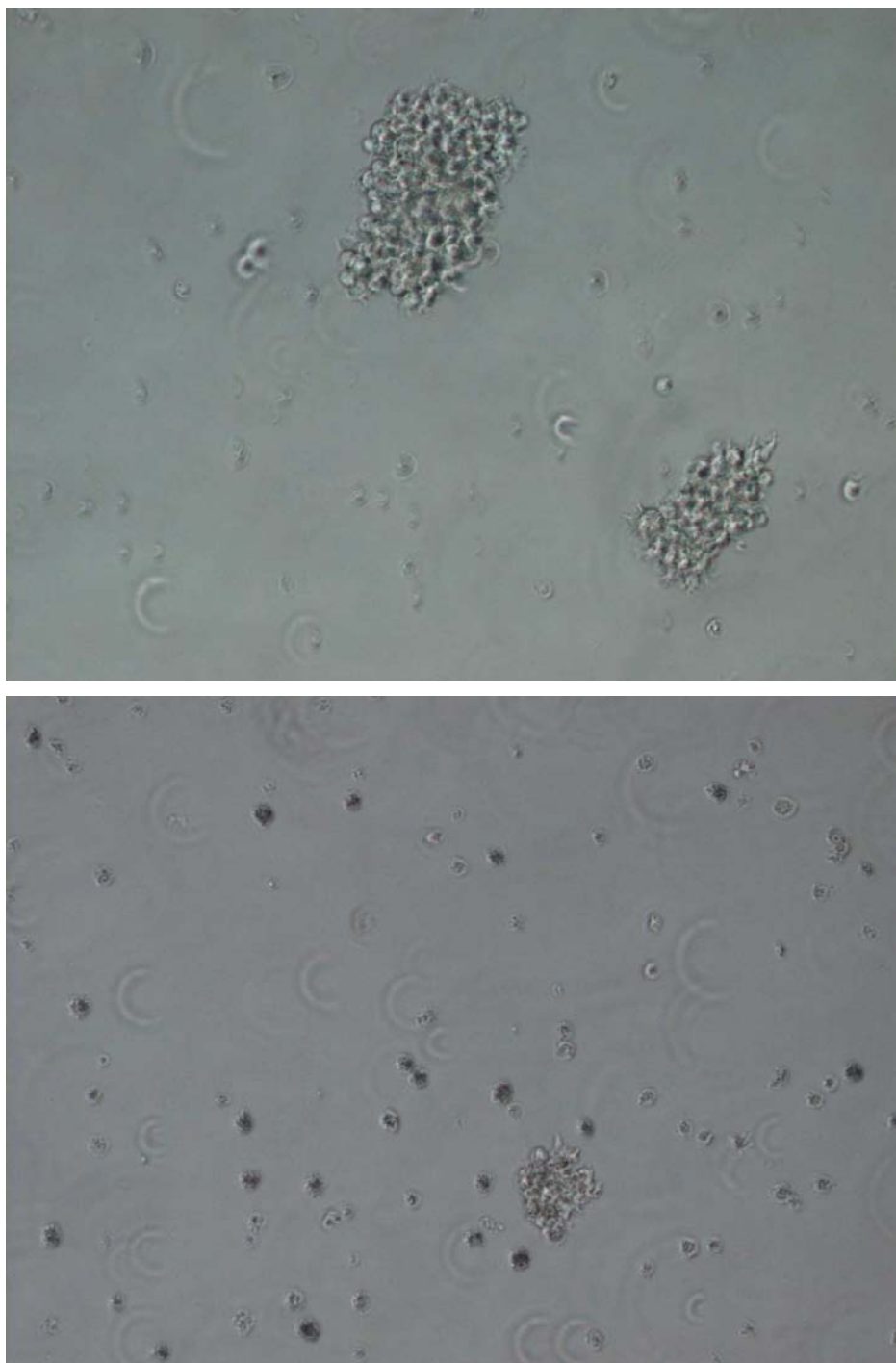


Figure 86. Microscopie électronique : Photos des cellules à J7 (cellules exposées pendant 7 jours à une concentration de GCV de 5 mg/L). Les cellules lymphoblastoïdes B n'ont pas été infectées par le CMV (en haut), ou ont été infectées par le CMV (en bas). Le grossissement x 200 a été utilisé.

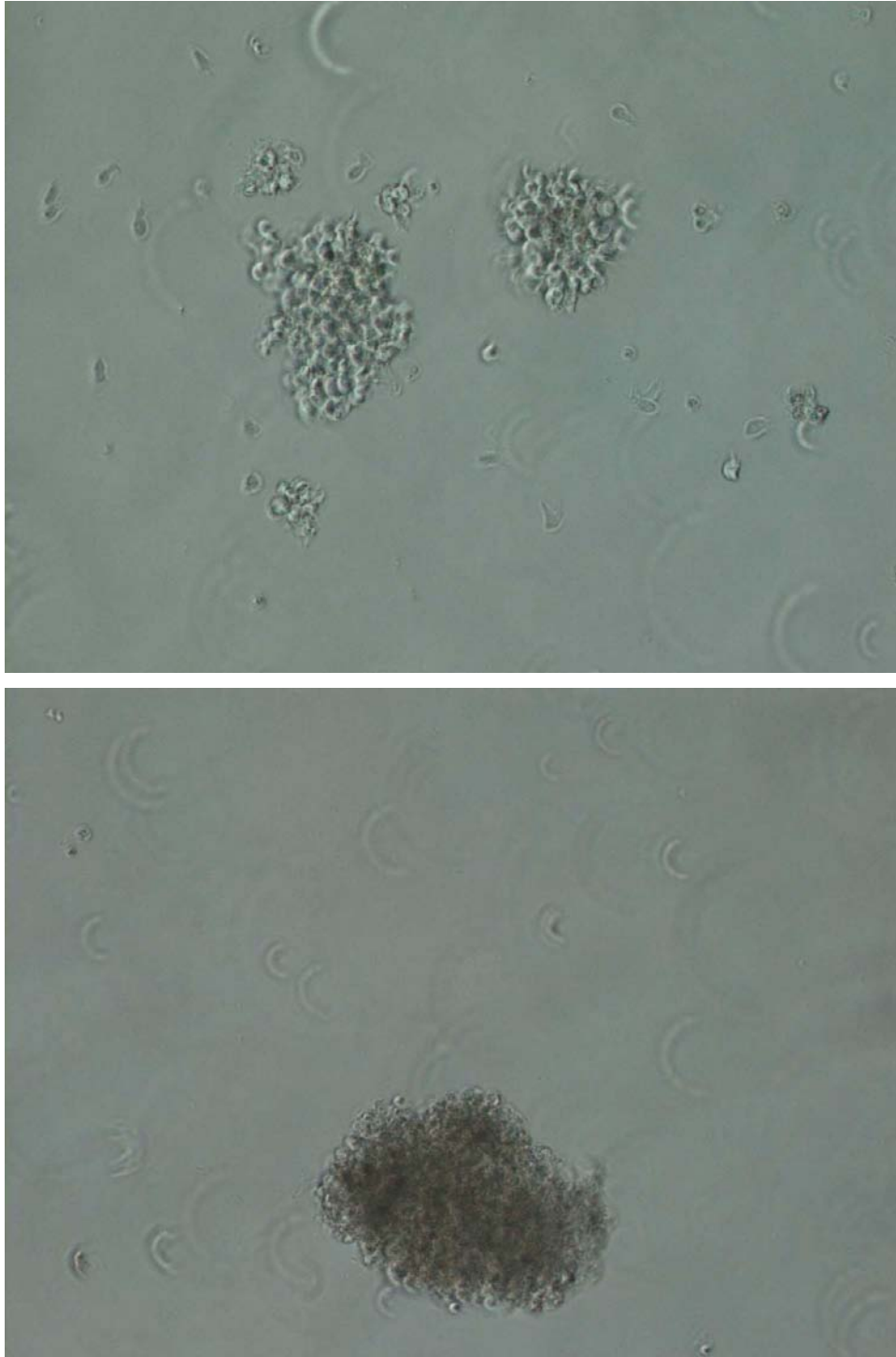


Figure 87 : Microscopie électronique : Photos des cellules à J7 (cellules non exposées au GCV)
 Les cellules lymphoblastoïdes B n'ont pas été infectées par le CMV (en haut), ou ont été infectées par le CMV (en bas). Le grossissement x 200 a été utilisé.

3.4.6.3. Conclusion

Les résultats de cet essai nous ont permis de confirmer le caractère temps-dépendant de la toxicité du GCV sur des cellules lymphoblastoïdes non infectées par le CMV ;

Ils indiquent que des concentrations fortes ne sont pas plus toxiques que des concentrations faibles si la durée d'exposition est courte; par contre la toxicité devient concentration dépendante pour les plus longues durées d'exposition, avec une toxicité déjà importante pour les concentrations les plus faibles.

En ce qui concerne l'effet antiviral, même si ces résultats méritent d'être confirmés, une exposition moyenne à forte (5 à 20 mg/L) sur une durée brève (jusqu'à 48 heures) semble aussi efficace en terme d'activité antivirale qu'une exposition plus longue (de faible ou forte intensité).

L'ensemble de ces éléments semble en accord avec l'hypothèse de départ : un traitement d'intensité plus forte mais moins long que le traitement de référence pourrait être moins toxique et aussi efficace.

Cependant, si les résultats de toxicité sur cellules non infectées ont été confirmés par plusieurs essais indépendants, les mesures de charge virale doivent être confirmées. En plus, les charges virales basses retrouvées à J14 en lien avec une mort cellulaire importante (pour tous les essais et indépendamment de l'exposition au GCV) nous montrent les limites d'un modèle cellulaire sur 14 jours pour tester l'efficacité (7 jours conviendrait mieux).

Au final, l'ensemble des essais a permis :

- La mise au point d'un protocole d'infection des cellules lymphoblastoïdes par le CMV
- L'optimisation et la validation d'un nouveau modèle cellulaire d'étude de la toxicité et de l'efficacité du GCV (qui pourrait être applicable à d'autres molécules présentant une toxicité hématologique)
- Des premiers résultats in vitro confirmant l'hypothèse de départ : une exposition au GCV moins longue mais plus intense serait aussi efficace et moins toxique que les schémas posologiques actuels.

3.4.7. Détermination du GCV triphosphate intracellulaire par HPLC MS

3.4.7.1. Méthode de détection indirecte

Cette méthode ayant été abandonnée par la suite au profit de la détermination directe des dérivés phosphorylés du GCV, seuls les résultats principaux sont présentés dans ce document.

3.4.7.1.1. ESSAI 1 : Comparaison des colonnes de chromatographie pour la séparation des molécules GCVACV

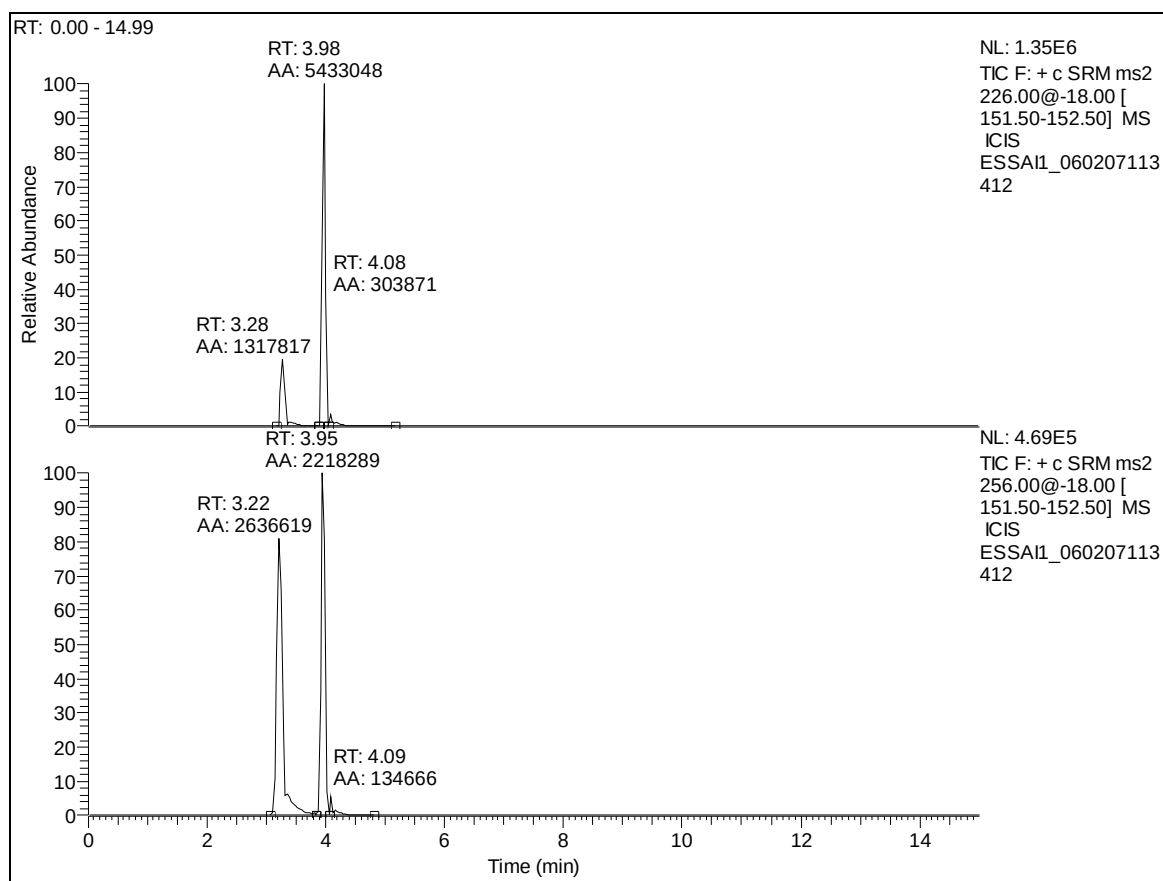


Figure 88 Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, en haut) et du ganciclovir (GCV, en bas) ; colonne X TERRA C18RP
Phase mobile : eau + acide formique 0,1% / acétonitrile + acide formique 0.1 % (90/10; v/v). Colonne X terra C18RP 2,1 X 250 mm (5um). Débit 200µL/min. Concentrations des composés : 50 ng/ml (GCV et ACV) dans l'eau.

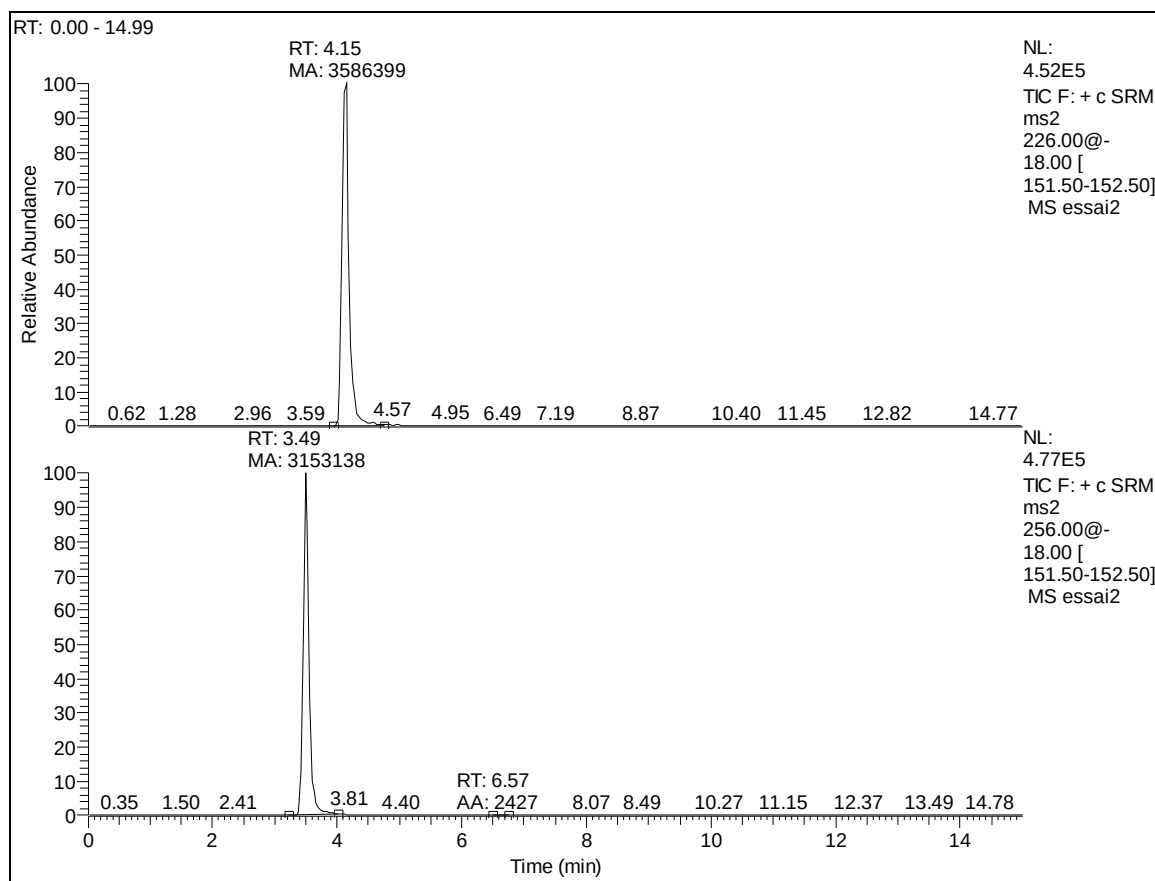


Figure 89 Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, en haut) et du ganciclovir (GCV, en bas) ; colonne Atlantis dC18

Phase mobile: eau + acide formique 0,1% / acétonitrile + acide formique 0.1 % (95/5; v/v). colonne Atlantis dC18 150 mm X 2,1 mm (3 μ m). Débit 200 μ L/min. Concentrations des composés : 50 ng/ml (GCV et ACV) dans l'eau.

Avec la colonne X TERRA, (figure 88), 2 pics distincts étaient observés pour GCV (Tr 3.22 et 3.95 min) et 2 pics distincts pour ACV (Tr 3.28 et 3.98 min). Les dilutions des produits ayant été réalisées exclusivement dans l'eau (des essais préliminaires avaient montré que la dilution dans l'eau améliorait la qualité des pics de chromatographie, données non montrées).

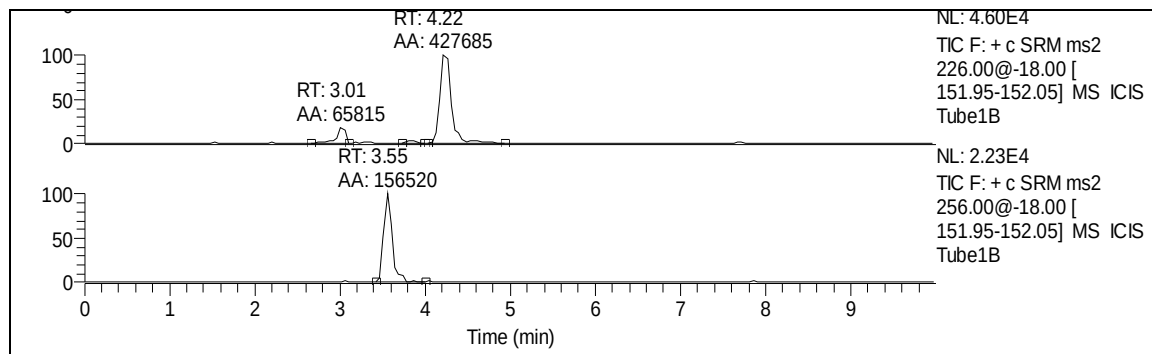
La colonne Atlantis a permis d'optimiser la séparation avec l'obtention d'un pic unique par molécule (figure 89). Les temps de rétention dans ces conditions chromatographiques étaient : 3.49 min pour ACV et 4.15 min pour GCV.

Il a été décidé suite à ces premiers résultats de retenir pour les essais suivants la colonne Atlantis.

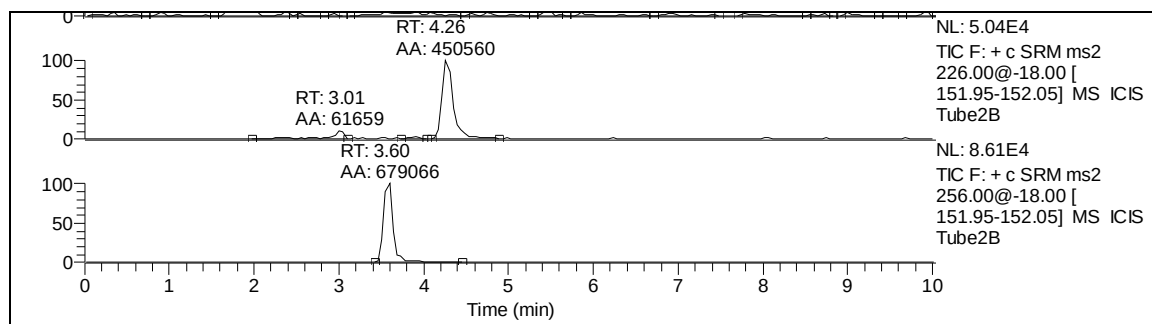
Le signal obtenu pour des cellules incubées avec 10 mg/L correspondait environ au signal de la solution pure à 50 ng/ml (données non montrées).

3.4.7.1.2. ESSAI 2 : Détection des dérivés phosphorylés par action de la phosphatase alcaline

(a)



(b)



(c)

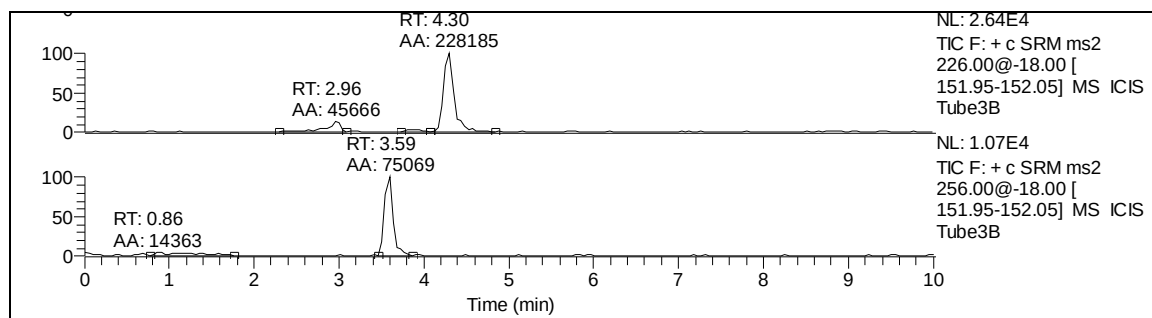


Figure 90 : Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, en haut) et du ganciclovir (GCV, en bas) – traitement des échantillons par la phosphatase alcaline.

Culot cellulaire (10×10^6 cel/mL) ayant subi différentes expositions au GCV : 1 mg/L (a), 10 mg/L (b), pas de GCV (c) et **après traitement par la phosphatase alcaline** ; 250 μ l de culot cellulaire à 10×10^6 cel/ml + 300 μ l d'acétonitrile (chargé avec 15 ng/ml d'ACV et GCV). Après centrifugation (10 min à +10°C à 10000 tours/min), évaporation sous azote ; colonne **Atlantis dC18**, 150 mm X 2.1 mm (3 μ m). Phase mobile: eau + acide formique 0.1% / acétonitrile + acide formique 0,1 % (95/5; v/v). Débit de 200 μ L/min.

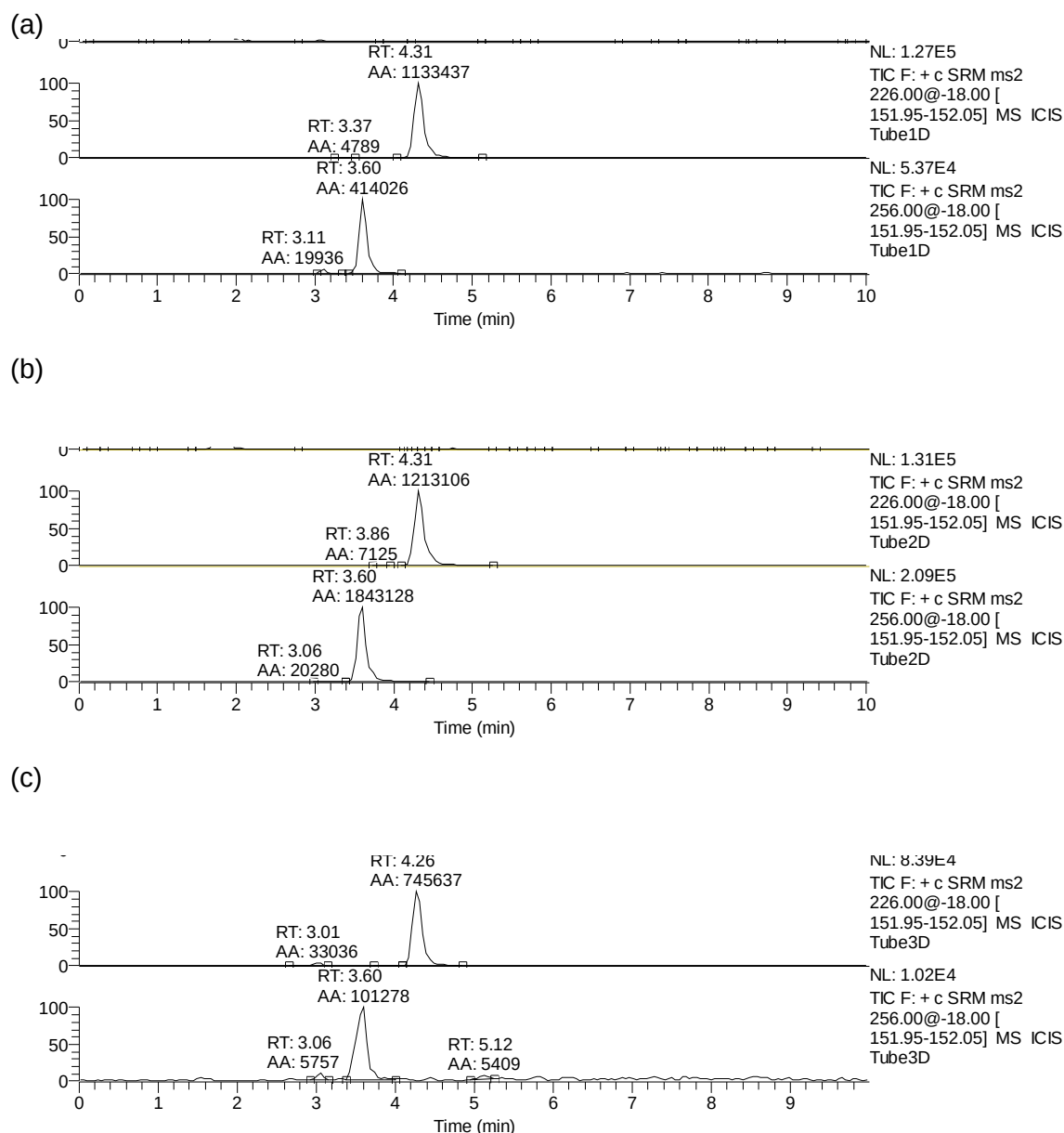


Figure 91 Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, en haut) et du ganciclovir (GCV, en bas) – échantillons non traités par la phosphatase alcaline.

Culot cellulaire (10×10^6 cel/mL) ayant subi différentes expositions au GCV : 1 mg/L (a), 10 mg/L (b), pas de GCV (c) et **sans traitement par la phosphatase alcaline** ; 250 μ l de culot cellulaire à 10×10^6 cel/ml + 300 μ l d'acétonitrile (chargé avec 15 ng/ml d'ACV et GCV). Après centrifugation (10 min à + 10°C à 10000 tours/min), évaporation sous azote ; colonne **Atlantis dC18**, 150 mm X 2,1 mm (3 μ m). Phase mobile: eau + acide formique 0.1% / acétonitrile + acide formique 0,1 % (95/5; v/v). Débit de 200 μ L/min.

Des différences d'intensité de signal n'ont pas pu être mises en évidence entre les cellules traitées et non traitées par la phosphatase alcaline (figures 90 et 91). Cependant, les cellules n'ayant pas été infectées par le CMV, la métabolisation attendue était faible et on pouvait s'attendre à des concentrations intracellulaires très basses en métabolites phosphorylés.

Pour des concentrations d'exposition au GCV de 10 mg/L, le signal intracellulaire pour GCV était multiplié par 4 par rapport à la concentration 1 mg/L (cf figures 90 (a) et 90 (b) ; 91 (a)

et 91 (b)). Ces résultats sont logiques car si on convient que plus la concentration extracellulaire en GCV augmente et plus la concentration intracellulaire augmente, il n'était pas attendu une proportionnalité entre les doses intra et extracellulaires (mécanismes de transport actifs avec saturation, mécanisme de transport passif avec équilibration du système etc...).

j

3.4.7.1.3. Influence de la température sur la répétabilité ESSAI 3

Les figures 92 à 94 montrent l'impact de la température d'évaporation de l'échantillon sur la répétabilité du signal (5 échantillons ont été préparés pour chaque température testée).

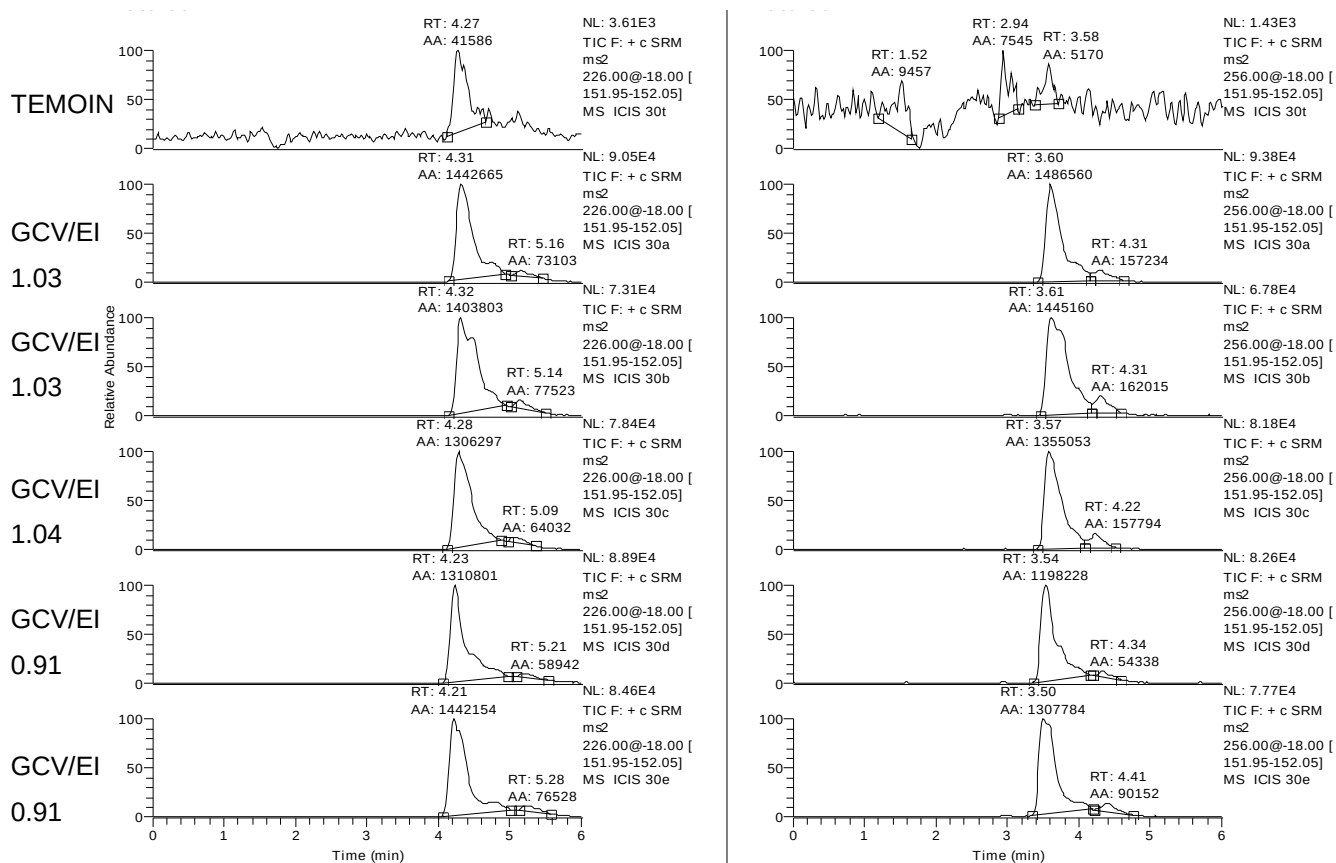


Figure 92 : Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, à gauche) et du ganciclovir (GCV, à droite) - Température d'évaporation de 30 °C.

250 µl de culot cellulaire à 10×10^6 cel/ml + 300 µl d'acétonitrile (chargé avec 15 ng/ml d'ACV et GCV). Après centrifugation (10 min à + 10°C à 10000 tours/min), évaporation sous azote. Reprise du résidu par 100 µl d'eau acidifiée (acide formique 0,1%) et injection de 10 µl ; colonne **Atlantis dC18**, 150 mm X 2,1 mm (3 µm). Phase mobile: eau + acide formique 0,1% / acétonitrile + acide formique 0,1 % (95/5; v/v). Débit de 200µL/min.

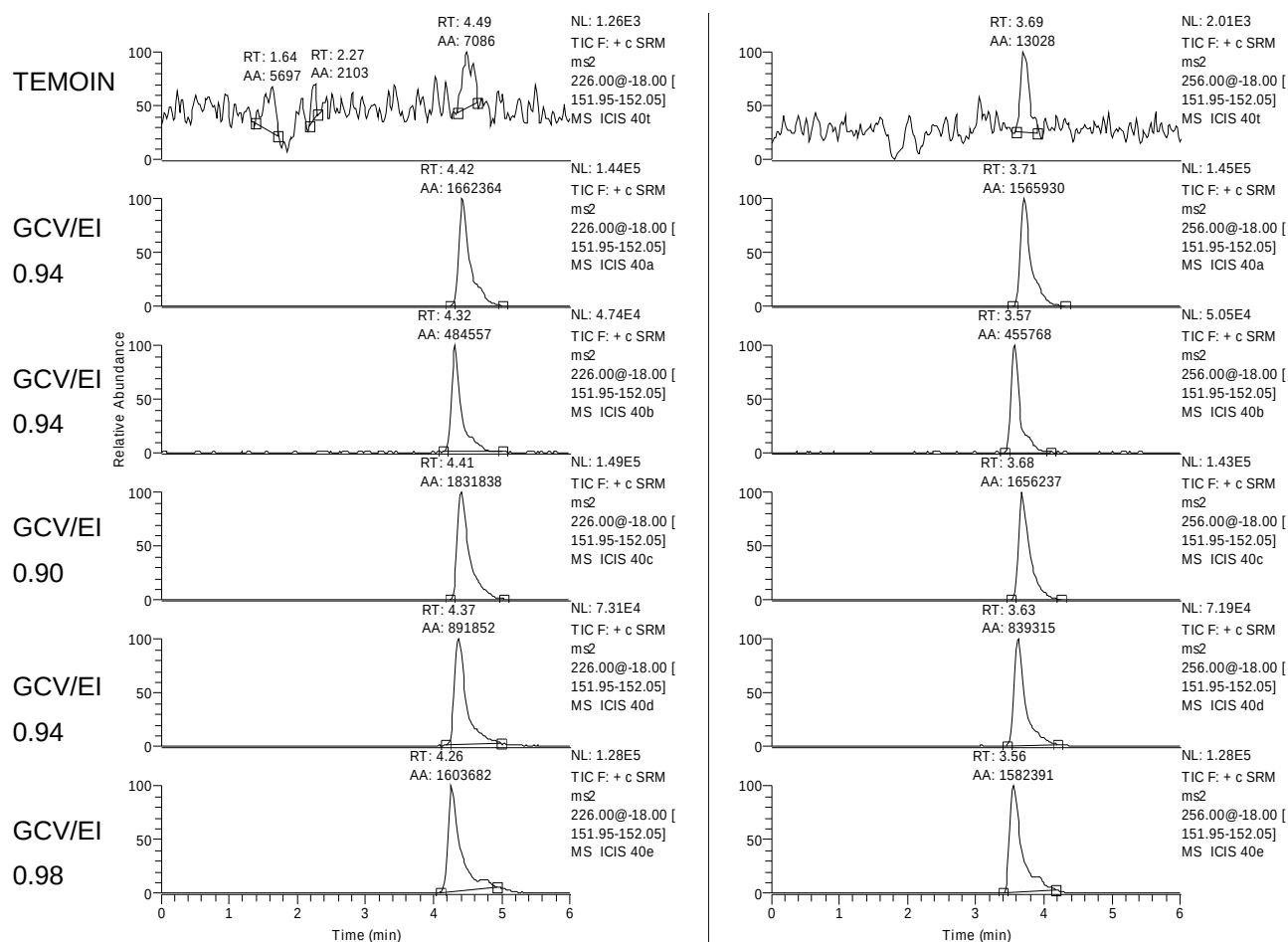


Figure 93 : Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, à gauche) et du ganciclovir (GCV, à droite) - Température d'évaporation de 40 °C.

250 µl de culot cellulaire à 10×10^6 cel/ml + 300 µl d'acétonitrile (chargé avec 15 ng/ml d'ACV et GCV). Après centrifugation (10 min à + 10°C à 10000 tours/min), évaporation sous azote. Reprise du résidu par 100 µl d'eau acidifiée (acide formique 0,1%) et injection de 10 µl ; colonne **Atlantis dC18**, 150 mm X 2,1 mm (3 µm). Phase mobile: eau + acide formique 0,1% / acétonitrile + acide formique 0,1 % (95/5; v/v). Débit de 200µL/min.

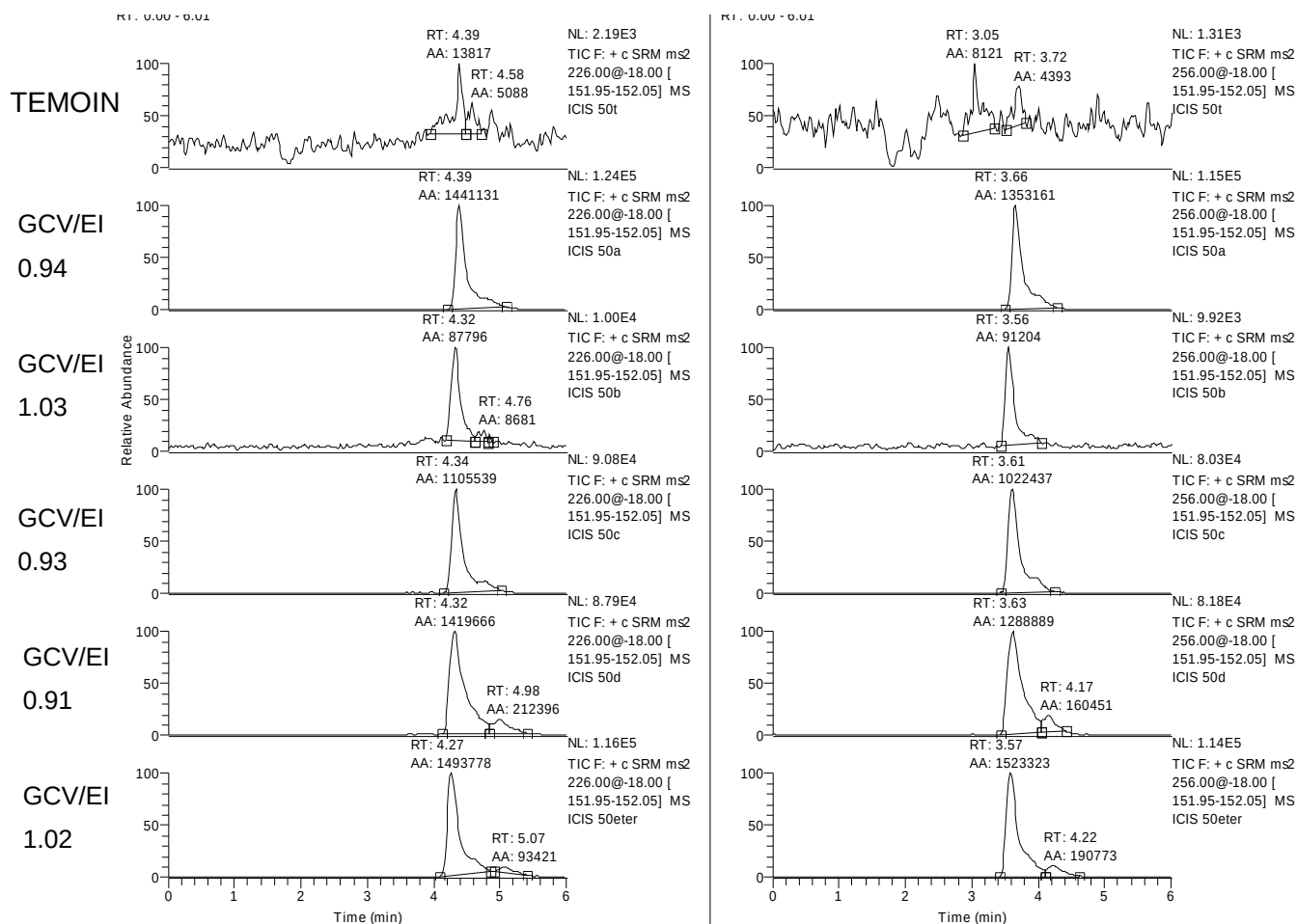


Figure 94 Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, à gauche) et du ganciclovir (GCV, à droite)
- Température d'évaporation de (50 °C).

250 µl de culot cellulaire à 10×10^6 cel/ml + 300 µl d'acétonitrile (chargé avec 15 ng/ml d'ACV et GCV). Après centrifugation (10 min à + 10°C à 10000 tours/min), évaporation sous azote. Reprise du résidu par 100 µl d'eau acidifiée (acide formique 0,1%) et injection de 10 µl ; colonne **Atlantis dC18**, 150 mm X 2,1 mm (3 µm). Phase mobile: eau + acide formique 0,1% / acétonitrile + acide formique 0,1 % (95/5; v/v). Débit de 200µL/min.

Conclusion : la température de 40°C a permis d'obtenir la meilleure répétabilité du signal, aussi c'est la température d'évaporation de l'échantillon qui a été retenue.

3.4.7.1.4. ESSAI 4 Influence de la colonne ATLANTIS Hilic sur la qualité de la séparation et la sensibilité et comparaison des résultats avec ceux obtenus avec la colonne ATLANTIS dC 18

Les figures 95 et 96 présentent les chromatogrammes de cellules non exposées et non traitées au GCV.

Une surcharge en ACV a été réalisée (figure 96 uniquement), de manière à évaluer son impact sur le signal du GCV.

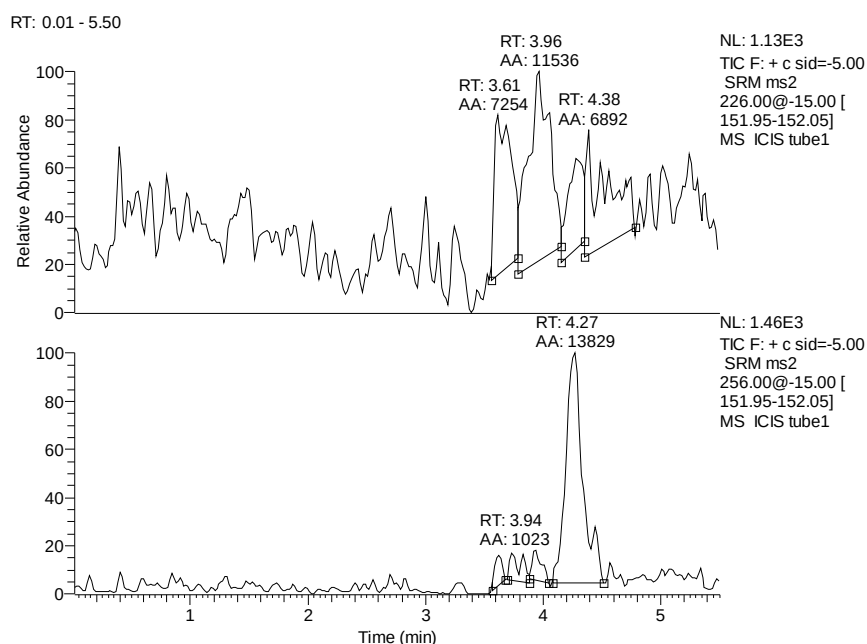


Figure 95 : Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, en haut) et du ganciclovir (GCV, en bas) - Colonne ATLANTIS HILIC (1).

100 µL de culot cellulaire à 10×10^6 cel/ml non exposé au GCV et non chargé en (GCV + ACV) + 300 µL d'acétonitrile. Après centrifugation (10 min à + 10°C à 10000 tours/min), évaporation sous azote, reprise par 400 µL (pas de concentration de l'échantillon) et injection de 5 µL du surnageant ; colonne **Atlantis HILIC** 100 mm x 2,1 mm (3 µm). Phase mobile: tampon acétate d'ammonium 100 mM pH5/eau/acétonitrile (12/8/80; v/v/v). Débit de 200 µL/min et élution isocratique.

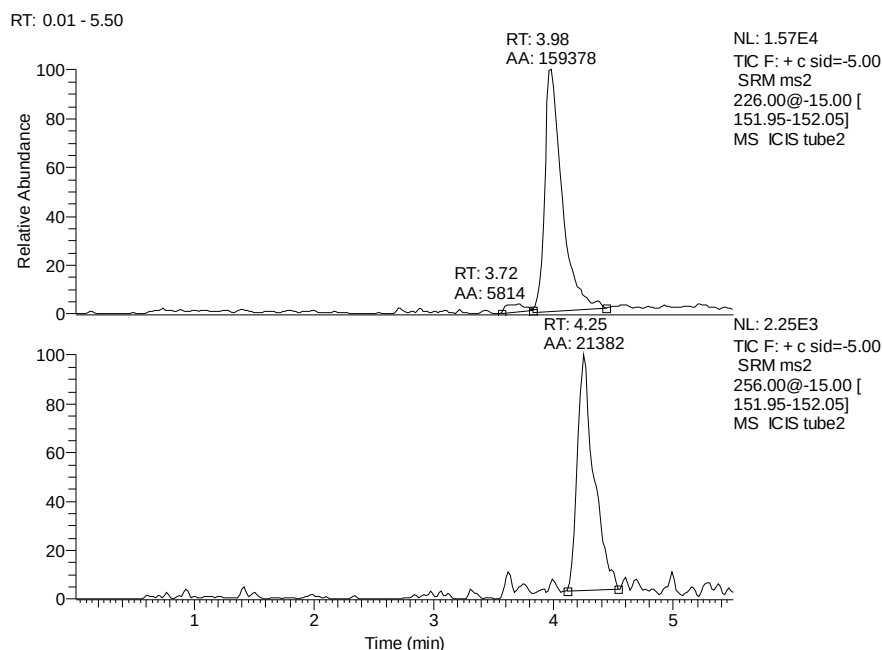


Figure 96 : Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, en haut) et du ganciclovir (GCV, en bas) - Colonne ATLANTIS HILIC (2).

100 μ L de culot cellulaire à 10×10^6 cel/ml non exposé au GCV et non chargé en GCV + 300 μ L d'acétonitrile chargé en ACV 2 ng/ml. Après centrifugation (10 min à + 10°C à 10000 tours/min), évaporation sous azote et reprise par 400 μ L (pas de concentration de l'échantillon) et injection de 5 μ L du surnageant ; colonne **Atlantis HILIC** 100 mm X 2,1 mm (3 μ m). Phase mobile: tampon acétate d'ammonium 100 mM pH5/eau/acétonitrile (12/8/80; v/v/v). Débit de 200 μ L/min et élution isocratique.

Les figures 98 et 99 ont permis de comparer le signal pour des cellules non exposées au GCV ayant été chargées par une solution de GCV seul (figure 98) versus des cellules non exposées au GCV et chargées par une solution de GCV + ACV (figure 99).

Les figures 97 et 99 ont permis d'évaluer l'impact de l'évaporation de l'échantillon (sans concentration) par rapport à une extraction liquide liquide simple. Les cellules non chargées étaient surchargées en GCV+ACV et le surnageant était évaporé après extraction (figure 99) ou directement injecté après extraction (figure 97)

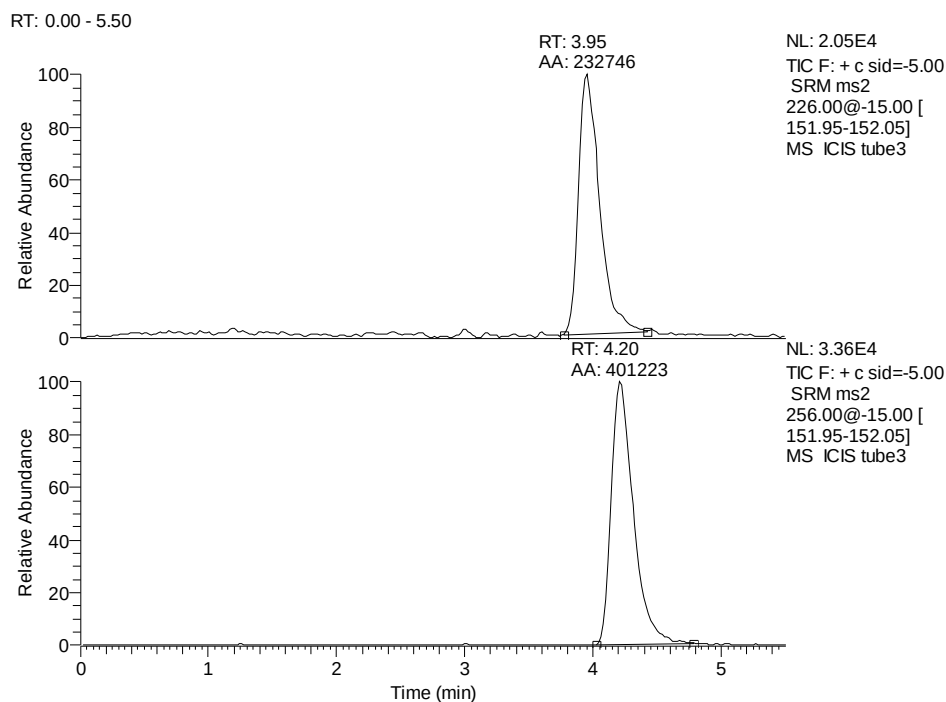


Figure 97 : Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, en haut) et du ganciclovir (GCV, en bas) - Colonne ATLANTIS HILIC (3).

100 μ L de culot cellulaire à 10×10^6 cel/ml non exposé au GCV + 300 μ L d'acétonitrile chargé en ACV 2 ng/ml et GCV 10 ng/ml. Après centrifugation (10 min à + 10°C à 10000 tours/min), injection de 5 μ L de surnageant (pas d'étape d'évaporation) ; colonne **Atlantis HILIC** 100 mm X 2,1 mm (3 μ m). Phase mobile: tampon acétate d'ammonium 100 mM pH5/eau/acétonitrile (12/8/80; v/v/v). Débit de 200 μ L/min et élution isocratique.

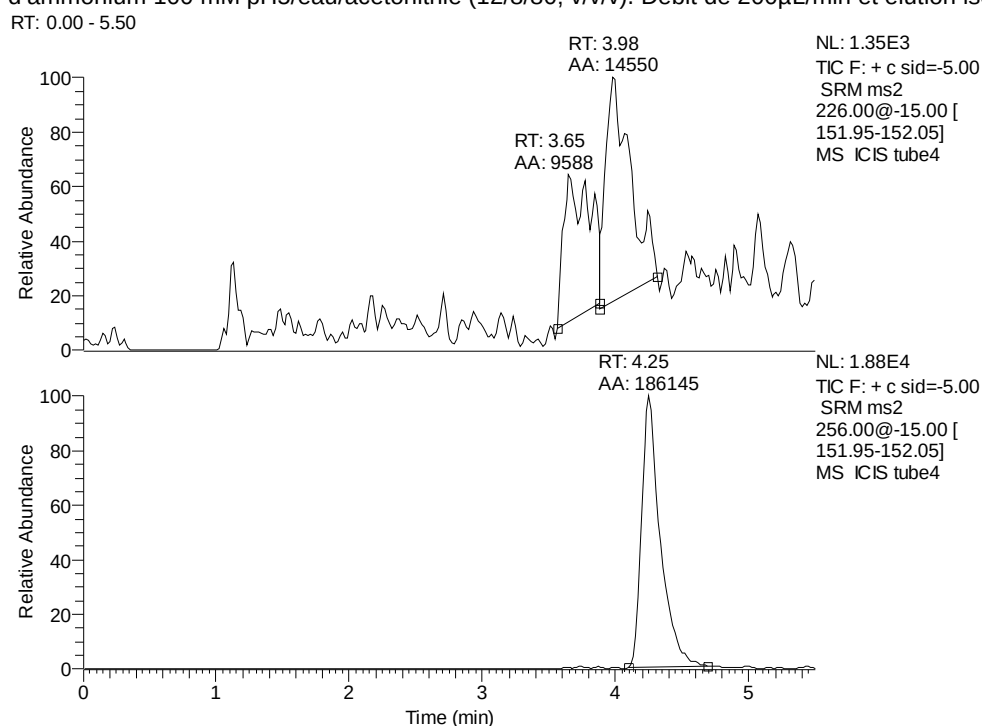


Figure 98 : Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, en haut) et du ganciclovir (GCV, en bas) - Colonne ATLANTIS HILIC (4).

100 μ L de culot cellulaire à 10×10^6 cel/ml non exposé au GCV + 300 μ L d'ACN chargé en GCV à 10 ng/ml (pas d'ACV). Après centrifugation (10 min à + 10°C à 10000 t ours/min), évaporation sous azote et reprise par 400 μ L (pas de concentration de l'échantillon) et injection de 5 μ L du surnageant ; colonne **Atlantis HILIC** 100 mm X 2.1 mm (3 μ m). Phase mobile: tampon acétate d'ammonium 100 mM pH5/eau/acétonitrile (12/8/80; v/v/v). Débit 200 μ L/min et élution isocratique.

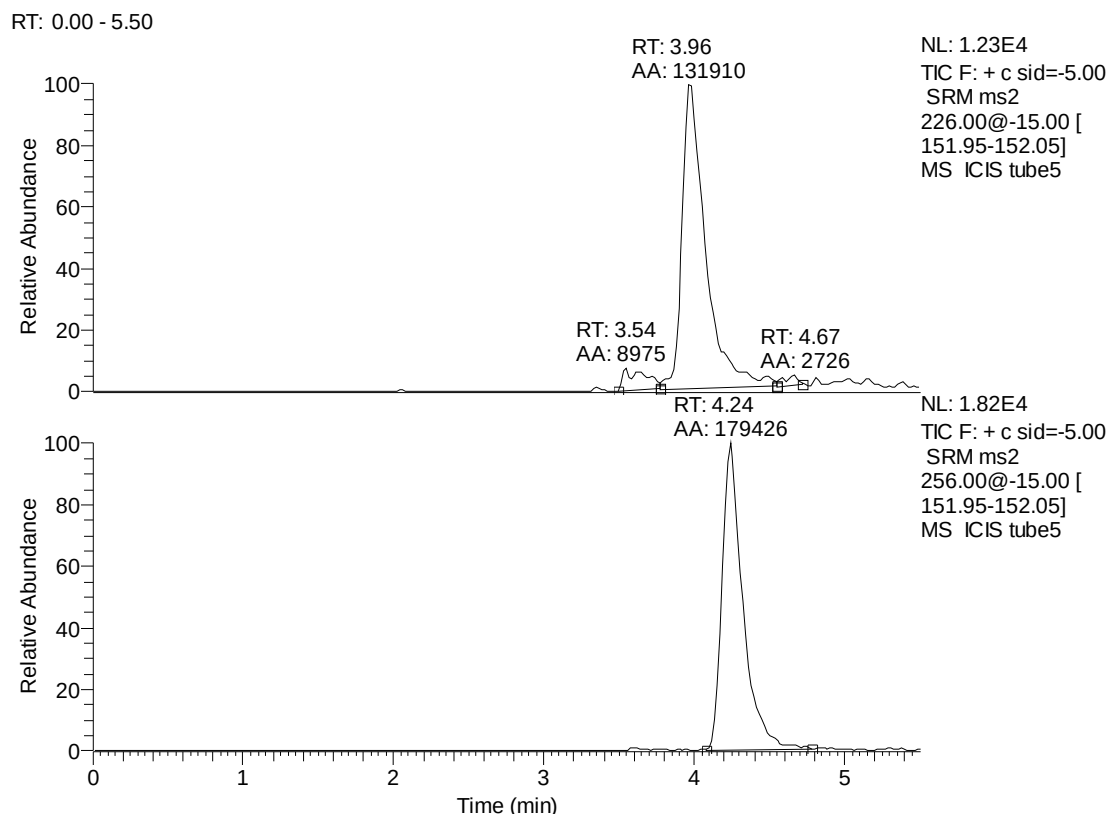


Figure 99 Chromatogrammes de l'aciclovir (ACV, en haut) et du ganciclovir (GCV, en bas) - Colonne ATLANTIS HILIC (5).

100 μ L de culot cellulaire à 10×10^6 cel/ml non exposé au GCV et non chargé en GCV + 300 μ L d'acétonitrile chargé en GCV à 10 ng/ml et ACV 2 ng/ml. Après centrifugation (10 min à + 10°C à 10000 tours/min), évaporation sous azote et reprise par 400 μ L (pas de concentration de l'échantillon) et injection de 5 μ L du surnageant ; colonne **Atlantis HILIC** 100 mm X 2,1 mm (3 μ m). Phase mobile: tampon acétate d'ammonium 100 mM pH5/eau/acétonitrile (12/8/80; v/v/v). Débit de 200 μ L/min et élution isocratique.

Le signal n'a pas été amélioré par l'évaporation de l'échantillon (figure 99 versus figure 97), donc il n'est pas nécessaire (la colonne Hilic présente l'avantage de pouvoir passer des phases mobiles organiques contenant des proportions importantes d'ACN).

L'influence de l'ACV sur l'interférence au temps de rétention et à la transition de détection du GCV n'a pas été nettement mise en évidence : en effet, comme montré dans la figure 95, il existe dès le premier échantillon passé non chargé en ACV et GCV un signal pour ACV et GCV qui doit correspondre à une partie non décrochée de séparations précédentes. La comparaison du signal du GCV sur cellules non chargées avec ACV versus des cellules chargées à 2 ng/ml ne montre pas de différence importante (figures 95 et 96 ; figures 98 et 99).

Le tableau LIII rassemble les résultats obtenus avec la colonne HILIC (ESSAI 4) et la colonne ATLANTIS Dc18 (ESSAIS 2 ET 3).

Tableau LII : Comparaison des résultats obtenus avec la colonne ATLANTIS versus ATLANTIS HILIC.

ACV=aciclovir, GCV=ganciclovir, Tr=temps de rétention.

	COLONNE ATLANTIS	COLONNE HILIC
Sensibilité du signal d'une solution pure de GCV et ACV à 50 ng/ml (surface du pic)	GCV : 3 153 138 ACV : 3 586 399	GCV : 4 524 854 ACV : 6 208 717 *
Temps de rétention (min)	GCV : 4,15 ACV : 3,15 **	GCV : 4,29 ACV : 4,05
Pics interférents (sur extrait cellulaire)	Présence d'un pic au Tr du GCV alors que les cellules ne sont pas chargées Présence d'un pic au Tr de l'ACV (cellules non exposées et non chargées) ***	Présence d'un pic au Tr du GCV alors que les cellules ne sont pas chargées Présence d'un pic au Tr de l'ACV (cellules non exposées et non chargées) ***

* meilleure sensibilité pour la colonne Atlantis Hilic

** meilleure sélectivité (séparation) pour la colonne Atlantis

*** pics interférents

D'après la comparaison des résultats entre la colonne Atlantis Hilic et la colonne Atlantis dC18, elles présentent chacune des avantages et des inconvénients. La colonne Atlantis permet une meilleure séparation des composés (Tr de 3,15 min pour ACV et 4,15 min pour GCV) que la colonne Atlantis Hilic (Tr de 4,05 min pour ACV et 4,29 min pour GCV). Cependant, les molécules étant détectées par spectrométrie de masse, la séparation n'est pas un critère majeur pour le choix d'un système par rapport à un autre.

La sensibilité est améliorée avec la colonne Atlantis Hilic (le signal est augmenté d'un facteur 1,4 pour GCV et 1,7 pour ACV).

Par contre, le problème de l'interférence n'est pas solutionné par la colonne Atlantis HILIC.

3.4.7.1.5. Conclusions sur les essais par méthode indirecte

Les principales difficultés rencontrées avec la méthode indirecte ont été les interférences au Tr du GCV ; qui risquent de limiter la sensibilité de la méthode.

Plus globalement, la méthode ne peut permettre que d'évaluer le pool de nucléotides du GCV sans quantification du GCVTP possible (pas de discrimination entre les différentes formes phosphorylées).

Enfin, la méthode ne présente pas de caractère innovant (des méthodes en dosage indirect ayant déjà été publiées).

3.4.7.2. Méthode de détection directe

3.4.7.2.1. ESSAI 1

Les résultats sur cellules montrent une détection des nucléotides endogènes mais en proportion faible par rapport au signal retrouvé sur d'autres types cellulaires (signal divisé par 10 en moyenne). Les culots cellulaires congelés datant de + de 6 mois ; il a été décidé de produire de nouveaux culots cellulaires et de renouveler les essais.

3.4.7.2.2. ESSAIS 2 et 3

Les chromatogrammes des éluats des culots cellulaires sont présentés sur les figures 100 à 103. Ils montrent la présence de pics aux transitions retenues pour GCVMP, GCVDP et GCVTP pour les cellules infectées par le CMV (MOI= 0.1 c'est-à-dire une infection avec un rapport virus/cellule de 0.1) et incubées pendant 24 heures au GCV 10 mg/L. Aucun pic n'a été retrouvé aux transitions du GCVMP, GCVDP, et GCVTP pour les cellules non exposées au GCV.

Les nucléotides endogènes (ATP, dGTP et GTP) ont été retrouvés à la fois sur les cellules exposées et non exposées au GCV.

Un signal à la transition du GCV est retrouvé pour l'ensemble des échantillons, chargés ou non en GCV.

Le tableau LIV rassemble les résultats après 24 heures d'exposition et le tableau LV les résultats après 48 heures d'exposition au GCV. Dans ces tableaux sont rapportés les surfaces de pics et temps de rétention pour les différents composés analysés (GCVMP, GCVDP et GCVTP) dans les éluats et dans les lavages de la SPE.

Si les nucléotides phosphorylés du GCV ont été détectés uniquement sur les échantillons cellulaires exposés au GCV, ils ont été retrouvés par contre à la fois sur les culots cellulaires infectés et non infectés par le CMV et dans des proportions non négligeables. Biron *et al.* (1986) avaient montré que pendant les premières 48 heures après exposition au GCV les cellules MRC5 infectées comme les non infectées étaient capables de phosphoryler le GCV ; par contre ils montraient une diminution franche après 48 heures dans les cellules non infectées).

Le signal des dérivés phosphorylés du GCV était plus important lorsque l'exposition au GCV était plus forte (10 mg/L versus 1 mg/L).

Globalement les surfaces de pics de l'essai « exposition 48 heures » étaient moins intenses que pour l'essai « exposition 24 heures » ; les 2 essais ayant été réalisés sur 2 jours différents.

Les pertes dans le lavage étaient négligeables pour la forme triphosphorylée du GCV. L'ATP, le GTP et l'EI étaient également retrouvés dans des proportions négligeables par rapport à l'éluat (données non montrées).

Par contre la forme GCVMP et dans une moindre proportion GCVDP étaient retrouvées dans le lavage ; il conviendrait donc de modifier la composition du lavage de manière à ne pas « décrocher » ces composés de la phase stationnaire de la colonne de SPE.

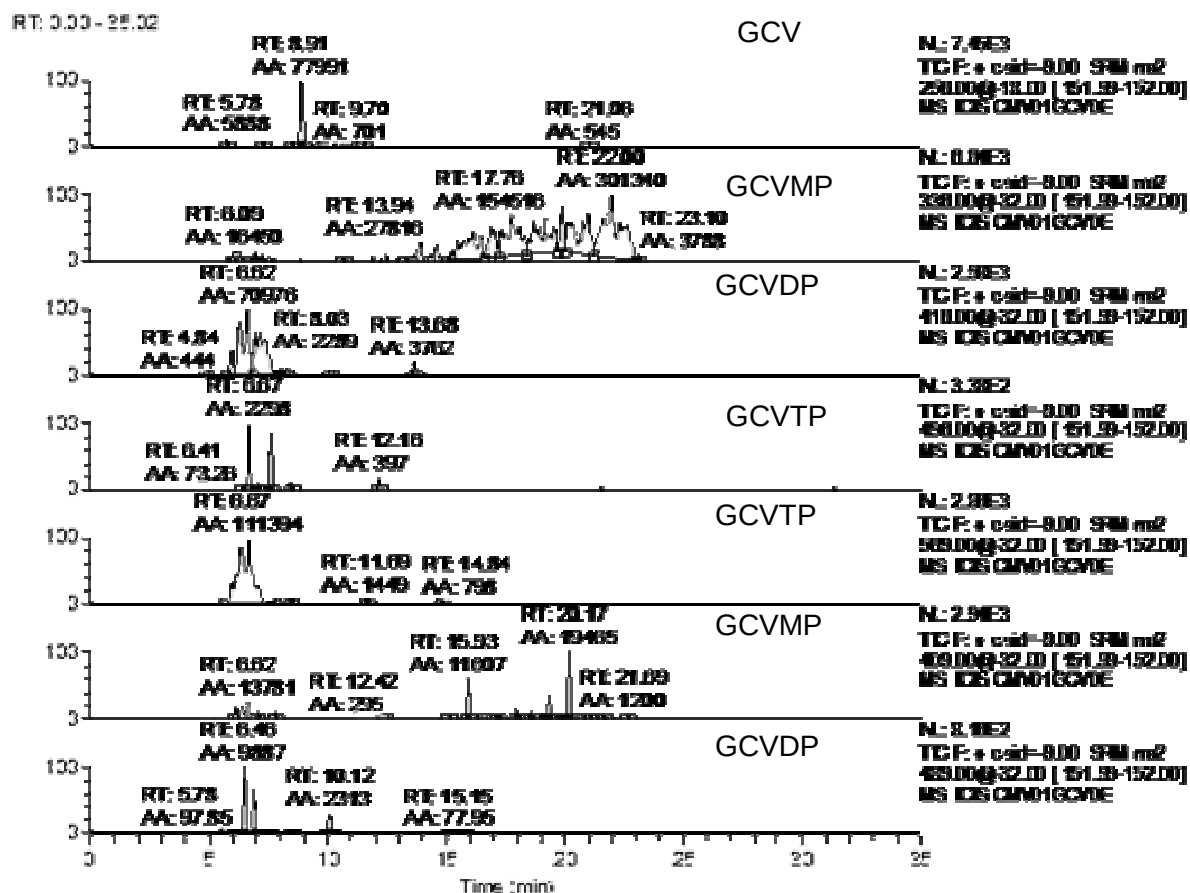


Figure 100 : Chromatogrammes de GCV, GCVMP, GCVDP, GCVTP – cellules infectées par le CMV (MOI = 0.1) et non exposées au GCV.

Extraction de 5×10^6 cellules sur colonne OASIS HLB WAX, éluats évaporés sous azote et reprise du résidu par 100 μ L de phase mobile (solution A). Injection de 10 μ L ; séparation sur **colonne Hypercarb** 150 mm X 2,1 mm (3 μ m). Phase mobile: Solution A : diéthylamine (DEA) + hexylamine pH 10 dans eau (le pH est ajusté avec de l'acide acétique) ; Solution B : eau (50%)/acétonitrile (50%). Débit de 250 μ L/min et gradient d'élution. Détection SM (ESI) en mode positif.

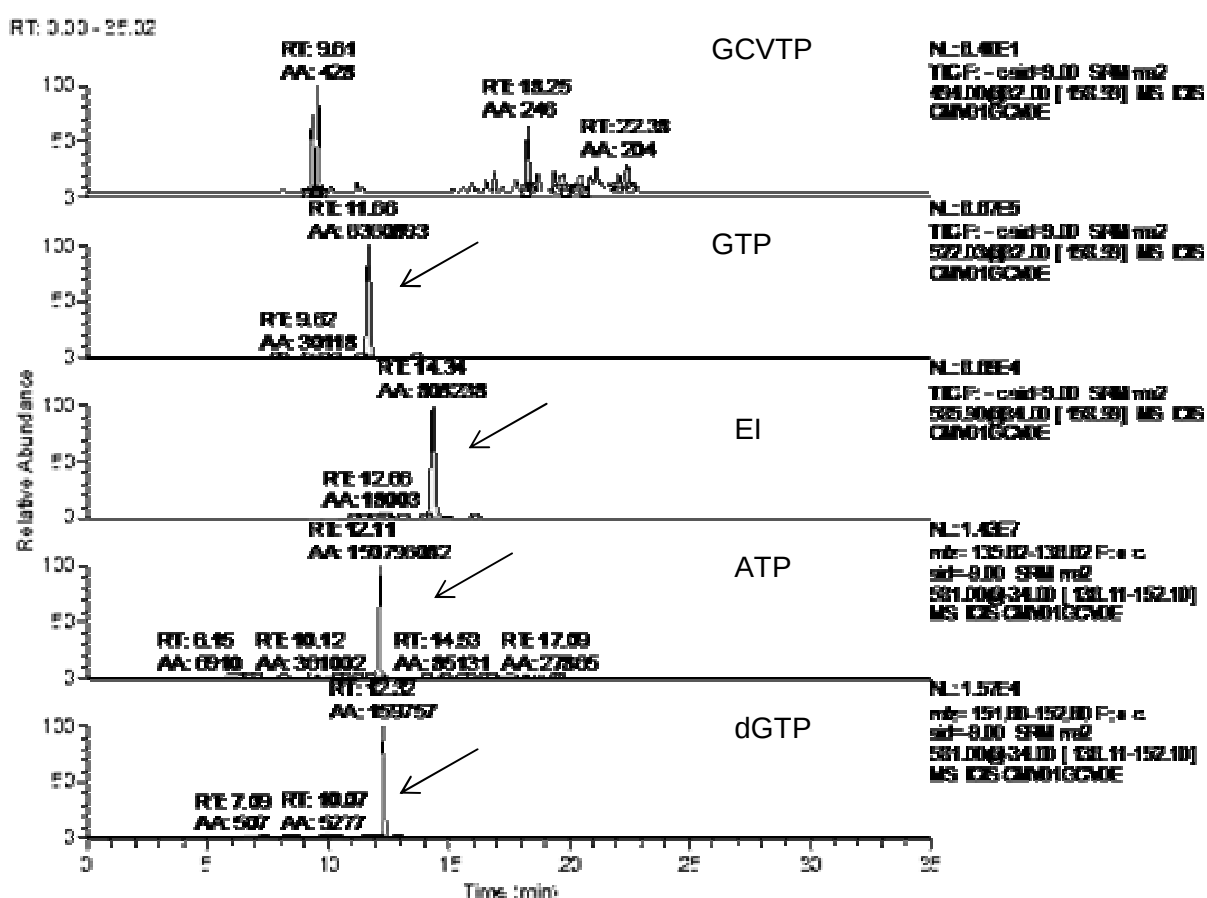


Figure 101 : Chromatogrammes de GCVTP, GTP, BrATP, ATP, dGTP – cellules infectées par le CMV (MOI = 0.1) et non exposées au GCV.

Extraction de 5×10^6 cellules sur colonne OASIS HLB WAX, éluats évaporés sous azote et reprise du résidu par 100 μ L de phase mobile (solution A). Injection de 10 μ L ; séparation sur **colonne Hypercarb** 150 mm X 2,1 mm (3 μ m). Phase mobile: Solution A : diéthylamine (DEA) + hexylamine pH 10 dans eau (le pH est ajusté avec de l'acide acétique) ; Solution B : eau (50%)/acétonitrile (50%). Débit 250 μ L/min et gradient d'élution.

Détection SM (ESI) en mode positif pour ATP et dGTP et en mode négatif pour GCVTP, BrATP et GTP.

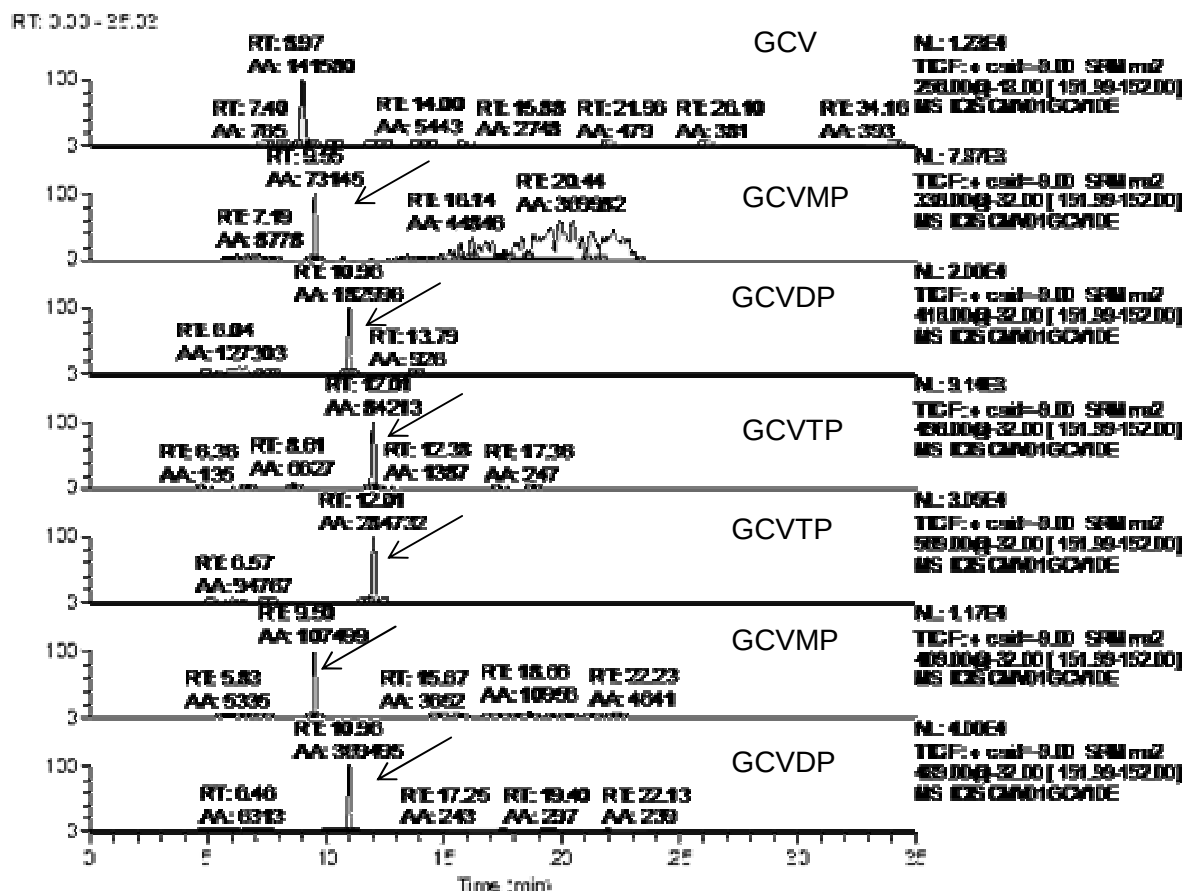


Figure 102 : Chromatogrammes de GCV, GCVMP, GCVDP, GCVTP – cellules infectées par le CMV (MOI = 0.1) et exposées pendant 24 heures au GCV 10 mg/L.

Extraction de 5×10^6 cellules sur colonne OASIS HLB WAX, éluats évaporés sous azote et reprise du résidu par 100 μ L de phase mobile (solution A). Injection de 10 μ L ; séparation sur **colonne Hypercarb** 150 mm X 2,1 mm (3 μ m). Phase mobile: Solution A : diéthylamine (DEA) + hexylamine pH 10 dans eau (le pH est ajusté avec de l'acide acétique) ; Solution B : eau (50%)/acétonitrile (50%). Débit 250 μ L/min et gradient d'élution. Détection SM (ESI) en mode positif.

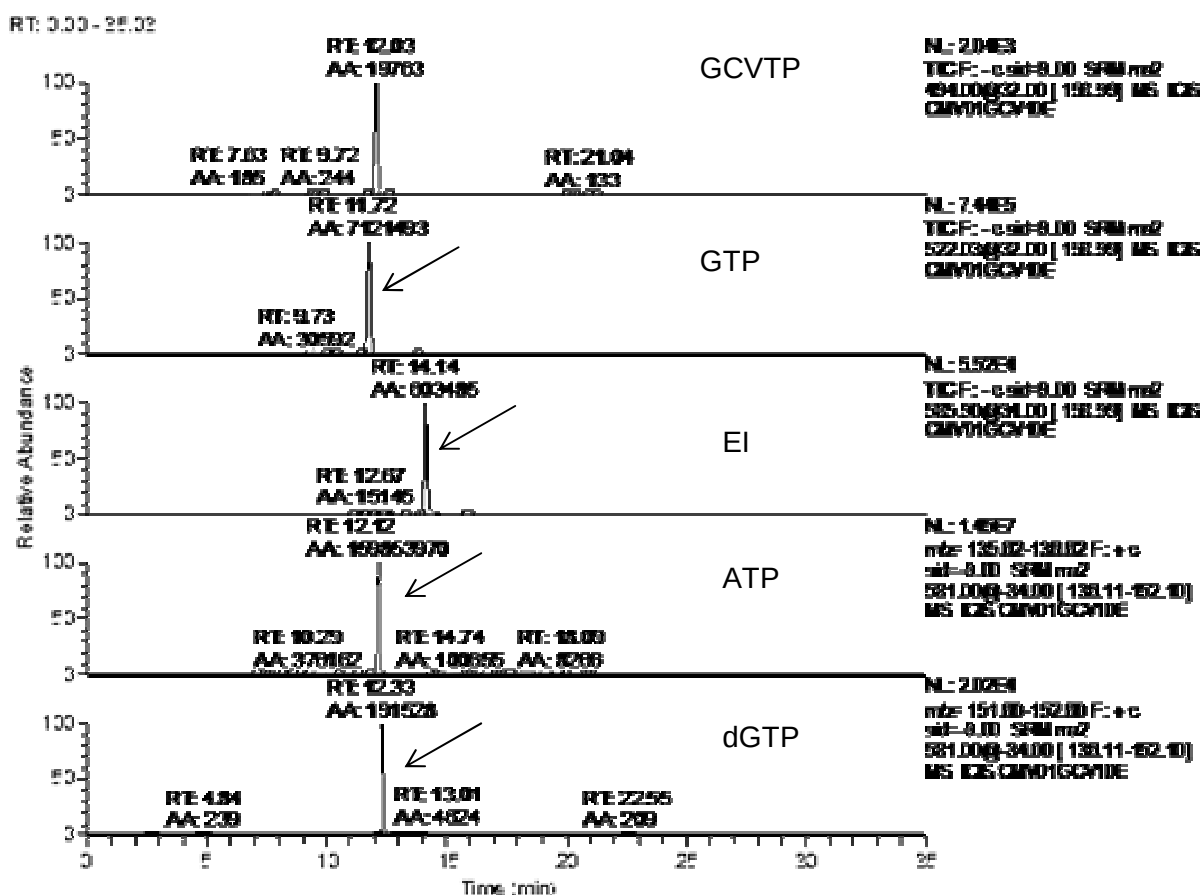


Figure 103 : Chromatogrammes de GCVTP, GTP, BrATP, ATP, dGTP – cellules infectées par le CMV (MOI = 0.1) et exposées pendant 24 heures au GCV 10 mg/L.

Extraction de 5×10^6 cellules sur colonne OASIS HLB WAX, éluats évaporés sous azote et reprise du résidu par 100 μ L de phase mobile (solution A). Injection de 10 μ L ; séparation sur **colonne Hypercarb** 150 mm X 2,1 mm (3 μ m). Phase mobile: Solution A : diéthylamine (DEA) + hexylamine pH 10 dans eau (le pH est ajusté avec de l'acide acétique) ; Solution B : eau (50%)/acétonitrile (50%). Débit de 250 μ L/min et gradient d'élution. Détection SM (ESI) en mode positif pour ATP et dGTP et en mode négatif pour GCVTP, BrATP et GTP.

Tableau LIII : Surface des pics chromatographiques et temps de rétention du GCVMP, GCVDP et GCVTP dans les lavages et les éluats de la SPE – traitement des cellules pendant 24 heures.

GCV=ganciclovir, GCVMP=ganciclovir monophosphate, GCVDP=ganciclovir diphosphate, GCVTP=ganciclovir triphosphate, CMV0= cellules non infectées, CMV0,1=cellules infectées par le CMV à 0,1 MOI, CMV0,01=cellules infectées par le CMV à 0,01 MOI, GCV0= pas de GCV, GCV1=exposition à 1 mg/L, GCV10=exposition à 10mg/L.

Exposition 24 heures	GCVMP ELUAT	GCVMP LAVAGE	GCVDP ELUAT	GCVDP LAVAGE	GCVTP ELUAT	GCVTP LAVAGE
CMV0GCV0	-	-	-	-	-	-
CMV0GCV1	-	-	46179 10,55	1291 11,22	51531 11,87	-
CMV0GCV10	66677 9,43	-	300383 10,64	3433 11,23	339207 11,89	-
CMV0.1GCV0	-	-	-	-	-	-
CMV0.1GCV1	-	-	79476 10,85	-	19143 11,95	-
CMV0.1GCV10	107499 9,50	-	182966 10,96	-	284732 12,01	-
CMV0.01GCV0	-	-	-	-	-	-
CMV0.01GCV1	-	5579 9,96	16226 11,07	-	65634 12,11	-
CMV0.01GCV10	35910 9,70	50251 9,86	166847 11,07	-	316066 12,11	-

Le décalage dans les temps de rétention peut s'expliquer par l'ordre de passage des échantillons (Tr augmente dans le temps)

Tableau LIV : Surface des pics chromatographiques et temps de rétention du GCVMP, GCVDP et GCVTP dans les lavages et les éluats de la SPE – traitement des cellules pendant 48 heures.

GCV=ganciclovir, GCVMP=ganciclovir monophosphate, GCVDP=ganciclovir diphosphate, GCVTP=ganciclovir triphosphate, CMV0= cellules non infectées, CMV0,1=cellules infectées par le CMV à 0,1 MOI, CMV0,01=cellules infectées par le CMV à 0,01 MOI, GCV0= pas de GCV, GCV1=exposition à 1 mg/L, GCV10=exposition à 10mg/L.

Exposition 48 heures	GCVMP ELUAT	GCVMP LAVAGE	GCVDP ELUAT	GCVDP LAVAGE	GCVTP ELUAT	GCVTP LAVAGE
CMV0GCV0	-	-	-	-	-	-
CMV0GCV1	24816 8,14	-	24476 9,82	-	-	-
CMV0GCV10	219638 8,24	133579 8,81	103223 9,97	-	-	-
CMV0.1GCV0	-	-	-	-	-	-
CMV0.1GCV1	28444 8,45	3396 8,81	12683 10,23	-	-	-
CMV0.1GCV10	122463 8,5	107659 8,76	150357 10,28	-	12347 11,64	-
CMV0.01GCV0	-	-	-	-	-	-
CMV0.01GCV1	53333 8,44	-	19747 10,33	-	-	-
CMV0.01GCV10	236446 8,56	95517 8,96	151522 10,34	-	2357 11,75	-

Le décalage dans les temps de rétention peut s'expliquer par l'ordre de passage des échantillons (Tr augmente dans le temps). Le décalage des Tr entre l'exposition 24 heures et 48 heures au GCV est expliqué par l'analyse à 2 jours différents.

3.4.7.2.3. ESSAI 4 : Détection des nucléotides marqués, nucléotides endogènes non marqués et GCV sur des culots cellulaires (non exposés au GCV) chargés.

- Optimisation étape de lavage pour ne pas éluer dans cette phase les nucléotides marqués monophosphorylés GMP* et dGMP* et BrGMP (étalon interne)

Les résultats des surfaces des pics et Tr dans les lavages et éluats en fonction du % méthanolique sont présentés sur les tableaux LVI et LVII.

Contrairement aux standards marqués triphosphorylés dGTP* et GTP*, une perte au lavage d'une quantité non négligeable de MP a été mise en évidence.

Les résultats obtenus pour GMP* sont encourageants : on le retrouve dans des proportions non négligeables dans le lavage (1/2 à 1/4 du signal retrouvé dans l'éluat) en lien avec la concentration en méthanol de la solution de lavage. On retrouve moins de perte avec le lavage à 50 % en méthanol (Eluat/Lavage = 4.4) qu'avec le lavage à 20% en méthanol (Eluat/Lavage = 2.4) (tableau LVIII).

La comparaison signal dans le lavage/signal dans la phase mobile (injectée juste avant) montre des surfaces de pics x 67 à 106 pour GMP* (tableau LIX) ; au contraire le signal de l'ATP est le même dans la phase mobile et dans le lavage de la SPE

Les rapports Eluat/phase mobile (tableau LX) sont plus importants (x 342 à 484) que lavage/phase mobile, même s'ils restent moins importants que pour l'ATP (x 682 à 819).

L'hypothèse testée que la diminution du pourcentage en méthanol entraînerait moins de perte au lavage n'est pas confirmée. Il reste à tester l'influence d'une modification du pH, l'ionisation des groupements pipéraziniques de la phase stationnaire de la cartouche étant sensibles aux variations de pH. Une acidification plus importante de la solution de lavage permettrait peut-être une ionisation plus forte de la phase stationnaire et donc une interaction améliorée entre la phase stationnaire et les nucléotides monophosphate.

- Calcul du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction (tableau LXI) est correct pour le GMP*, GTP*, dGTP*, BrGMP et BrATP. Il est amélioré lors du lavage au méthanol 50 % par rapport aux autres lavages testés (car moins de perte au lavage)

- Calcul des pertes en nucléotides au dépôt sur la cartouche SPE

Les pertes au dépôt sont minimales pour le GMP* (tableau LXII) avec des surfaces de pics inférieures à celles trouvées dans la phase mobile (injectées juste avant)

En ce qui concerne le dGMP*, les résultats (rendement d'extraction, perte au dépôt et perte dans lavage) sont difficilement interprétables avec la présence d'un signal sur tous les échantillons passés y compris les phases mobiles. Il peut s'agir d'un problème de contamination de la colonne et/ou du détecteur ; les essais devront être répétés pour identifier le problème.

Tableau LV : Signal retrouvé dans la fraction de lavage en fonction du % de méthanol.

		GMP*	dGMP*	GTP*	dGTP*	BrGMP	Br ATP	ATP	dGTP	GTP
Phase mobile		166783	1615471	-	-				-	-
		16,54	27,78							
Lavage	MeOH	15739185	1919849	-	-	-	-	90555	-	-
20%		17,68	27,36					43,86		
Lavage	MeOH	17763029	2025451	-	-	-	-	82437	-	-
30%		17,71	27,64					43,9		
Lavage	MeOH	13120945	1941225	-	-	-	-	93437	-	-
40%		17,08	27,71					43,89		
Lavage	MeOH	11192444	1868682	-	-			48157		
50%		16,58	27,64					43,86		

Tableau LVI : Signal retrouvé dans l'éluat en fonction du % de méthanol.

		GMP*	dGMP*	GTP*	dGTP*	BrGMP	Br ATP	ATP	dGTP	GTP
Phase mobile		102211	1665507	-	-			50852	-	-
		16,54	27,89					43,83		
Lavage	MeOH	37268255	3017182	2061946	6311892	135174	674797	34673142	31102	794489
20%		17,22	28,78	42,27	43,9	40,48	47,93	44,09	43,87	42,27
Lavage	MeOH	35003209	2962582	2008089	653458	130503	679554	38218053	22033	856473
30%		17,04	28,82	42,27	43,84	40,2	47,9	44,06	43,87	42,24
Lavage	MeOH	45831417	3160150	1927968	575016	163445	609023	35882756	19909	829210
40%		16,79	28,46	42,14	43,77	40,01	47,87	43,96	43,77	42,11
Lavage	MeOH	49510033	3581807	2489303	607234	135259	768245	41633906	39065	1142706
50%		16,61	27,82	41,89	43,62	39,25	47,71	43,84	43,61	41,89

Tableau LVII : Rapport des surfaces de pics Eluat /Lavage.

		GMP*	dGMP*	ATP
Lavage	MeOH	2,4	1,6	383
20%				
Lavage	MeOH	2,0	1,5	463
30%				
Lavage	MeOH	3,5	1,6	384
40%				
Lavage	MeOH	4,4	1,9	865
50%				

Tableau LVIII : Rapports des surfaces de pics Lavage /Phase mobile.

		GMP*	dGMP*	ATP
Phase mobile		166783	1615471	66240
		16,54	27,78	43,64
Lavage	MeOH	94	1,18	1,36
20%				
Lavage	MeOH	106	1,25	1,24
30%				
Lavage	MeOH	78	1,20	1,41
40%				
Lavage	MeOH	67	0,97	
50%				

Tableau LIX : Rapports des surfaces de pics Eluat/Phase mobile.

		GMP*	dGMP*	ATP
Phase mobile		102211	1665507	50852
		16,54	27,89	43,83
Lavage	MeOH	364,7	1,8	682,2
20%				
Lavage	MeOH	342,5	1,8	751,6
30%				
Lavage	MeOH	448,4	1,9	705,6
40%				
Lavage	MeOH	484,4	2,2	818,7
50%				

Tableau LX : Calcul du rendement d'extraction de l'éluat pour 2 % méthanoliques dans la fraction de lavage.

Rendement (%°		GMP*	dGMP*	GTP*	dGTP*	BrGMP	Br ATP
Lavage	MeOH	65%	88%	58%	58%	85%	85%
20%							
Lavage	MeOH	90%	75%	66%	76%	82%	85%
50%							

Tableau LXI : Surfaces des pics des dépôts méthanoliques surchargés pour évaluer les pertes au dépôt.

	GMP*	dGMP*
Phase mobile	93309	1634069
	16,26	26,97
Dépôt 1	75934	1352685
	16,18	26,68
Dépôt 2	27058	1532995
	16,11	27,00

- Choix de l'extraction SPE

Elle permet de laver et de purifier l'échantillon. Les molécules intracellulaires interférentes sont éluées dans le lavage. Puis les molécules d'intérêt, retenues sur la colonne pendant l'étape de lavage sont éluées.

Cette étape est apparue nécessaire pour permettre la détection des nucléotides (endogènes et dérivés phosphorylés du GCV). Elle permet d'éliminer la matrice de l'échantillon afin de limiter les effets « matrice » observés lors du dosage HPLC-ESI-SM/SM.

Le pH acide du lavage ne décroche pas de la phase stationnaire les nucléotides qui se trouvent alors sous forme ionisée et restent accrochés aux groupements ionisés de la phase stationnaire. Le caractère basique de la solution d'élution permet de décrocher les nucléotides de la phase stationnaire (car groupements de la phase stationnaire non ionisés à pH basique)

Le lavage avec une proportion de méthanol à 50% ne décroche pas les molécules fortement ionisées, en particulier les nucléotides triphosphates ; par contre les nucléotides mono et diphosphates sont en partie décrochés.

- Intérêt de la colonne Hypercarb

Cette colonne (graphite poreux) présente l'avantage par rapport aux colonnes C18 phase inverse classique (à base de silice) de posséder de nombreux groupement polaires et de permettre une optimisation de la séparation des molécules polaires et de mélanges de molécules de structures très proches.

Xing et al (2004) ont optimisé la séparation des nucléotides en testant plusieurs colonnes (Hypercarb et colonnes classiques à base de silice) ; les meilleurs résultats ont été obtenus avec la colonne Hypercarb (optimisation de la rétention des nucléotides).

Pour notre étude, d'autres colonnes ont été testées mais ont donné des résultats inférieurs (données non montrées). Cette colonne présente également l'avantage de supporter les pH extrêmes.

- Choix de la phase mobile et du gradient d'élution

Etant donné les caractéristiques de rétention variables en fonction des formes (mono di ou triP) nucléotidiques à séparer, le gradient d'élution est nécessaire pour réduire la durée d'analyse et améliorer la qualité des pics chromatographiques.

- Intérêt du diéthylamine (DEA)

C'est un agent qui permet de former une paire d'ions avec les groupements phosphates des nucléotides. Cela entraîne donc une diminution de l'interaction entre les nucléotides ionisés et les groupements polaires de la phase stationnaire (rétention des molécules diminuée).

- Choix de la phase organique de la phase mobile

Deux types de solvants peuvent être utilisés : le méthanol ou l'acétonitrile

Ces 2 solvants organiques présentent des forces d'élution différentes sur les colonnes de carbone graphite (Xing et al, 2004) avec une force éluante plus importante pour l'acétonitrile que pour le méthanol. L'acétonitrile est plus efficace pour déplacer les nucléotides de la colonne et diminue donc la rétention des composés (Xing et al, 2004).

- Extinction d'ionisation

Le phénomène d'extinction d'ionisation se produit lorsque des molécules interférentes entrent en compétition avec les molécules d'intérêt dans la source d'ionisation.

Ce problème d'extinction d'ionisation peut être majoré si les échantillons ne sont pas purifiés avant analyse ou si la phase mobile contient une molécule interférente. Dans ce cas le signal peut disparaître complètement.

- Intérêt du dosage direct

La quantification devient possible avec établissement d'une gamme de validation sur le dGTP marqué (standard nucléotidique disponible).

Le dosage direct permet aussi d'apprécier les modifications du pool de nucléotides triphosphates endogènes en présence du GCV (en introduisant dans la méthode de détection l'ensemble des transitions d'intérêt).

Il offre la possibilité de détecter les différentes formes phosphorylées du GCV.

Le dosage direct par HPLC/MS/MS présente enfin un caractère innovant, aucune méthode de dosage des dérivés phosphorylés du GCV utilisant la détection par SM n'ayant été publiée à notre connaissance.

- Limites du dosage

Les méthodes de préparation de l'échantillon sont longues : extraction SPE et évaporation (au moins 1.5 heure).

La durée d'analyse chromatographique est longue également (1 heure).

Au final, la méthode paraît difficilement réalisable en routine clinique, mais ce n'était pas l'objectif de notre travail.

La validation des méthodes est rendue complexe par la variabilité des matrices cellulaires (pas de « standardisation » possible comme avec le plasma) et l'extrapolation des résultats à d'autres types cellulaires est délicate (chaque type cellulaire disposant d'un « environnement nucléotidique » qualitatif et quantitatif spécifique).

3.4.7.2.5. Perspectives

Les conditions de préparations doivent être confirmées par d'autres essais (la perte en GMP* dans le lavage méthanolique est acceptable si elle est répétable dans les conditions actuelles d'extraction), puis la méthode devra être validée avec GMP* et dGTP* (BrGMP et BrATP comme étalons internes) avec la réalisation d'une gamme de concentration sur culots cellulaires.

4. Conclusions générales et Perspectives

Cette étude a montré pour la première fois le caractère temps-dépendant de la toxicité du GCV sur des cellules lymphoblastoïdes saines et pour des concentrations correspondant aux concentrations résiduelles efficaces recherchées en pratique clinique. Des expositions plus fortes et plus courtes permettent de préserver les cellules lymphoblastoïdes de la toxicité du GCV.

Le travail concernant la partie virologique a montré pour la première fois l'infection effective de cellules lymphoblastoïdes par le CMV.

L'interprétation des résultats d'efficacité antivirale est rendue difficile de par la toxicité massive du CMV sur les cellules. Cependant, il semble se dégager à 7 jours post-infection un effet antiviral fort pour des concentrations moyennes à fortes en GCV, avec une inhibition durable de la croissance virale après arrêt du traitement (expositions au GCV de 24 à 48 heures). Cet effet antiviral paraît équivalent à celui obtenu avec des expositions plus longues (7 jours).

Enfin, d'après les premiers résultats analytiques, la métabolisation du GCV en GCVTP a lieu dans les cellules non infectées par le CMV et permet donc d'expliquer la toxicité importante sur ces cellules. Il reste à quantifier précisément le GCVTP pour voir s'il existe un lien entre la concentration extracellulaire en GCV et la concentration intracellulaire en GCVTP, et enfin un lien entre la concentration intracellulaire en GCVTP et la toxicité cellulaire.

Les données de ce travail vont être intégrées dans un modèle mathématique qui permettra de déterminer la durée et l'intensité optimales du traitement par ganciclovir pour une efficacité maximale et une toxicité minimale.

Ensuite, un schéma thérapeutique optimal sera déterminé par simulation de l'effet obtenu par l'application de doses données de ganciclovir sur de courtes périodes répétées (détermination de la dose, de la durée d'administration et de la périodicité de cette durée).

Enfin, il paraît intéressant de prévoir une étude clinique pour pouvoir tester ces nouveaux schémas thérapeutiques.

Les nouvelles modalités d'administration du ganciclovir par séquences devraient permettre de raccourcir considérablement la durée du traitement et donc les coûts liés à la fois à l'administration du médicament mais aussi au suivi biologique de l'infection à CMV. La

limitation attendue de la toxicité médullaire devrait permettre d'éviter les rejets de greffe et donc les deuxièmes transplantations.

En résumé ces nouveaux schémas thérapeutiques pourraient :

- Améliorer la prise en charge des infections à CMV chez l'enfant immunodéprimé
- Diminuer la toxicité du GCV dans les greffes de moelle osseuse
- Diminuer les coûts de traitement des infections à CMV et de la transplantation en général.

En plus, le modèle cellulaire établi dans ce travail pourrait être utilisé pour tester la toxicité hématologique d'autres molécules.

Pour terminer, l'étude ouvre des perspectives au-delà du traitement antiviral : pourquoi ne pas mettre à profit la toxicité hématologique du GCV dans le traitement de certaines hémopathies malignes comme agent potentialisant l'action de cytotoxiques ?

5. Bibliographie

Acosta E.P. et al – Ganciclovir population pharmacokinetics in neonates following intravenous administration of ganciclovir and oral administration of a liquid valganciclovir formulation.

Clin Pharm Ther 2007 (81), 867-72.

Adachi M. et al – Expression of MRP4 confers resistance to ganciclovir and compromises bystander cell killing.

J Biol Chem 2002 (277), 38998-904.

Agbaria R. et al – Biosynthetic ganciclovir triphosphate: its isolation and characterization from ganciclovir treated herpes simplex thymidine kinase transduced murine cells.

Biochem Biophys Res Com 2001 (289), 525-30.

Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé. Évaluation de l'intérêt du dépistage de l'infection à cytomégalovirus chez la femme enceinte en France, septembre 2004.

Adresse électronique : http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/CMV_rap.pdf.

Al-Banna M.K. et al - Experimental design and efficient parameter estimation in population pharmacokinetics.

J Pharmacokinetic Biopharm 1990 (18), 347-360.

Alcorn J. et al – Acyclovir, Ganciclovir, and zidovudine transfer into rat milk.

Antimicrob agents chemother, 2002 (46), 1831-36.

Aman P. Et al - Epstein-Barr virus susceptibility of normal human B lymphocyte populations.

J. Exp. Med 1984 (159), 208-20.

Atkinson K. et al - Prophylactic ganciclovir is more effective in HLA-Identical family member marrow transplant recipients than in more heavily immune-suppressed HLA-identical unrelated donor marrow transplant recipients.

Bone Marrow Transpl 1995 (16), 401-5.

Avetisyan G. et al – Impact on the cytomegalovirus (CMV) viral load by CMV-specific T-cell immunity in recipients of allogeneic stem cell transplantation.

Bone Marrow transpl 2006 (38), 687-92.

Avila-Aguero M.L. et al – Ganciclovir therapy in cytomegalovirus (CMV) infection in immunocompetent pediatric patients.

Int J Infect Dis 2003 (7), 278-81.

Ayala E et al – Valganciclovir is safe and effective as pre-emptive therapy for CMV infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Bone Marrow Transpl 2006 (37), 851-6.

Baldanti F. et al – Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients.

J Clin Virol 2008 (41), 237-41.

Balzarini J. et al – 2', 3'- dideoxycytidine: Regulation of its metabolism and antiretroviral potency by natural pyrimidine nucleosides and by inhibitors of pyrimidine nucleotide synthesis.

Mol Pharmacol 1987 (28), 796-806.

Balzarini J. et al – Superior cytostatic activity of the ganciclovir elaidic acid ester due to the prolonged intracellular retention of ganciclovir anabolites in herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene-transfected tumor cells.

Gene Ther 1998 (5), 419-26.

Battiwalla M. et al - Ganciclovir inhibits lymphocyte proliferation by impairing DNA synthesis.

Biol Blood Marrow Transplant 2007 (13), 765-70.

Becher F. et al – Improved method for the simultaneous determination of d4T, 3TC, and ddI intracellular phosphorylated anabolites in human peripheral blood mononuclear cells using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry.

Rapid Commun Mass Spectrom 2002(16), 555-65.

Becher F. et al – Development of a direct assay for measuring intracellular AZT triphosphate in humans peripheral blood mononuclear cells.
Anal Chem 2002 (74), 4220-27.

Becher F. et al – A strategy for liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays of intracellular drugs: application to the validation of the triphosphorylated anabolite of antiretrovirals in peripheral blood mononuclear cells.
J Mass Spectrom 2003 (38), 879-90.

Beltinger C. et al – Herpes Simplex virus thymidine kinase/ganciclovir induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases.
Proc Natl Acad Sci 1999 (96), 8699-704.

Benyesh-Melnick M. et al: Studies on human leukemia. I. Spontaneous lymphoblastoid transformation of fibroblastic bone marrow cultures derived from leukemic and non-leukemic children. J Natl Cancer Inst 1963 (31); 1311.

Biron K.K. et al – Metabolic activation of the nucleoside analog 9-(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethoxymethyl)guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegaloviruses
Proc Natl Acad Sci 1985 (82), 2473-7.

Biron K.K. et al – A human cytomegalovirus mutant resistant to the nucleoside analog 9-(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethoxymethyl)guanine (BW B759U) induces reduced levels of BW B759U triphosphate
Proc Natl Acad Sci 1986 (83), 8769-73.

Bleyzac N. et al – High performance liquid chromatographic determination of ganciclovir nucleotides in human myocardial tissue.
J Chromatogr B 1994 (658), 173-6.

Boeckh M. et al – Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T -cell immunity.
Blood 2003 (101), 407- 14.

Boivin G. et al – Absence of cytomegalovirus-resistance mutations after valganciclovir prophylaxis, in a prospective multicenter study of solid organ transplant recipients
J Infect Dis 2004 (189), 1615-18.

Boivin G. et al – Early effects of ganciclovir therapy on the quantity of cytomegalovirus DNA in leukocytes of immunocompromised patients
Antimicrob Agents Chemother 1997 (41), 860-2.

Boppana S.B. et al - Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality.
Pediatr Infect Dis J 1992 (11), 93-9.

Boulieu R. et al - High- performance liquid chromatographic determination of ganciclovir in plasma.
J Chromatogr B 1991 (567), 481-4.

Brown S.D. et al – Hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray mass spectrometry determination of acyclovir in pregnant rat plasma and tissues
Rapid Commun Mass Spectrom 2002 (16), 1871-6.

Busca A. et al – Oral valganciclovir as preemptive therapy for cytomegalovirus infection post allogeneic stem cell transplantation. Transpl Infect Dis 2007 (9), 102-7.

Campanero M.A. et al – Development and validation of a sensitive method for the determination of ganciclovir in human plasma samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography
J Chromatogr B 1998 (706), 311-7.

Casteels A. et al - Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infections.
J Perinat Med. 1999 (27), 116-21.

Castagnola E. et al – Cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation in children.
Hum Immunol 2004 (65), 416-22.

Champsaur H. – Le virus Epstein-Barr.

Confrontations 1980 (51), 19.

Cheng Y. et al – Metabolism of 9-(1-3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine, a new anti-herpes virus compound, in herpes simplex virus-infected cells.

J Biol Chem 1983 (258), 12460-4.

Cheng Y.C.et al - Unique spectrum of activity of 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine against herpesviruses in vitro and its mode of action against herpes simplex virus type 1 (antiviral chemotherapy/acyclovir analog/DNA polymerase/thymidine Idnase).

Proc. Natl Acad. Sci 1983 (80), 2767-70.

Cheng Y. et al – Effects of 9 -(1,3 – dihydroxy – 2- propoxymethyl)guanine, a new antiherpesvirus compound, on synthesis of macromolecules in herpes simplex virus-infected cells.

Antimicrob Agents Chemother 1984 (26), 283-8.

Cho H.S. et al – Bystander mediated regression of murine neuroblastoma via retroviral transfer of the HSV-TK gene.

J Korean Med Sci 2004 (19), 107-12.

Colin Jordan M. et al – Spontaneous activation of latent cytomegalovirus from murine spleen explants – Role of lymphocytes and macrophages in release and replication of virus.

J Clin Invest 1982 (70), 762-8.

Collins P. et al – Comparison of the in vitro and in vivo antiherpes virus activities of the acyclic nucleosides, acyclovir and 9-(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethoxymethyl)guanine (BW B759U).

Antiviral Res 1985 (5), 145-56.

Compain S. et al – Improved method to quantify intracellular zidovudine mono and triphosphate in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography –tandem mass spectrometry.

J Mass Spectrom 2007 (42), 389-404.

Crapnell K.B. et al – Human haematopoietic stem cells that mediate long-term in vivo enraftment are not susceptible to infection by human cytomegalovirus.

British J Haematol 2004 (124), 676-84.

Crumpacker C.S. - Ganciclovir

N Engl J Med 1996 (335), 721-9.

Czarnecka J. et al – Application of solid phase extraction and high-performance liquid chromatography to qualitative and quantitative analysis of nucleotides and nucleosides in human cerebrospinal fluid.

J Chromatogr B 2005 (822), 85-90.

Davidson R.L. et al - Inhibition of herpes simplex virus transformed and nontransformed cells by acycloguanosine: mechanisms of uptake and toxicity.

Virology 1981 (113), 9-19.

De Bolle L. et al – Role of the human herpesvirus 6 U69- encoded kinase in the phosphorylation of ganciclovir.

Mol Pharmacol 2002 (62), 714-21.

Domin B.A. et al – Membrane permeation mechanisms of 2', 3'-dideoxynucleosides

Biochem Pharmacol 1993 (46), 725-9.

Dornsife R.E. et al - In vitro potency of inhibition by antiviral drugs of hematopoietic progenitor colony formation correlates with exposure at hemotoxic levels in human immunodeficiency virus-positive humans.

Antimicrob Agents Chemother 1996 (40), 514-9.

Duke A.E. et al – In vitro and in vivo activities of phosphate derivatives of 9-(1,3-hydroxy-2-propoxymethyl)-guanine against cytomegaloviruses.

Antiviral Res 1986 (6), 299-308.

Einsele H. et al - Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV- infection.

Bone Marrow Transplant 2000 (25), 757-63.

Einsele H. et al - Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation.

Blood 1995 (86), 2815-20.

Eksborg S. - The pharmacokinetics of antiviral therapy in paediatric patients.

Herpes 2003 (10), 66-71.

Emery V.C. et al -The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo.

J Exp Med 1999 (190), 177-82.

Epstein M.A. et al. – Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma.

Lancet 1964 (1), 702-3.

Feng W.H. et al – Chemotherapy induces lytic EBV replication and confers ganciclovir susceptibility to EBV-positive epithelial cell tumors.

Cancer Res 2002 (62), 1920-6.

Feng W.H. et al – Lytic induction therapy for Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphomas.

J Virol 2004 (78), 1893-902.

Filler G. et al - Prophylactic oral ganciclovir after renal transplantation-dosing and pharmacokinetics.

Pediatr Nephrol 1998 (12), 6-9.

Fishman J.A. et al – Cytomegalovirus in transplantation – challenging the status quo.

Clin Transplant 2007 (21), 149-58.

Fishman J.A. - Infection in solid-organ transplant recipients

N Engl J Med 2007 (357), 2601-14.

Forman S.J. et al - Treatment and prevention of cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation: where do we stand?

Blood 1994 (83), 2392-8.

Franck K.B. et al – Interaction of Herpes virus-induced DNA polymerase with 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine triphosphate.
J Biol Chem 1984 (259), 1566-9.

Freitas V.R. et al – Activity of 9-(1,3-hydroxy-2-propoxymethyl)-guanine compared with that of acyclovir against human, monkey, and rodent cytomegaloviruses.
Antimicrob Agents Chemother 1985 (28), 240-5.

Frenkel L.M. et al – Oral ganciclovir in children: pharmacokinetics, safety, tolerance and antiviral effects.
J Infect Dis 2000 (182), 1616-24.

Fung E.N. et al – Simultaneous determination of Ziagen and its phosphorylated metabolites by ion-pairing high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
J Chromatogr B 2001 (754), 285-95.

Furman P.A. et al – Metabolism of acyclovir in virus-infected and non infected cells.
Antimicrob Agents Chemother 1981 (20), 518-24.

Galli L. et al – Valganciclovir for congenital CMV infection: a pilot study on plasma concentration in newborns and infants.
Pediatr Infect Dis 2007 (26), 451-3.

Germershausen J. et al - A comparison of the antiviral agents 2'-nor-2'-deoxyguanosine and acyclovir: uptake and phosphorylation in tissue culture and kinetics of in vitro inhibition of viral and cellular DNA polymerases by their respective triphosphates.
Biochem Biophys Res Commun 1983 (116), 360-7.

Gentry B.G. et al – GCV phosphates are transferred between HeLa cells despite lack of bystander cytotoxicity.
Gene Therapy 2005 (12), 1033-41.

Gerna G. – Pathogenesis of human cytomegalovirus infection and cellular targets.
Hum Immunol 2004 (65), 381-6.

Ghosh K. et al - Ultrastructural changes in peripheral blood neutrophils in a patient receiving ganciclovir for CMV pneumonitis following allogeneic bone marrow transplantation.
Bone Marrow Transpl 1999 (24), 429-31.

Giebel S. et al – The immunosuppressive effect of human cytomegalovirus infection in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.
Bone Marrow Transplant 2005 (36), 503-9.

Goodrich J.M. et al – Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation.
N Engl J Med 1991 (325), 1601-7.

Goodrich J.M. et al – Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus after allogeneic marrow transplant.
Ann Intern Med 1993 (118), 173-8.

Goodrich J.M. et al – Strategies for the prevention of cytomegalovirus disease after marrow transplantation.
Clin Infect Dis 1994 (19), 287-98.

Gouarin S. et al - Congenital HCMV infection: a collaborative and comparative study of virus detection in amniotic fluid by culture and by PCR.
J Clin Virol 2001 (21), 47-55.

Gordon J. Et al - Soluble factor requirements for the autostimulatory growth of B lymphoblasts immortalized by Epstein-Barr virus.
J. Exp Med 1984 (159), 1554-9.

Grangeot-Keros L. et al - Should we routinely screen for cytomegalovirus antibody during pregnancy?
Intervirology 1998 (41), 158-62.

Gratacap-Cavallier B. et al - Cytomegalovirus seroprevalence in French pregnant women: parity and place of birth as major predictive factors.
Eur J Epidemiol 1998 (14), 147-52.

Gratama J.W. et al – Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T lymphocytes in T –cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection.

Blood 2001 (98), 1358-64.

Greanya E.D. et al – Therapeutic drug monitoring of ganciclovir in bone marrow transplants.

Eur J Hosp Pharm 2005(11), 43-5.

Gredmark S. et al – Human Cytomegalovirus induces inhibition of macrophage differentiation by binding to human aminopeptidase N/CD13.

J Immunol 2004 (173), 4897-907.

Gredmark S. et al – Human cytomegalovirus inhibits cytokine-induced macrophage differentiation.

J Virol 2004 (78), 10378-89.

Green M. et al – Comparison of intravenous Ganciclovir followed by oral acyclovir with intravenous ganciclovir alone for prevention of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus disease after liver transplantation in children.

Clin Infect Dis 1997 (25), 1344-9.

Gruber S.A. et al – Cytomegalovirus prophylaxis with valganciclovir in African- American renal allograft recipients based on donor/recipient serostatus.

Clin Transpl 2005 (19), 273-8.

Guo Y. et al – Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography.

J Chromatogr A 2005 (1074), 71-80.

Haastrop E. et al – Cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplant in children.

Pediatr Transplantation 2005 (9), 734-40.

Haberkorn U. et al – Monitoring gene therapy with herpes simplex virus thymidine kinase in hepatoma cells: uptake of specific substrates.

J Nucl Med 1997 (38), 287-94.

Haberkorn U. et al – Ganciclovir uptake in human mammary carcinoma cells expressing herpes simplex virus thymidine kinase.

Nuclear Med Biol 1998 (25), 367-73.

Hamel W. et al – Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells.

Cancer Research 1996 (56), 2697-702.

Heagy W. et al – Inhibition of immune functions by antiviral drugs.

J Clin Invest 1991 (87), 1916-24.

Hebart H. et al – Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation.

Hum Immunol 2004 (65), 432-6.

Hebart H. et al – Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma enzyme linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation.

Blood 2002 (99), 3830-7.

Herz A.V.M et al – Viral dynamics in vivo: Limitations on estimates of intracellular delay and virus decay.

Proc Natl Acad Sci 1996 (93), 7247-51.

Hodson E.M. et al – Antiviral medications to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ transplants: a systematic review of randomized controlled trials.

Lancet 2005 (365), 2105-15.

Hoggard P.G. et al – Effects of drugs on 2', 3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine phosphorylation in vitro.

Antimicrob Agents Chemother 1997 (41), 1231-6.

Holberg-Peterson M. et al - Direct growth suppression of myeloid bone marrow progenitor cells but not cord blood progenitors by human cytomegalovirus in vitro.

Blood 1996 (88), 2510-6.

Humar A. et al –Cytomegalovirus virus load kinetics to predict recurrence disease in solid organ transplant patients with CMV disease.

J Infect Dis 2002 (186), 829-33.

Humar A. et al – A trial of valganciclovir prophylaxis for cytomegalovirus prevention in lung transplant recipient.

Am J Transpl 2005 (5), 1462-8.

Janoly-Dumenil A. et al – Human herpes virus-6 encephalitis in a paediatric bone marrow recipient: successful treatment with pharmacokinetic monitoring and high doses of ganciclovir.

Bone Marrow Transpl 2006 (38), 769-70.

Jelliffe R.W. et al.- Individualizing drug dosage regimens: roles of population pharmacokinetic and dynamic models, bayesian fitting, and adaptive control.

Ther Drug Monit 1993 (15), 380-93.

Jondal M. et al – Surface markers on human B and T lymphocytes. II. Presence of Epstein-Barr virus receptors on B lymphocytes.

J Exp Med 1973 (138), 1365-78.

Kee Bae P. et al – Intracellular uptake of thymidine and antiherpetic drugs for thymidine kinase-deficient mutants of herpes simplex virus type 1.

Antiviral Res 2006 (70), 93-104.

Khaiboullina S.F. et al – Human cytomegalovirus persists in myeloid progenitors and is passed to the myeloid progeny in a latent form.

Brit J Haematol 2004 (126), 410-7.

Kennedy G.A. et al - Neutrophil dysplasia characterised by a pseudo-Pelger-Huet anomaly occurring with the use of mycophenolate mofetil and ganciclovir following renal transplantation: a report of five cases.

Pathology 2002 (34), 263-6.

Kishino S. et al – Liquid chromatographic method for the determination of ganciclovir and/or acyclovir in human plasma using pulsed amperometric detection.

J Chromatogr B 2002 (780), 289-94.

Mar E.C. et al - Effect of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine on human cytomegalovirus replication in vitro.

Antimicrob Agents Chemother 1983 (24), 518-21.

Moore S.M. et al – Induction of Epstein-Barr virus kinases to sensitize tumor cells to nucleoside analogues.

Antimicrob Agents Chemother 2001 (45), 2082-91.

Leeman T.D. – Incertitude et raisonnement bayésien en pharmacologie Clinique.

Med et Hyg 1990 (48), 1254-8.

Lefebvre I. et al – Quantification of zidovudine and its monophosphate in cell extracts by on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography.

J Chromatogr. B 2007 (858), 2-7.

Limaye A.P. et al – Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants.

Lancet 2000 (356), 645-9.

Ljungman P. et al – Results of different strategies for reducing CMV-associated mortality in allogeneic stem cell transplant recipients.

Transplantation 1998 (66), 1330-4.

Ljungman P. et al – Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation.

Haematologica 2006 (91), 78-83.

Loginov R. et al – Detection of CMV –DNA in peripheral blood leukocytes of liver transplant patients after ganciclovir treatment

Arch Virol 2003 (148), 1269-74.

Loregian A. et al – Separation methods for acyclovir and related antiviral compounds

J Chromatogr B 2001 (764), 289-311.

Lorenzetti R. et al – Simultaneous quantification of GMP, AMP, cyclic GMP and cyclic AMP by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.

J Chromatogr B 2007 (859), 37-41.

Maciejewski J.P. et al – Infection of hematopoietic progenitor cells by human cytomegalovirus.

Blood 1992 (80), 170-8.

Mahony W.B. – Ganciclovir permeation of the human erythrocyte membrane.

Biochem Pharmacol 1991 (41), 263-71.

Mahony W.B. et al – Membrane permeation characteristics of abacavir in human erythrocytes and human T-lymphoblastoid CD4+ CEM cells: comparison with carbovir.

Biochem Pharmacol 2005 (16), 15-24.

Majumdar S. et al - Mechanism of ganciclovir uptake by rabbit retina and human retinal pigmented epithelium cell line ARPE-19.

Curr Eye Res 2004 (29), 127-36.

Mallet A. et al – Notions de pharmacocinétique de population.

In Pharmacocinétique. G Houin. Ed Marketing, Paris, 1990 ; 127-44.

Maltazou H. et al - Cytomegalovirus in adult marrow transplant recipients receiving ganciclovir prophylaxis: a retrospective study.

Bone Marrow Transpl 1999 (24), 665-9.

Manischewitz J.F. et al - Synergistic effect of ganciclovir and foscarnet on cytomegalovirus replication in vitro.

Antimicrob. Agents Chemother 1990 (34), 373-5.

Marmer D.J. et al – Comparison of flow cytometric analysis and [H] thymidine incorporation for measurements of the effects of drug toxicity on lymphocyte stimulation.

Antimicrob. Agents Chemother 1983 (24), 605-8.

Mattes F.M. et al – A randomized, controlled trial comparing ganciclovir to ganciclovir plus foscarnet (each of half dose) for preemptive therapy of cytomegalovirus infection in transplant recipients.

Journal Infect Dis 2004 (189), 1355-61.

Matthes-Martin S. et al – Pre-emptive treatment of CMV DNAemia in paediatric stem cell transplantation: the impact of recipient and donor CMV serostatus on the incidence of CMV disease and CMV-related mortality.

Bone Marrow Transplant 2003 (31), 803-8.

McGavin J.K. et al - Ganciclovir, an update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipient.

Drugs 2001 (61), 1153-83.

Mc Guffin R.W. et al – Lack of toxicity of acyclovir to granulocyte progenitor cells in vitro

Antimicrob agents chemother 1980 (10), 471-73.

Mello A.S. et al – Epstein Barr virus induced transformation of B cells for the diagnostic of genetic metabolic disorders – enumerative conditions for cryopreservation.

Cell Prolif 2006 (39), 29-36.

Meijer E. et al – Prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem cell transplants.

Clin Microbiol Rev 2003 (16), 647-57.

Mentzer S.J. et al – Epstein-Barr virus posttransplant lymphoproliferative disease and virus-specific therapy : pharmacological re-activation of viral target genes with arginine butyrate.

Transplant Infect Dis 2001 (3), 177-85.

Merodio M. et al – Development of a sensitive method for the determination of ganciclovir by reversed-phase high-performance liquid chromatography.

J Chromatogr A 2000 (870), 159-67.

Miller G. et al. – Comparison of the yield of infectious virus from clones of human and simian lymphoblastoid lines transformed by Epstein-Barr virus.

J Exp Med 1973 (138), 1398-412.

Minto C. et al - Expanding clinical applications of population pharmacodynamic modelling.
Pharmacol 1998 (46), 321-33.

Minton E.J. et al – Human cytomegalovirus infection of the monocyte-macrophage lineage in bone marrow
J Virol 1994 (68), 4017-21.

Mosca F. et al – Cytomegalovirus infection: The state of the art.
J Pharmacother 2007 (19), 46-8.

Movassagh M. et al – Direct infection of CD34+ progenitor cells by human cytomegalovirus: evidence for inhibition of hematopoiesis and viral replication
Blood 1996 (88), 1277-83.

Moore J.D. et al – Simultaneous quantification of the 5'-triphosphate metabolites of zidovudine, lamivudine, and stavudine in peripheral mononuclear blood cells of HIV infected patients by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry
J Am Soc Mass Spectrom 2000 (11), 1134-43.

Morfin F. et al – Cytomegalovirus and adenoviruse infections and diseases among 75 paediatric unrelated allogeneic bone marrow transplant recipients
J Med Virol 2004 (72), 257-62.

Mori T. et al - Dose-adjusted preemptive therapy for cytomegalovirus disease based on real-time polymerase Chain reaction after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.
Bone Marrow Transpl, 2002, 29, 777-82.

Naidong W. et al – Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the analysis of paroxetine in human plasma.
Biomed Chromatogr 2004 (18), 28-36.

Neuman A.U. et al - Differences in viral dynamics between genotypes 1 and 2 of hepatitis C virus.

J Infect Dis 2000 (182), 28-35.

Neitzel H. – A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines.

Hum Genet 1986 (73), 320-6.

Nilsson K. et al - Phenotypic and cytogenetic characteristics of human B-lymphoid cell lines and their relevance for the etiology of Burkitt's lymphoma.

Adv Cancer Res 1982 (37), 319-80.

Nishihara E. et al – Retrovirus mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction renders human thyroid carcinoma cell lines sensitive to ganciclovir and radiation in vitro and in vivo.

Endocrinology 1997 (11), 4577-83.

Nowak M.A. et al - Viral dynamics in hepatitis B virus infection.

Proc Natl Acad Sci 1996 (93), 4398-402.

Okleberry K.M. et al – Metabolism of ganciclovir and cidofovir in cells infected with drug-resistant and wild-type strains of murine cytomegalovirus.

Antiviral Res 1997 (35), 83-90.

Olsen B.A.

Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceuticals and impurities.

J Chromatogr A 2001 (13), 113-22.

Parent du Châtelet I. et al - Enquête sur les infections maternofoetales à cytomegalovirus détectées pendant la grossesse ou à la naissance en France métropolitaine, novembre 2004-janvier 2005.

BEH 2008 (14 et 15), 124-8.

Parker L.M. et al - Effect of acyclovir and interferon on human hematopoietic progenitor cells.

Antimicrob Agents Chemother 1982 (21), 146-50.

Pastor-Anglada M. – Cell entry and export of nucleoside analogs.
Virus Res 2005 (107), 151-164.

Paul J. - Establishment of permanent cell strains from adult peripheral blood.
Nature, 1958 (182); 808-9.

Patel S.R. et al – Cytomegalovirus reactivation in pediatric hematopoietic progenitors transplant : a retrospective study on the risk factors and the efficacy of treatment
J Pediatr Hematol Oncol 2005 (27), 411-5.

Paya C. et al – Efficacy and safety of valganciclovir vs oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus in solid organ transplant recipients.
Am J Transpl 2004 (4), 611-20.

Peter K. et al – Quantification of zidovudine and individual zidovudine phosphates in peripheral blood mononuclear cells by a combined isocratic high performance liquid chromatography radioimmunoassay method.
J Pharm Biomed Anal 1996 (14), 491-9.

Peyrière H. et al – Neurotoxicity related to valganciclovir in a child with impaired renal function: usefulness of therapeutic drug monitoring.
Ann Pharmacother 2006 (40), 143-6.

Pope J.H. – Establishment of cell lines from peripheral leukocytes in infectious mononucleosis.
Nature 1967 (216), 810-1.

Pope J.H. et al – Transforamtion of fetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukemic cell line containing herpes-like virus.
Int J Cancer 1968 (3), 857-66.

Pruvost A. et al – Direct determination of phosphrylated intracellular ababolites of stavudine (d4T) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry.
Rapid Commun Mass Spectrom 2001(15), 1401-8.

Rafailidis P.I. et al – Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review.

J Virol 2008 (5): 47.

Razonable R.R. et al – Dynamics of cytomegalovirus replication during preemptive therapy with oral ganciclovir

Journal Infect Dis 2003 (187), 1801-8.

Razonable R.R. et al – Herpesvirus infection in transplant recipients: current challenges in the clinical management of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection.

Herpes 2003 (10), 60-5.

Reddy V. et al - Management of of allogeneic bone marrow transplant recipients at risk for cytomegalovirus disease using using a surveillance bronchoscopy and prolonged preemptive ganciclovir therapy.

J Clin Virol 1999 (13), 149-59.

Revello M.G. et al – In vitro generation of human cytomegalovirus pp65 antigenemia, viremia and leukoDNAemia.

J Clin Invest 1998 (101), 2686-92.

Robbins B.L. et al – Quantitation of intracellular zidovudine phosphates by use of combined cartridge-radioimmunoassay methodology.

Antimicrob Agents Chemother, 1996 (40), 2651-4.

Rubsam L.Z. et al – Superior cytotoxicity with ganciclovir compared with acyclovir and 1- β -D-arabinofuranosylthymine in herpes simplex virus-thymidine kinase-expressing cells: a novel paradigm for cell killing.

Cancer Res 1998 (58), 3873-82.

Rubsam L.Z. et al – Cytotoxicity and accumulation of ganciclovir triphosphate in bystander cells cocultured with herpes simplex virus type 1 thymidine kinase-expressing human glioblastoma cells.

Cancer Res 1999 (59), 669-750.

Saigal S. et al - The outcome in children with congenital cytomegalovirus infection. A longitudinal follow-up study.
Am J Dis Child 1982 (136), 896-901.

Salzberger B. et al - Neutropenia in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease : Risk factors and outcome.
Blood 1997 (90), 2502-8.

Schmidt G.M. et al – A randomized, controlled trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogeneic bone marrow transplants; The City of Hope-Stanford- Syntex CMV study group.
N Engl J Med 1991 (324), 1005-11.

Scott J.C. et al - Ganciclovir in solid organ transplant recipients.
Ther Drug Monit 2004 (26), 68-77.

Shewach D.S. et al – Metabolism of 2', 2'-difluoro-2'-deoxycytidine and radiation sensitization of human colon carcinoma cells.
Cancer Res 1994 (54), 3218-23.

Sinclair J. – Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage.
J Clin Virol 2008 (41), 180-85.

Sindre H. et al – Human cytomegalovirus induced inhibition of hematopoietic cell line growth is initiated by events taking place before translation of viral gene products.
Arch Virol 2000 (145), 99-111.

Singh N. – Antiviral drugs for cytomegalovirus in transplant recipients: advantages of preemptive therapy.
Rev Med Virol 2006 (16), 281-7.

Slusher J.T. et al – Intracellular zidovudine (AZT) and ZDV phosphates as measured by a validated combined high pressure liquid chromatography- radioimmunoassay procedure.
Antimicrob Agents Chemother 1992 (36), 2473-7.

Smee D.F. et al - 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 1985 (34): 1049-56.

Smith T.F. et al – Quantitative real-time polymerase chain reaction for evaluating DNAemia due to Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and K virus in solid organ transplant recipients. Clin Infect Dis 2007 (45), 1056-61.

Snoek R. et al – Inhibitory effects of potent inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus on the growth of human granulocyte-macrophage progenitor cells in vitro. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990 (9), 615-9.

Solas C. et al – Intracellular nucleotides of (-) – 2',3'-deoxy-3'-thiacytidine in peripheral blood mononuclear cells of a patient infected with human immunodeficiency virus. Antimicrob Agents Chemother 1998 (42), 2989-95.

Sommadossi J.P. et al - Toxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 9–(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine for normal human hematopoietic progenitor cells in vitro. Antimicrob Agents Chemother 1987 (31), 452-4.

St Clair M.H. et al – Inhibition of cellular α and virally induced deoxyribonucleic acid polymerases by the triphosphate of acyclovir. Antimicrob Agents Chemother 1980 (18), 741-5.

St Clair M.H. et al – Inhibition of cellular α DNA polymerase and herpes simplex virus-induced DNA polymerases by the triphosphate BW759U. Antimicrob Agents Chemother 1984 (25), 191-4.

St Clair M.H. et al – Inhibition by ganciclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with Herpesvirus genetic information. Antimicrob Agents Chemother 1987 (31), 844-9.

St Clair R.L. - Positive ion electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled to ion pairing high performance liquid chromatography with a phosphate buffer for the quantitative analyses of intracellular nucleotides.

Rapid Commun Mass Spectrom 2000 (14), 1625-34.

St Jeor S. et al – Persistence of cytomegalovirus in human lymphoblasts and peripheral leukocyte cultures

Infect Immun 1977 (15), 402-9.

Stagno S. et al - Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome.

JAMA 1986 (256), 1904-8.

Sugden B. - Comparison of Epstein-Barr viral DNAs in Burkitt lymphoma biopsy cells and in cells clonally transformed in vitro.

Proc Natl Acad Sci USA 1977 (74), 4651-5.

Sun Q. et al – Ex vivo expansion of cytomegalovirus and Epstein Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes using B-lymphoblastoid cell lines expressing cytomegalovirus pp65

Blood 1999 (94), 3242-50.

Sun Q. et al – B lymphoblastoid cell lines as efficient APC to elicit CD8+ T cell responses against a cytomegalovirus antigen.

J Immunol 2000 (165), 4105-11.

Sweet C. – The pathogenicity of cytomegalovirus.

FEMS microbiology reviews 1999 (23), 457- 82.

Taegtmeyer A.B. et al – Neutrophil dysplasia (acquired pseudo-pelger anomaly) caused by ganciclovir.

Transplantation 2005 (80), 127-30.

Takeda M. et al – Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport.

J Pharmacol Exp Ther 2002 (300), 918-24.

Talarico C.L. et al – Acyclovir is phosphorylated by the human cytomegalovirus UL97 protein.

Antimicrob Agents Chemother 1999 (43), 1941-6.

Teshima D. et al – A simple and simultaneous determination of acyclovir and ganciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography.

Biomed Chromatogr 2003 (17), 500-3.

Thursky K. et al – Risk factors for post-engraftment invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplantation.

Bone Marrow Transpl 2004 (34), 115-21.

Tocci M.J. et al – Susceptibility of lymphoblastoid cells to infection with human cytomegalovirus.

Infect Immun 1979 (23), 418-23.

Tocci M.J. et al – Effects of the nucleoside analog 2'-nor-2'-deoxyguanosine on human cytomegalovirus replication.

Antimicrob Agents chemother 1984 (25), 247-52.

Tominic M.T. et al – Ganciclovir-induced apoptosis in HSV-1 thymidine kinase expressing cells: critical role of DNA breaks, Bcl-2 decline and capsase-9 activation.

Oncogene 2002 (21), 2141-53.

Tomonari A. et al - Ganciclovir-related neutropenia after preemptive therapy for cytomegalovirus infection: comparison between cord blood and bone marrow transplantation.

Ann Hematol 2004 (83), 573-7.

Torok-Storb B. et al - Cytomegalovirus and marrow function.

Ann Hematol 1992 (64), 128-31.

Trang J.M., Kidd L., Gruber W. et al. – Linear single-dose pharmacokinetics of ganciclovir in newborns with congenital cytomegalovirus infections.

Clin Pharmacol Ther 1993 (53), 15-21.

Tsiang M. et al - Biphasic clearance kinetics of hepatitis B virus from patients during adefovir dipivoxil therapy.

Hepatology 1999 (29), 1863-9.

Tsuchie M. et al – Determination of anti-virus drug, ganciclovir, in human serum by HPLC with precolumn fluorescence derivatization using phenylglyoxal.

Anal Sci 2001 (17), 811- 4.

Tucker W.E. et al - Preclinical toxicology profile of acyclovir: An overview.

Am J Med 1982 (73), 27-30.

USCPACK PC Clinical Programs. Laboratory of Applied Pharmacokinetics. School of Medicine. University of South California. Alcazar Street. Los Angeles, USA

Van der Eb M.M. et al – Ganciclovir nucleotides accumulate in mitochondria of rat liver cells expressing the herpes simplex virus thymidine kinase gene.

J Gene Med 2003 (5), 1018-27.

Van der Heiden PL et al – Oral valganciclovir as pre-emptive therapy has similar efficacy on cytomegalovirus DNA load reduction as intravenous ganciclovir in allogeneic stem cell transplantation recipients.

Bone Marrow Transpl 2006 (37), 693-8.

Vela J.E. et al – Simultaneous quantification of the nucleotide analog adefovir, its phosphorylated anabolites and 2'-deoxyadenosine triphosphate by ion-pairing LC/MS/MS.

J Chromatogr B 2007 (848), 335-43.

Vethamuthu J. et al – Unexpectedly high inter and inpatient variability of ganciclovir levels in children.

Pediatr Transplantation 2007 (11), 301-5.

Vidal 2008

Vij R. et al – Low-dose short-course intravenous ganciclovir as pre-emptive therapy for CMV viremia post allo-PBSC transplantation.

Bone Marrow Transpl 2003 (32), 703-7.

Viora M et al – Interference with cell cycle progression and induction of apoptosis by dideoxynucleoside analogs.

Int J Immunopharmacol 1997 (19), 311-21.

Wang C.H. et al. – Growth of permanent lymphoid cell cultures from human source : tenth anniversary.

Texas Rep Biol Med 1975 (33), 213-50.

Winston D.J. et al – Ganciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant recipients: results of a placebo-controlled, double –blind trial.

Ann Intern Med 1993 (118), 179-84.

Xing J. et al – Liquid chromatographic analysis of nucleosides and their mono-, di- and triphosphates using porous graphitic carbon stationary phase coupled with electrspray mass spectrometry.

Rapid Commun Mass Spectrom 2004 (18), 1599-606.

Xu K. et al – A rapid and sensitive method for the quantification of ganciclovir in plasma using liquid chromatography/selected reaction monitoring mass spectrometry.

Biomed Chromatogr 2000 (14), 93-8.

Yuen G.J. et al – Population differences in ganciclovir clearance as determined by nonlinear mixed-effect modeling.

Antimicrob Agents Chemother 1995 (39), 2350-2.

Yun Z. et al - Real Time monitoring of CMV infections after stem cell transplantation using the TaqMan polymerase chain reaction.

Transplantation 2000 (69), 1733-6.

Zhang D. et al - Pharmacokinetics of ganciclovir in pediatric renal transplant recipients.

Pediatr Nephrol 2003 (18), 943-8.

Zhou X.J. et al - Population pharmacokinetics of ganciclovir in newborns with congenital cytomegalovirus infection.

Antimicrob Agents Chemother 1996 (40), 2202-5.

Zur Hausen H. – Oncogenic Herpes virus.
Biochem Biophys Acta 1975 (417), 25-53.

6. Annexes et Publications

ANNEXE 1 : Préparation des milieux pour les cultures cellulaires

ANNEXE 2 : Méthode d'extraction de l'ADN viral

ANNEXE 3 : Isolement des lymphocytes et cryopréservation

ANNEXE 4 : Production du virus Epstein-Barr

ANNEXE 5 : Immortalisation des lymphocytes

ANNEXE 6 : Culture des lignées lymphoblastoïdes

ANNEXE 7 : Méthode analytique de dosage du GCV dans le plasma

ANNEXE 8 : Protocole de l'essai final de toxicité et d'efficacité : Essai E

ANNEXE 9 : Article publié : Human herpes virus-6 ebcephalitis in a paediatric bone marrow recipient : successful treatment with pharmacokinetic monitoring and high doses of ganciclovir.

ANNEXE 10 : Article soumis : Impact of duration and intensity of ganciclovir exposure on lymphoblastoid cell toxicity.

ANNEXE 11 : Poster publié :

ANNEXE 12 : Poster publié : Ganciclovir et toxicité hématologique cellulaire : impact de la concentration et de la durée d'exposition.

JANOLY-DUMENIL Audrey

Optimisation des modalités thérapeutiques de l'infection à CMV en post-transplantation de moelle osseuse pédiatrique par l'étude *in vitro* des relations PK/PD de l'efficacité antivirale et de la toxicité cellulaire du ganciclovir.

RESUME

L'infection par le cytomégalovirus (CMV) constitue une des complications majeures de la transplantation de moelle osseuse pédiatrique. Le ganciclovir (GCV) reste aujourd'hui le traitement de choix de l'infection mais sa toxicité sur les cellules de la lignée sanguine rend son utilisation délicate. L'objectif de l'étude était d'évaluer *in vitro* des schémas posologiques plus courts et plus intenses que ceux utilisés actuellement *in vivo* (traitements de 14 jours au minimum avec concentrations plasmatiques cibles minimales de 1-2 mg/L) en terme d'efficacité et de toxicité cellulaire. L'influence de l'intensité (1 à 20 mg/L) et de la durée d'exposition (1 à 14 jours) sur l'activité antivirale et la toxicité cellulaire a été étudiée à partir d'un modèle de culture de cellules lymphoblastoïdes, infectées ou non par le CMV. Une relation concentration/toxicité (numération cellulaire) a été mise en évidence pour des durées d'exposition supérieures à 2 jours (sur cellules non infectées). Cette toxicité est liée à la formation de GCV triphosphate (métabolite actif), détecté par méthode chromatographique couplée à la spectrométrie de masse. Des expositions de 1 à 2 jours ont paru aussi efficaces (mesure de la charge virale) que des expositions plus longues pour des concentrations de 5 à 20 mg/L. Ces résultats montrent pour la première fois l'influence majeure de la durée d'exposition sur la toxicité *in vitro* et incitent à limiter la durée des traitements pour préserver les cellules hématologiques.

L'intégration des données dans un modèle mathématique permettra de déterminer un schéma thérapeutique optimal, qui devra alors être testé chez l'enfant dans le cadre d'un essai clinique. Il devrait permettre d'améliorer la prise en charge des infections à CMV chez l'enfant immunodéprimé.

MOTS CLEFS

ganciclovir - Cytomégalovirus - cellules lymphoblastoïdes - toxicité - efficacité

JURY

Madame le Professeur M.C. SAUX (rapporteur)

Madame le Docteur M.T. ZABOT

Madame le Docteur N. BLEYZAC

Monsieur le Professeur G. AULAGNER

Monsieur le Professeur M. BRAZIER (rapporteur)

Monsieur le Professeur J GUITTON

Monsieur le Professeur C. VIGNERON

DATE DE SOUTENANCE

13 novembre 2008

ADRESSE DE L'AUTEUR

1 bis rue de la LOGE – 69005 LYON

ANNEXE 1

High Pure DNA extraction : kit colonnes Roche

Laboratoire de Virologie, Domaine Rockefeller
Fatima NAJIOULLAH

MAJ Janvier 2005
Avril 1998 modifiée octobre 1998, juin 1999

II) PROTOCOLE D'EXTRACTION

1°) Dans 1 tube bijoux faire un mélange extemporané en fonction du nombre d'échantillons à extraire, plus un témoin négatif (eau), un témoin positif (AB1 -5 ou 16) et un tube de volume mort correspondant à :

* 50 µl de la solution de PK, * 4 µl de poly(A), * 200 µl de Binding Buffer.	} pour chaque tube

Exemple : pour 22 échantillons à extraire + témoin négatif + témoin positif + 1 tube, soit 25 tubes :

- 1250 µl de PK - 100 µl de poly(A) - 5 ml de Binding Buffer	} mélanger par retournement et distribuer 250 µl dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml
- rajouter 200 µl de l'échantillon sérum ou plasma.

Vortexer immédiatement et incuber 10 min à 72°C.

2°) Centrifuger 1 minute 10 000 t/min, rajouter 100 µl de Binding Buffer. Mélanger à la pipette.

3°) Adapter un tube de « collection » sous un tube High pure filter.

- * Transférer l'échantillon traité dans tube High pure filter.
- * Centrifuger 1 min. à 10 000 t/min.

4°) Incuber le volume nécessaire de Elution buffer à 70°C.

5°) Jeter le tube de « collection » et son contenu. Adapter un nouveau tube de « collection » sous le tube High pure filter.

- * Ajouter 500 µl de Inhibitor Removal Buffer et centrifuger 1 min. à 10 000 t/min

6°) Jeter le tube de « collection » et son contenu. Adapter un nouveau tube de « collection » sous le tube High pure filter.

- * Ajouter 450 µl de Wash buffer et centrifuger 1 min. à 10 000 t/min.

7°) Jeter le tube de « collection » et son contenu. Adapter un nouveau tube de « collection » sous le tube High pure filter.

- * Ajouter 450 µl de Wash buffer et centrifuger 1 min. à 10 000 t/min.

- * Jeter le tube de « collection » et son contenu. Adapter un nouveau tube de « collection ». Et centrifuger 10 secondes à 13000 t/min.

8°) Jeter le tube de « collection » et son contenu. Adapter un tube eppendorf siliconé stérile sous le tube High pure filter.

9°) Ajouter 100 µl de Elution buffer pour les sérums et plasmas, et 50 µl pour les biopsies. incuber 5 min puis centrifuger 1 min. à 10 000 t/min.

L'ADN ainsi élué peut être utilisé immédiatement ou stocké à +4°C pendant 48 h au delà, il faut le congeler à -20°C.

Centrifuger les éluats 1 min. à 5000t/min avant la PCR.

Attention les étapes 1, 2, 3 et 8 sont à haut risque de contamination.

ANNEXE 2

1. MATERIEL ET REACTIFS

1.1 Matériel

Pipettes de 1, 10, 25 ml
Seringues de 1 ml et 10ml
Tubes à centrifuger
Flacons plastique T25, T75
Tubes stériles

1.2 Réactifs

Milieux de culture du commerce : prêts à l'emploi, concentrés ou en poudre

MEM sans L-Glutamine et sans Méthionine
Milieu 199 (10X) sans NaHCO₃
Milieu Chang D
Milieu Ham F10
Milieu RPMI 1640
Milieu Kératinocyte-SFM
Milieu de base Amnio Max C100

Additifs :

Sérum de veau fœtal (lot testé)
Ultroser G
Additifs milieu Kératinocyte-SFM
Facteur de croissance épidermique 1 53
Extrait de glande pituitaire bovine PBE
Complément Amnio Max C100
Uridine

Anti-contaminants microbiologiques :

Pénicilline
Streptomycine
Amphotéricine B
Vancocine
Gentamicine
Tylosine
Kanamycine
Trobicine
Mycostatine

Eau pour préparation injectable (PPI)

2. ETAPE PRELIMINAIRE

Les milieux de culture de routine sont préparés le vendredi pour la semaine suivante :

- calculer le volume des différents milieux nécessaires au fonctionnement pour la semaine suivante en comptant le nombre de repiquages à effectuer, les envois éventuels de cellules dans un laboratoire extérieur, les décongélation prévues, les changements de milieu...
- prendre à la chambre froide, le nombre de flacons de milieu de culture nécessaire.

ANNEXE 2

- décongeler le volume correspondant d'additifs stockés à – 20 °C.

Les milieux de culture plus spécialisés dont le milieu utilisé pour la congélation des cellules sont préparés à la demande. La procédure suivie est la même que noté ci-dessus

3. PREPARATION DES ADDITIFS

Sérum de veau fœtal : décongeler à température ambiante le volume nécessaire à la fabrication des milieux pour la semaine suivante, (recongeler la fraction non utilisée).

Ultrosor G : reprendre le lyophilisat par 10 ml d'eau PPI . Conserver à –20°C la solution reconstituée.

Uridine: préparer un solution à 2.5 mg/ml avec de l'eau PPI . Filtrer sur filtre 0.22µm extemporanément.

Anti-contaminants microbiologiques : si nécessaire, reconstituer les différentes solutions en suivant les indications des fabricants.

4. PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE LES PLUS COURANT

(Dans le cas d'utilisation de milieu de culture très particulier, se conformer aux indications du fabricant et /ou de la publication de référence)

Travailler sous hotte à flux laminaire horizontal (box 1).

Placer sous la hotte tous les éléments nécessaires à la préparation du milieu choisi en nettoyant les flacons à l'alcool iodé avant de les introduire sous la hotte.

Milieux de culture du commerce concentrés ou en poudre: reconstituer les solutions liquides en suivant les indications des fabricants.

Compléter les milieux prêts à l'emploi ou les milieux obtenus après reconstitution selon formules ci dessous :

FORMULE M 1 : "Culture primaire de peau"

Préparation réalisée directement dans le flacon de Ham F10 du commerce

Sérum de veau fœtal (lot en cours) :20% soit 68 ml pour un flacon de 500ml

Pénicilline streptomycine: 120 UI/ml ;120 µg/ml

Amphotéricine B: 1 µg/ml

FORMULE M 1 U: "Culture primaire de peau Uridine"

Idem FORMULE 1 + Uridine 50 mg/l

FORMULE M 1 PAV: "Culture primaire de peau PAV"

Idem FORMULE 1 + Amiklin 12.5 µg/ml +Vancocine 4 µg/ml

FORMULE M 1 GEKST: "Culture primaire de peau GEKST"

Idem FORMULE 1 + Gentamycine 8 µg/ml + Kanamycine 50µg/ml + Tylocine 40µg/ ml

Concentrations préconisées dans la publication de Van Diggelen et Niermeijer "Elimination of mycoplasmas from infected cell culture by combined trypsin/antibiotics treatment" J Inherit Metab Dis 1986;9-398: Gentamycine 80 µg/ml + Kanamycine 100 µg/ml + Spectinomycine 80 µg/ml + Tylocine 80µg/ ml

FORMULE M 2: "12%"

Préparation réalisée directement dans le flacon de Ham F10 du commerce.

ANNEXE 2

Ham F'10 Flacon de 500ml
Sérum de veau fœtal (lot en cours) : 60 ml
Pénicilline streptomycine : 120 UI/ml ;120 µg/ml
Amphotéricine B: 1µg/ ml)

FORMULE M 2 U : "12% Uridine"
Idem FORMULE 2 + Uridine 50 mg/L

FORMULE M 2 PAV:"12% PAV"
Idem FORMULE 2 +Amiklin 12.5µg/ml +Vancocine 4 µg/ml

FORMULE M 2 GEKST: "12% GEKST"
Idem FORMULE 2+ Gentamycine 8 µg/ml + Kanamycine 50µg/ml + Tylocine 40µg/ ml

Concentrations préconisées dans la publication de Van Diggelen et Niermeijer « Elimination of mycoplasmas from infected cell culture by combined trypsin/antibiotics treatment » J Inherit Metab Dis 1986;9-398:Gentamycine 80 µg/ml + Kanamycine 100µg/ml + Spectinomycine 80 µg/ml + Tylocine 80µg/ ml

FORMULE M 3 : "12% UG"
Ham F'10 Flacon de 500ml
Sérum de veau fœtal (lot en cours) : 60 ml
Ultrosor G : 1%
Pénicilline streptomycine: 120 UI/ml ;120 µg/ml
Amphotéricine B: 1µg/ ml
Préparation réalisée directement dans le flacon de Ham F10 du commerce.

FORMULE M 3 U: "12% UG Uridine"
Idem FORMULE 3 + Uridine 50 mg/l

FORMULE M 3 PAV : "12 %UG PAV"
Idem FORMULE 3 +Amiklin 12.5µg/ml +Vancocine 4 µg/ml

FORMULE M 3 GEKST: "12%UG GEKST"
Idem FORMULE 3 + Gentamycine 8 µg/ml + Kanamycine 50µg/ml + Tylocine 40µg/ ml

Concentrations préconisées dans la publication de Van Diggelen et Niermeijer « Elimination of mycoplasmas from infected cell culture by combined trypsin/antibiotics treatment » J Inherit Metab Dis 1986;9-398:Gentamycine 80 µg/ml + Kanamycine 100µg/ml + Spectinomycine 80 µg/ml + Tylocine 80µg/ ml

FORMULE M 4 : "Chang"
Chang D Flacon de 500ml
Pénicilline streptomycine: 120 UI/ml ;120 µg/ml
Amphotéricine B : 1µg/ ml
Préparation réalisée directement dans le flacon de Chang D du commerce.

FORMULE M 4 U: "Chang Uridine"
Idem FORMULE 4 + Uridine 50 mg/l

ANNEXE 2

FORMULE M 4 PAV : "Chang PAV"

Idem FORMULE 4 + Amiklin 12.5µg/ml + Vancocine 4 µg/ml

FORMULE M 4 GEKST : "Chang GEKST"

Idem FORMULE 4 + Gentamycine 8 µg/ml + Kanamycine 50µg/ml + Tylocine 40µg/ ml

Concentrations préconisées dans la publication de Van Diggelen et Niermeijer « Elimination of mycoplasmas from infected cell culture by combined trypsin/antibiotics treatment » J Inherit Metab Dis 1986;9-398:Gentamycine 80 µg/ml + Kanamycine 100µg/ml + Spectinomycine 80 µg/ml + Tylocine 80µg/ ml

FORMULE M 5 : HAM F10_DMSO

Ham F 10 pur.+ 4% Diméthyl sulfoxyde DMSO

Milieu de congélation à préparer stérilement et extemporanément en quantité nécessaire pour le nombre d'ampoules n à congeler (soit n x 3 ml)

Préparation réalisée dans un flacon T 25 ou T75.

FORMULE M 6 :199

Milieu 199 sans vitamine B6 concentré 10 fois

Diluer la solution mère au 1/10è : 10 ml dans 90 ml d'eau PPI

Pour 100 ml de milieu dilué ajouter

Bicarbonate de sodium à 7% : 1,6 ml (concentration finale : 120 mg pour 100 ml)

Sérum de veau fœtal (lot en cours) : 12 ml

Pénicilline streptomycine 120 UI/ml ;120 µg/ml

Amphotéricine B: 1µg/ ml

Préparation réalisée dans un flacon T75.

FORMULE M 7 : MEM

MEM Eagle (Modifié) avec sels de Earle, avec glutamine, sans bicarbonate de sodium poudre

Pour 100 ml de milieu final:

MEM : 0,97 g

Eau PPI : 100 ml

Après dissolution et filtration (0,22 µ) ajouter :

Bicarbonate de sodium (7,5%) : 1,66 ml

Sérum de veau fœtal (lot en cours) : 1 ml

Pénicilline streptomycine 120 UI/ml ;120 µg/ml

Amphotéricine B: 1µg/ ml

Préparation réalisée dans un flacon T75.

FORMULE M 8 : Kératinocyte-SFM

Milieu Kératinocyte-SFM 500ml

Facteur de croissance épidermique 1 53 100µl

Extrait de glande pituitaire bovine PBE : 2,5ml

Pénicilline streptomycine: 120 UI/ml ;120 µg/ml

Amphotéricine B: 1 µg/ ml

Préparation réalisée directement dans le flacon du commerce.

FORMULE M 9 : Amniomax

Milieu de base AmnioMax C 100 450ml

Complément AmnioMax C 100 75ml

Amphotéricine B: 1 µg/ ml

ANNEXE 2

Préparation réalisée directement dans le flacon du commerce.

FORMULE M 10 :12% RPMI

RPMI 1640 500ml

Sérum de veau fœtal : 60ml

Pénicilline streptomycine: 120 UI/ml ;120 µg/ml

Amphotéricine B : 1µg/ml

Préparation réalisée directement dans le flacon du commerce.

FORMULE M11: RPMI DMSO

RPMI 1640

Sérum de veau fœtal: 20%

Diméthyl sulfoxyde: 10%

Milieu de congélation à préparer stérilement et extemporanément en quantité nécessaire pour le nombre d'ampoules n à congeler (soit n x 3 ml)

Préparation réalisée dans un flacon T 25 ou T75.

FORMULE M12 :

Proposition 3 :

Préparation de la ciclosporine (CSA) (SIGMA ref C3662)

Préparation de la CSA à 1 mg/ml :

- Dissoudre les 5 mg de CSA dans 500 µl d'éthanol absolu.

- Ajouter 100 µL de Tween-80 (Polyoxyéthylène sorbitanne monoléate - Sigma n° P-1754).

- Agiter fortement.

- Ajouter goutte-à-goutte 4,4 mL de RPMI-1640 en agitant constamment : le volume final est donc de 5 mL.

- Filtrer sur filtre millipore à usage unique de 0,22 µm (en humidifiant au préalable le filtre avec du RPMI).

La solution de 1 mg/ml est stockée à -20°C ou -80°C.

Les dilutions successives de la CSA sont réalisées avec du RPMI-1640.

Diluer la solution mère de CSA au 1/100e soit 1ml de CSA à 1 mg/mL + 99 mL de RPMI.

On obtient une solution à 10 µg/mL à répartir à raison de 0,5 mL/ ampoule prêtes à l'emploi pour immortalisation ou sous un plus gros volume selon convenance. Cette solution peut être conservée à -20°C ou à 4°C pendant 4 mois.

En réalité, la solution de 1 mg.mL⁻¹ est aliquotée en 5 ampoules de 1 mL (la 5^{ème} contient parfois moins de 1 mL, c'est un détail à prendre en forte considération). Ces ampoules sont décongelées lorsqu'il y a besoin. Ces ampoules, lorsqu'elles sont décongelées, sont diluées au 1/100, puis aliquotées, et recongelées ou utilisées selon le besoin.

Le fabricant Sigma Aldrich précise que la Cyclosporine en poudre se conserve entre 2 et 8°C, et doit se manipuler de façon à éviter toute projection sur la peau, les yeux, et les muqueuses.

5. CONTROLE DE STERILITE (milieux de routine)

Travailler sous hotte à flux laminaire

Après avoir préparé les différents milieux pour la semaine suivante, affecter un numéro à chaque flacon.

Préparer une série de tubes stériles, les numéroter

Prélever un aliquote de 5 ml de chaque flacon et le transférer dans le tube portant le même numéro

Mettre à l'étuve à 37° C pendant 48 ou 72 H

Après ce délai vérifier l'absence de contamination bactérienne ou fongique en contrôlant la limpidité et la couleur des milieux. Ils doivent être parfaitement clairs et rose-orangés.

ANNEXE 3

Isolement des lymphocytes et cryopréservation

1. MATERIEL ET REACTIFS

1 1 Matériel

Tubes à centrifuger de 15ml.stériles.

Cryotubes 1.8ml

Pipette pasteur pointe ouverte stérile.

Pipette pasteur pointe ouverte cotonnée stérile.

Pipette 10ml.

Seringue stérile de 10ml avec aiguille stérile.

Pipetboy électrique.

Gants.

1 2 Réactifs

Milieu de culture: RPMI.pur et RPMI DMSO Formule M11

Sérum de veau

Ficoll stérile.

Alcool iodé.

2. MODE OPERATOIRE

Les opérations suivantes s'effectuent sous hotte à flux laminaire : Pr HS 01/IN02 Travail sous hotte à flux laminaire.

Echantillon de sang périphérique prélevé sur EDTA potassique.

2 1 Séparation des lymphocytes sur ficoll

** Dilution au 1/2 du sang périphérique*

A l'aide d'une pipette de 10ml, répartir 4ml de RPMI pur dans un tube à centrifuger stérile de 15ml.

Bien mélanger l'échantillon de sang, ouvrir le tube avec des gants puis en verser 4ml dans le tube à centrifuger contenant le RPMI.

Bien homogénéiser par retournement.

**Dépôt sur ficoll et centrifugation*

Désinfecter le bouchon du ficoll à l'alcool iodé.

Prélever 7ml de ficoll à l'aide d'une seringue de 10ml stérile puis les déposer dans un nouveau tube à centrifuger stérile de 15ml.

Avec une pipette de 10ml, déposer délicatement à la surface du ficoll 7ml de sang préalablement dilué au 1/2.

Lors de cette étape, prendre soin de ne pas mélanger les deux phases sang et ficoll.

Centrifuger 20 minutes à 600g.

2 2 Récupération des lymphocytes et lavage

**Récupération des lymphocytes*

A l'aide d'une pipette pasteur cotonnée stérile et du pipetboy électrique, prélever l'anneau central blanc (contenant les lymphocytes et les monocytes). Déposer les cellules dans un nouveau tube à centrifuger stérile de 15ml.

Ajouter 6 à 10ml de RPMI pur selon la contamination apparente en ficoll.

Centrifuger 10 minutes à 1500 rpm.

Eliminer le surnageant avec une pipette stérile et la trompe à aspiration.

**Lavage des lymphocytes*

Re-suspendre le culot dans 2 à 3ml de RPMI pur.

Centrifuger 10 minutes à 1500 tours minute.

Recommencer l'opération si la contamination par le ficoll semble importante.

2 3 Cryopréservation

Re-suspendre le culot dans 1ml de milieu M11 et déposer dans un cryotube.

Placer l'ampoule dans les vapeurs d'azote pendant 3 heures puis dans l'azote liquide.

Remarque importante: *Inscrire à chaque étape les opérations effectuées ainsi que les caractéristiques des milieux utilisés (nature, date de fabrication) et des cellules sur les fiches de culture.*

ANNEXE 4

Production de virus d'Epstein barr

1. MATERIEL ET REACTIFS

1.1 Matériel

- gants
- flacons T25, T75 et T175
- pipettes de 10 mL
- propipette électrique
- pipettes Pasteur pointe ouverte cotonnées stériles
- centrifugeuse
- cryotubes
- tubes à centrifuger de 50 mL
- tubes à centrifuger de 15 mL
- filtres (casseroles) de 45 µm
- bain marie à 40°C

1.2 Réactifs

- RPMI-1640
- Sérum de veau fœtal
- Gentamicine
- DMSO

2. MODE OPERATOIRE

Les opérations suivantes sont à réaliser sous hotte à flux laminaire avec

2.1 Préparation du milieu de culture

Milieu de culture formule M11 : Pr BC 02 / IN 01 Préparation des milieux de culture :

RPMI 1640 : 500 mL

Sérum de veau fœtal : 60 mL

Gentamicine 0,1mg/L (ou Pénicilline streptomycine : 120 UI/mL ; 120 µg/mL)

Pour la congélation ajouter 10% de DMSO

2.2 Mise en culture des cellules de la lignée B95-8

Préparer un bain marie à 40°C.

Préparer un tube à centrifuger contenant 10 mL de milieu de culture.

Sortir une ampoule de cellules B95-8 (du conteneur à azote liquide ou du congélateur à -80°C) et la plonger directement dans le bain-marie à 40°C (température finale 37°C)

Maintenir le cryotube dans l'eau chaude sans l'immerger complètement (joint du bouchon hors de l'eau)

Récupérer la suspension cellulaire à l'aide d'une pipette Pasteur cotonnée stérile et effectuer un lavage des cellules pour éliminer le DMSO en les centrifugeant dans les 10 mL de milieu de culture pendant 10 minutes à 250 g soit 1500 tpm sur la centrifugeuse SV8 (programme 1)

Éliminer le surnageant par retournement puis remettre les cellules en suspension dans 5 mL de milieu de culture.

Mettre cette suspension dans un T25.

Placer dans l'incubateur en position horizontale.

2.3 Entretien de la lignée B95-8

Les cellules de la lignée B95-8 poussent en suspension sous forme de cellules isolées ou en amas. Au bout de quelques temps après la remise en culture, certaines cellules adhèrent au fond du flacon ce qui signe une bonne viabilité de la lignée.

La concentration cellulaire doit être maintenue aux alentours de 1.10^6 /mL.

Rajouter du milieu de culture 1 à 2 fois par semaine suivant la vitesse de croissance de la lignée, lorsque le surnageant a viré au jaune et qu'il y a une forte densité cellulaire avec de nombreux amas.

Lors du passage dans un flacon de taille supérieure les cellules adhérentes peuvent être détachées simplement en tapant sur le flacon ou en utilisant de la trypsine EDTA à 0,25%.

2.4 Production de l'EBV

Expandre la lignée jusqu'à obtenir 100 mL de surnageant avec les cellules en phase exponentielle de croissance.

Récupérer la suspension cellulaire dans des tubes à centrifuger de 50 mL.

Centrifuger à 200 g (soit 1300 tpm sur la centrifugeuse SV8) pendant 15 minutes à 20°C. (programme 7)

Le surnageant contient le virus d'Epstein Barr. Le culot cellulaire peut être remis en culture ou cryopréservé.

Décantier le surnageant dans un autre tube et le centrifuger à 800 g (soit 2700 tpm) pendant 4 minutes à 4°C (programme 8)

Filtrer le surnageant dans des filtres de 0,45µm

ANNEXE 4

Aliquoter sous forme d'ampoules de 1,5 mL et congeler à une température inférieure à -70°C (congélateur à -80°C ou dans l'azote liquide).

2.5 Congélation des cellules B95-8

Travailler dans la glace.

Remettre en suspension le culot cellulaire dans du milieu M11 contenant 10% de DMSO, à raison de 5 à $10 \cdot 10^6$ cellules/mL.

Aliquoter sous forme d'ampoules de 1 mL.

Placer les ampoules dans les vapeurs d'azote liquide. Après 3 heures, plonger les ampoules dans l'azote liquide.

ANNEXE 5

Immortalisation des lymphocytes

1. MATERIEL ET REACTIFS

1.1 Matériel

flacon T25

pipettes

1.2 Réactifs

Cellules mononucléées isolées selon la procédure IN11/BC02

Ciclosporine (CSA)

Milieu de culture formule M10 : Pr BC 02 / IN 01 Préparation des milieux de culture

Virus d'Epstein Barr : Pr BC 02 / IN 14 Production de virus d'Epstein Barr

2. MODE OPERATOIRE

2.1 Immortalisation des lymphocytes

Remettre en suspension les cellules mononucléées isolées du sang périphérique dans du milieu M10.

Pour 5 à 6 mL de sang au départ, remettre en suspension dans 3 à 4 mL de M10. Ajouter 500 µL de CSA et 500 µL d'EBV (à adapter en fonction du pouvoir infectieux du virus)

Transférer le tout dans un flacon T25.

Incuber en position verticale.

2.2 Culture des lymphocytes immortalisés (lymphoblastes)

Pendant 1 à 2 semaines, c'est-à-dire jusqu'à immortalisation franche des lymphocytes, ne pas rajouter de milieu à la culture.

Observer les flacons tous les 4 jours.

Rajouter de la CSA tous les 4 jours pendant environ 2 semaines.

Après apparition franche des rosettes, ajouter 0,5 à 1 mL de milieu de culture.

Examiner les cultures tous les 3-4 jours.

Quand le milieu vire au jaune et que les rosettes deviennent plus grandes et plus nombreuses, ajouter 3 mL de milieu. La fois suivante ajouter 5 mL de milieu.

Quand le volume de milieu est de ~ 12 à 15 mL et a viré au jaune, transférer la culture dans un flacon T75 contenant 10 mL de milieu neuf (ou séparer la culture en 2 T25)

Continuer à rajouter du milieu neuf tous les 3-4 jours (quand les cultures ont viré au jaune) jusqu'à atteindre un volume de 50 mL.

Les cellules sont alors prêtes à être congelées.

Pour préparer un culot cellulaire pour la préparation d'ADN, cultiver les cellules jusqu'à un volume de culture de 60-70 mL.

2.3 Cryopréservation

suivre : IN08/PrBC03

Remarque importante: Inscrire à chaque étape les opérations effectuées ainsi que les caractéristiques des milieux utilisés (nature, date de fabrication) et des cellules sur les fiches de culture.

ANNEXE 6

La culture des lignées lymphoblastoïdes

Le principe de la culture consiste à protéger les cellules immortalisées de l'action des lymphocytes T. Ainsi le nombre de clusters s'amplifie, jusqu'à obtenir une quantité de matériel suffisante pour la cryopréservation.

2.2 Culture des lymphocytes immortalisés (lymphoblastes)

Pendant 1 à 2 semaines, c'est-à-dire jusqu'à immortalisation franche des lymphocytes, ne pas rajouter de milieu à la culture.

Observer les flacons tous les 4 jours.

Rajouter de la CSA tous les 4 jours pendant environ 2 semaines.

Après apparition franche des rosettes, ajouter 0,5 à 1 mL de milieu de culture.

Examiner les cultures tous les 3-4 jours.

Quand le milieu vire au jaune et que les rosettes deviennent plus grandes et plus nombreuses, ajouter 3 mL de milieu. La fois suivante ajouter 5 mL de milieu.

Quand le volume de milieu est de ~ 12 à 15 mL et a viré au jaune, transférer la culture dans un flacon T75 contenant 10 mL de milieu neuf (ou séparer la culture en 2 T25)

Continuer à rajouter du milieu neuf tous les 3-4 jours (quand les cultures ont viré au jaune) jusqu'à atteindre un volume de 50 mL.

Les cellules sont alors prêtes à être congelées.

Pour préparer un culot cellulaire pour la préparation d'ADN, cultiver les cellules jusqu'à un volume de culture de 60-70 mL.

Ce protocole n'est plus du tout d'actualité au Centre de Biotechnologie Cellulaire.

La Cyclosporine A est ajoutée deux fois après la mise en culture. La pratique de l'ajouter à 4 jours d'intervalle a été respectée jusqu'à récemment, depuis la tendance est d'ajouter la cyclosporine A chaque semaine. Cette pratique est validée par d'autres travaux : Oh (2003), Heidemarie (2006).

Le planning est réalisé une fois par semaine, c'est pourquoi l'observation n'est réalisée qu'une fois par semaine également.

L'observation de la couleur du milieu et de l'aspect des clusters reste invariable : selon l'interprétation qui en est faite, trois ajouts successifs de milieu sont réalisés : 1, puis 3 puis 6 mL sont ajoutés lors des plannings hebdomadaires. Le dernier ajout consiste à ajuster le milieu à 25 mL. Lors du planning suivant, il est décidé de cryopréserver les cellules.

ANNEXE 7

PHARMACIE DE L'HOPITAL DEBROUSSE

HCL		GBEA
Pharmacie Debrousse	INSTRUCTIONS POUR LE DOSAGE PLASMATIQUE DU GANCICLOVIR PAR HPLC	Type : Procédure
		Page : 1+ 10
		Date : 11/11/97
		Actual: 31/12/99
		Nb de copie : 1

	Rédigée par	Actualisée par
Nom	Philippe BAROU	Nathalie Bleyzac
Fonction	Interne en Pharmacie	Assistant spécialiste
Signature		

Documents liés	Enregistrement
Procédure (1+ 7 pages)	

Opérateurs			Opérateurs		
Nom	Date	Signature	Nom	Date	Signature

PLAN

I- PRINCIPE

II- PRELEVEMENTS SANGUINS

III- MATERIEL ET REACTIFS

IV- PREPARATION DE LA PHASE MOBILE

IV- PREPARATION DE LA SOLUTION MERE DE GANCICLOVIR

V- REALISATION DES DOSAGES

VI- ARCHIVAGE DES RESULTATS

ANNEXE 7

Se reporter également aux procédures générales du laboratoire (classeur rouge), chapitre HPLC

I- PRINCIPE

Le dosage plasmatique du ganciclovir est réalisé par chromatographie en phase liquide inverse, sans étalonnage interne, une gamme d'étalonnage en 3 points et un point de contrôle.

Utiliser la chaîne HPLC située en face du COBAS.

II- PRELEVEMENTS SANGUINS

Les prélèvements de sang sont effectués par ponction veineuse (cathéter périphérique) ou cathéter central, sur des tubes héparinés (tubes à bouchon vert). Un minimum de 500 µl de sang est nécessaire

Les concentrations du ganciclovir ne sont **pas stables** dans les échantillons sanguins

- ☛ les prélèvements doivent être immédiatement mis **dans la glace**
- ☛ les tubes doivent être centrifugés **immédiatement** à +4 °C
- ☛ si le prélèvement ne doit pas être dosé tout de suite, congeler le plasma à -20°C

III- MATERIEL ET REACTIFS

III-1- Matériel

- pHmètre
- tubes à hémolyse en verre (stock magasin)
- un portoir
- colonne HYPERSIL ODS 15 cm x 4.6 mm, granulométrie 3 µm (placard "stockage réactifs zone A" ou montée sur chaîne HPLC)
- un vortex
- une pipette automatique de 1000 µl et une de 200 µl
- cônes pour pipette bleus et jaunes
- un chronomètre
- godets verre pour injecteur (tiroir du bas du placard "LIMULUS" (si injecteur automatique) ou une seringue Hamilton de 100 µl (si injections manuelles)

III-2- Réactifs

Se reporter si besoin à la liste des lieux de stockage des réactifs dans le classeur rouge (procédures générales du laboratoire)

- [- acide perchlorique à 35% 35g → 100ml
- potassium dihydrogénophosphate (KH₂PO₄)
- Lyotrol N Biomérieux (sérum de contrôle à reconstituer avec 5 ml d'eau stérile).

- solution mère d'aciclovir à 100 mg/l au congélateur. Jeter les solutions après chaque utilisation (un tube par manip).

III- PREPARATION DE LA PHASE MOBILE

La phase mobile se fait extemporanément pour chaque manip.

La phase mobile est constituée de **tampon phosphate de potassium 0.02 mmol/l, pH 3.50**.

Peser 2.72 g de KH₂PO₄ pour 1 litre de phase mobile. Transférer dans une fiole jaugée et compléter avec de l'eau VERSOL. Mélanger jusqu'à dissolution complète. Transvaser dans un bécher d'1 litre.

Ajuster le pH à 3.50 avec de l'acide orthophosphorique. Se reporter aux instructions d'utilisation du pHmètre dans le classeur **procédures générales du laboratoire (classeur rouge)** Transvaser la phase mobile dans un flacon d'1 litre, l'étiqueter et noter la date de fabrication.

Faire dégazer 10 mn aux ultrasons.

IV- PREPARATION DE LA SOLUTION MERE DE GANCICLOVIR

Prendre un flacon de CYMEVAN injectable 500 mg dans le stock pharmacie. Le signaler aux préparateurs en leur indiquant le service demandeur du dosage pour la sortie comptable.

Reconstituer le flacon avec 10 ml d'eau PPI. Utiliser une **pipette 2 traits**. Bien dissoudre la poudre.

Prélever 100 µl de CYMEVAN reconstitué et les mettre dans une fiole jaugée à 50 ml (embout pipette contre paroi fiole).

Compléter à 50 ml avec de l'eau VERSOL et bien mélanger.

Aliquoter dans des 10 tubes en verre (2 ml par tube) et congeler à -20°C, en notant la date de fabrication.

Durée de conservation: 1 mois maximum à -20°C

V- REALISATION DES DOSAGES

V-1- Opérations préliminaires

- 1) Se munir d'une feuille de travail (tiroir bureau COBAS)
- 2) Monter la **colonne** (si elle n'est pas déjà en place), en respectant le sens du flux: boucle → détecteur (clés derrière la chaîne HPLC dans plateau plastique ou caisse à outils bureau HC)
- 3) **Programmation et mise en route de la chaîne HPLC**

☞ Détecteur:

Mettre en route au moins 30 minutes avant le début de la manip.

Régler la longueur d'onde à 254 nm.

☞ Pompe:

Mettre le flacon de phase mobile et boucher hermétiquement avec du parafilm.

Si la chaîne n'a pas servi depuis longtemps, il faut purger le système en dévissant sous le tube provenant de la phase mobile. Purger ensuite avant la vanne en dévissant, tirant sur la seringue jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de bulle et revissant sans lâcher le piston de la seringue (pour éviter que les bulles reviennent dans la tubulure).

Appuyer sur le bouton "PUMP ON"

Attention à ne pas dépasser 300 bars: pour cela, régler la sécurité sur 300 bars ("pressure upper limit").

Commencer à équilibrer la colonne avec la phase mobile en augmentant progressivement (de 0.2 ml/min en 0.2 ml/min) le débit à **1.5 ml/min**

Il faut environ 1H30 pour équilibrer la colonne

☞ Injecteur SIL 9A (éventuellement)

Allumer l'injecteur

Vérifier qu'il y a du mélange méthanol/eau (50/50;v/v) dans le flacon de rinçage à droite de l'injecteur. Vérifier que les tuyaux de poubelle sont bien scotchés et que l'écoulement est correct.

Vérifier que les poubelles sont vides (attention 2 poubelles).

Faire 1 ou 2 purges: taper "FUNCTION" "2" "ENTER"

Entrer le programme des injections (injecteur):

FUNCTION 0 ENTER

FROM : mettre numéro du premier échantillon (attention le premier est zéro)

TO: mettre numéro du dernier échantillon

INJ VOL: volume d'injection: **20 µl**

REP nombre d'injections d'un même échantillon, mettre **1**

RUN TIME : temps entre les injections, mettre **20 mn**

☞ Intégrateur

- Mettre en route l'intégrateur

- Connecter l'intégrateur à l'injecteur automatique, le cas échéant, en tapant sur l'intégrateur:

OPEN

SHIFT DOWN + (T + R + S)

SPACE

1

ENTER

Il doit y avoir émission d'un bip sonore.

- Mettre le slope à 1000 (angle minimum pour détection d'un pic):

"SLOPE" "1000" "ENTER"

On peut faire une recherche avec "SHIFT DOWN" et « plot » et zéro, pour arrêter refaire "shift down" "plot"

- Programmer l'arrêt du chromatogramme au bout de 13 minutes:

"STOP TM" "15" "ENTER"

ANNEXE 7

- Faire le zéro (touche "ZERO"), après avoir appuyé sur la touche zéro du détecteur, quand la colonne est équilibrée.

- Programmer l'enregistrement des chromatogrammes

"A SAVE" (taper sur "CTRL" et "PRINT" en même temps).

"0" ", " (par SHIFT DOWN) "30" (nombre de chromatogrammes à enregistrer)

"ENTER"

Pour ressortir un graphe, faire "ANAL" et le numéro du chromatogramme.

Si besoin on peut modifier l'atténuation : Utiliser la touche ATTEN. (on travaille à 4)

4) Reconstituer 1 Lyotrol N Biomérieux avec 5 ml d'eau stérile chacun (pipette verre).

5) Mettre sur la paillasse:

- le chronomètre
- le vortex
- les pipettes automatiques et embouts
- un tube de solution d'aciclovir à 100 mg/l
- des tubes à hémolyse en verre
- le Lyotrol reconstitué
- 1 flacon d'acide perchlorique à 35%

V-2- Préparation de la gamme, du contrôle et des échantillons

1) Préparation de la gamme et du contrôle

Concentration (mg/l)	1	5	20	Contrôle (10)
Solution de ganciclovir à 100 mg/l (μ)	10	50	200	100
Lyotrol (μ l)	990	950	800	900

Vortexer

Reprendre 500 μ l précisément de **chaque point** et mettre dans des tubes verre identifiés. Prendre aussi 500 μ l de chaque **échantillon**. Traiter les échantillons **en double**.

Rmq: si le volume de l'échantillon est insuffisant, utiliser 250 μ l seulement, y compris pour la gamme.

2) Déprotéinisation

Déprotéiniser les échantillons et la gamme en ajoutant 50 μ l d'acide perchlorique à 35% (ou 25 μ l si la prise d'essai est de 250 μ l) Vortexer pendant 1 minute exactement.

3) Centrifugation

Centrifuger les tubes pendant 15 minutes à +4°C., à 3000 trs/min

on a 3,5g/100 (car au 110)

V-3- Injections

Injecter le surnageant après l'avoir délicatement recueilli.

Si l'injecteur automatique est utilisé, mettre l'ensemble de chaque échantillon dans un godet en verre pour injecteur automatique Shimadzu, boucher hermétiquement (joint bleu) et identifier chaque godet. Disposer les godets sur le porte échantillon. Le premier échantillon a le numéro zéro. Vérifier la programmation de l'injecteur.

Placer le porte échantillon, vérifier le zéro: refaire le zéro sur le détecteur puis faire "zéro" et "enter" sur l'intégrateur. Puis, appuyer sur "START" au niveau de l'injecteur. Prévoir de dérouler le papier car le dérouleur ne marche plus.

Si l'injection est manuelle, placer la vanne Rhéodyne en position LOAD. Remplir la seringue de surnageant (au moins 70 µl) en ayant soin de supprimer toutes les bulles. Charger la boucle de la vanne. Placer la vanne sur la position INJECT et appuyer sur "START" au niveau de l'intégrateur. Rincer la boucle avant chaque nouvelle injection.

V-4- Calcul et validation des résultats

Le temps de rétention de l'aciclovir est d'environ 7 minutes

- 1) Reporter les hauteurs (Rh) du pic d'aciclovir (valeurs suivies de "hi" sur le chromatogramme) de la gamme, du contrôle et des échantillons sur la feuille de travail.
- 2) Calculer le coefficient de corrélation de la gamme (droite $R_h = f(\text{concentration})$) et les concentrations

⇒ avec une calculatrice CASIO fx-180P:

shift	AC	mode	2	
0	[(---	0	RUN	
1	[(---	valeur Hi point 1		RUN
5	[(---	valeur Hi point 5		RUN
20	[(---	valeur Hi point 20		RUN

shift 9. La valeur du coefficient de corrélation s'affiche alors

Pour calculer les concentrations: rentrer la valeur Hi ,
 puis SHIFT ---]
 la valeur de concentration correspondante s'affiche alors.

⇒ Validation

La valeur des H doit se trouver dans les limites indiquées sur la feuille de travail.

La valeur du coefficient de corrélation doit être supérieure à 0.990.

Dans le cas contraire, injecter à nouveau les points de gamme.

La valeur de la concentration du point de contrôle doit être de $10 \text{ mg/l} \pm 10\%$

ANNEXE 7

La limite de détection de la technique est 0.02 µg/ml. Tout résultat inférieur ou nul doit être rendu "0.02 µg/ml".

20 ng/ml

- 3) Remplir la feuille de travail et y agraffer les chromatogrammes
- 4) Les résultats (exprimés en µg/ml) ne sont pas rendus directement au service. Un compte rendu avec évaluation des paramètres pharmacocinétiques et adaptation de la posologie de ganciclovir est rédigé et envoyé au prescripteur.

VI- ARCHIVAGE DES RESULTATS

Les feuilles de travail et les chromatogrammes doivent être rangés dans le classeur bleu "RESULTATS DOSAGES HPLC"

Périodiquement, et au moins une fois par an, les résultats contenus dans le classeur vert doivent être mis par catégories dans une enveloppe grand format (où il sera noté les dates et molécule dosée). Ces enveloppes sont ensuite intégrées aux boîtes à archives des dosages du laboratoire (à côté du Cobas).

La durée d'archivage des résultats est de 5 ans.

ANNEXE 8

PROTOCOLE GANCICLOVIR / Essais finaux toxicité + efficacité JUILLET 2008

Objectifs :

- Détermination de la relation GCV/toxicité cellulaire, indépendamment de l'infection par le CMV (cellules lymphoblastoïdes non infectées CMV)
- Détermination de l'efficacité GCV/charge virale CMV sur cellules lymphoblastoïdes infectées (charge infectieuse unique déterminée avant essai d'après résultats essais janvier 2008) **on aura l'évaluation de la toxicité globale CMV + GCV**
- **Par différence évaluation de la toxicité due au CMV**
- Cultures de 2 souches de cellules lymphoblastoïdes ???
- Numération (coulter et adam), viabilité, PCR (cellules infectées), apoptose (cellules infectées et non infectées) pour les différents temps d'expo au GCV : 1, 2, 7 et 14 jours .
- dosage intracellulaire du dérivé triP du GCV
- Préparation d'échantillons supplémentaires (GCV à 1 et 10 mg/L - durée d'exposition 2 jours) pour optimisation technique de dosage HPLC/MS (récupérer une quantité importante de cellules de manière à disposer de matériel cellulaire en quantité suffisante pour optimisation méthode)

→ Incubation des cellules lymphoblastoïdes infectées et non infectées à différentes concentrations de GCV : 0, 1, 5, 10, et 20 mg/L pendant 1, 2, 7 et 14 jours

La culture cellulaire est poursuivie 14 jours indépendamment de la durée d'exposition au GCV.

Matériels et méthodes

Lignée cellulaire lymphoblastoïde : 1 lignée cellulaire lymphoblastoïde humaine (transformée par l'EBV) est cultivée en suspension dans le milieu RPMI 1640 supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal, à 37°C, atmosphère 5% de CO₂.

Ganciclovir :

Préparation de la solution de ganciclovir : Peser 4 * 10 mg de ganciclovir. Mettre dans un flacon. Reprise par 10 ml de l'eau ppi 0,9%. Cette solution à 1 mg/ml sera ensuite **filtrée** puis diluée pour obtenir les concentrations à 1, 5, 10 et 20 mg/L dans le milieu de culture.

ANNEXE 8

Protocole

- Préparation de la suspension cellulaire lymphoblastoïde

- Chaque souche est remise en suspension et les cellules des clusters sont dissociées par aspiration/refoulement à l'aide d'une pipette pasteur stérile.

- Après numération, les cellules lymphoblastoïdes cultivées sont réparties **en**

- 2 flacons de 450 ml (à environ 10^6 cel/ml) POUR LES ESSAIS

- 2 flacons de 200 ml (à environ 10^6 cel/ml) POUR LE POOL DOSAGE HPLC

- Infection par le CMV

CMV AD69 : souche préparée sur cellules MRC5 à un titre de environ 10^9 pfu/ml (contrôle du titre en a posteriori)

10^7 cellules lymphoblastoïdes en suspension dans 1ml de milieu RPMI 1640 sont infectées par le CMV à **0,01 pfu/cellule**.

Les cellules sont concentrées 10 fois:

- 2 flacons de 45 ml
- 2 flacons de 20 ml

L'infection est réalisée sur 1 flacon de 45 ml et 1 flacon de 20 ml (les 2 autres flacons ne sont pas infectés mais sont traités de la même manière)

Les cellules sont infectées pendant **2 heures à 37°C avec agitation fréquente (TOCCI et JEOR, 1979 ; SUN et al., 1999)**. Après adsorption du virus, les cellules sont lavées trois fois et remises en suspension dans du RPMI 1640, à une concentration de environ 10^6 cellules/ml (dans 450ml) et réparties dans des flacons de 20 ml (40)

En plus, pour le pool (dosage HPLC), répartition dans 6 flacons de 50 ml à 10^6 cellules /ml (CMV⁺GCV0, CMV⁺GCV1 et CMV⁺GCV10 ; CMV⁻GCV0, CMV⁻GCV1 et CMV⁻GCV10)

Attention : pour les calculs du volume de virus à ajouter dans les flacons à 10^7 cellules /ml :

Le virus récolté est à environ 10^9 copies/ml

Dilution au 1/10 pour avoir 10^8 copies/ml (solA) puis dépend du volume dans lequel on l'ajoute (la concentration cellulaire étant fixée à 10^7 cel/ml)

Si volume de 5 ml : prélever 5 µl de solA

Si volume de 10 ml : prélever 10 µl de solA

Si volume de 15 ml : prélever 15 µl de solA

Si volume de 20 ml : prélever 20 µl de solA

Si volume de 25 ml : prélever 25 µl de solA

Si volume de 30 ml : prélever 30 µl de solA

Si volume de 35 ml : prélever 35 µl de solA

Si volume de 40 ml : prélever 40 µl de solA

Si volume de 45 ml : prélever 45 µl de solA

Si volume de 50 ml : prélever 50 µl de solA

- Incubation avec le GCV

ANNEXE 8

40 flacons comme suit :

- ***Non infectés par le CMV*** (20 flacons)

- 4 GCV 0 mg/L (incubations 1, 2, 7, 14 jours)

- 4 GCV 1 mg/L (incubations 1, 2, 7, 14 jours)

soit 20 µl de solution GCV à 1mg/ml dans 20 ml de suspension cellulaire

- 4 GCV 5 mg/L (incubations 1, 2, 7, 14 jours)

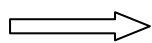
100 µl de solution GCV à 1mg/ml dans 20 ml de suspension cellulaire

- 4 GCV 10 mg/L (incubations 1, 2, 7, 14 jours)

200 µl de solution GCV à 1mg/ml dans 20 ml de suspension cellulaire

- 4 GCV 20 mg/L (incubations 1, 2, 7, 14 jours)

400 µl de solution GCV à 1mg/ml dans 20 ml de suspension cellulaire



20 flacons par souche non infectée par le CMV

- ***Infectés par le CMV*** (20 flacons)

Le ganciclovir est ajouté juste après le lavage des cellules infectées (comme pour les cellules non infectées qui sont traitées exactement de la même manière).

- 4 GCV 0 mg/L (incubations 1, 2, 7, 14 jours)

- 4 GCV 1 mg/L (incubations 1, 2, 7, 14 jours)

20 µl de solution GCV à 1mg/ml dans 20 ml de suspension cellulaire

- 4 GCV 5 mg/L (incubations 1, 2, 7, 14 jours)

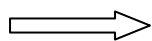
100 µl de solution GCV à 1mg/ml dans 20 ml de suspension cellulaire

- 4 GCV 10 mg/L (incubations 1, 2, 7, 14 jours)

200 µl de solution GCV à 1mg/ml dans 20 ml de suspension cellulaire

- 4 GCV 20 mg/L (incubations 1, 2, 7, 14 jours)

400 µl de solution GCV à 1mg/ml dans 20 ml de suspension cellulaire



20 flacons par souche infectée par le CMV

ANNEXE 8

En plus

- 3 flacons pour optimisation dosage HPLC/MS (expositions pendant 48 heures GCV0 ; GCV 1 ; GCV10) L'objectif est d'avoir le plus de matériel cellulaire possible cellules non infectées : 5×10^7 pour chaque point de concentration

- 3 flacons pour optimisation dosage HPLC/MS (expositions pendant 48 heures GCV0 ; GCV 1 ; GCV10) L'objectif est d'avoir le plus de matériel cellulaire possible cellules infectées par le CMV : 5×10^7 pour chaque point de concentration

Attention : 50 ml par flacon donc prendre les volumes de solution de GCV (1mg/ml) suivants :

- GCV 1 mg/L

50 µl de solution GCV à 1mg/ml dans 50 ml de suspension cellulaire

- GCV 10 mg/L

500 µl de solution GCV à 1mg/ml dans 50 ml de suspension cellulaire

- *Numération et viabilité des cellules à J0, J1, J2, J7 et J14 et observation microscopique*

Si nbre de cellules suffisant (plutôt à partir de J7 d'après dernier essai mai 2008 pour la viabilité)

- *PCR sur cellules infectées à J0, J1, J2, J7 et J14*

- *Mesure d'apoptose sur cellules infectées et non infectées à J0, J1, J2, J7 et J14*

- *Prélèvements pour dosages HPLC à J2*

Penser à changer le milieu à J7 et rajouter du GCV dans tous les flacons de la série 4 (exposition 14 jours)

ANNEXE 8

A J0 :

Effectuer la numération +viabilité après infection et remise en suspension (avant ajout duGCV) sur :

CMV + : 450 ML

CMV - : 450 ML

CMV + : 200 ML

CMV - : 200 ML

Effectuer la PCR sur :

CMV + : 450 ML

CMV + : 200 ML

Effectuer l'apoptose sur

CMV + : 450 ML

CMV - : 450 ML

CMV + : 200 ML

CMV - : 200 ML

Cf pages suivantes plan d'analyse à partir de J1

ANNEXE 8

Analyses extemporanées

Procédure pour préparation de l'échantillon en vue de la numération compteur Coulter
Prélever 200 µL de la suspension cellulaire, diluer dans 20ml (19,8 ml d'ISOTON)

Procédure pour préparation de l'échantillon en vue de l'analyse de la viabilité
Prélever 2 x 20 µL par échantillon

Analyses différées

Procédure pour préparation et conservation des cellules en vue du dosage PCR

Prélever 300 µl de la suspension cellulaire par échantillon

Congeler à – 20°C jusqu'à analyse.

Procédure pour préparation et conservation des cellules en vue de l'analyse par cytométrie de flux (apoptose)

A chaque temps précisé dans le plan d'analyse, et après numération

Récupérer 10^6 cellules (volume dépend de la concentration cellulaire)

2 Lavages successifs au PBS froid

Puis reprise par 500 µL d'éthanol 70 froid

Vortex et repartition dans 2 aliquots de $0,5 \times 10^6$ cellules donc dans 250 µL (ou alors on laisse dans 500µL)

Congeler à – 20°C jusqu'à analyse

Procédure pour préparation des cellules en vue de l'analyse des nucléotides intracellulaires par HPLC/MS

A 48 heures, et après numération

Laver les cellules au PBS froid 3 fois puis reprise avec du MeOH 60 (travailler dans la glace)

Reprendre par un volume de manière à obtenir 10^7 cel/0,5 ml

Ex : Si 10^6 cel/ml : on a 5×10^7 cel dans 50 ml et il faut donc reprendre par 2,5 ml de MeOH 60

Les aliquots finaux : 0,5 ml/ 10^7 cel (possibilit » de dilution au moment de l'analyse HPLC)

Congeler à – 80°C jusqu'à analyse

ANNEXE 8

Cellules lymphoblastoïdes non infectées : plan d'analyse

	GCV 0				GCV 1				GCV 5				GCV 10				GCV 20			
	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
T0	NUMERATION ET VIABILITE ET APOPTOSE																			
1J	L N* V* A				L N* V* A				L N* V* A				L N* V* A				L N* V* A			
2J	N V	L N* V* D* A			N V	L N* V* D* A			N V	L N* V* A			N V	L N* V* D* A			N V	L N* V* A		
7J	N V	N V	L N* V* A		N V	N V	L N* V* A		N V	N V	L N* V* A		N V	N V	L N* V* A		N V	N V	L N* V* A	
14J	N V	N V	N V	L N* V* A	N V	N V	N V	L N* V* A	N V	N V	N V	L N* V* A	N V	N V	N V	L N* V* A	N V	N V	N V	L N* V* A

S1 : exposition 1J

S2 : exposition 2J

S3 : exposition 7J

S4 : exposition 14 J (reference)

ANNEXE 8

Pour chaque série : GCV 0, 1, 5, 10 et 20

L=LAVAGE

N=NUMERATION

N*= NUMERATION AVANT ET APRES LAVAGE

A = APOPTOSE

D* = ALIQUOTS POUR LA MISE AU POINT DOSAGE HPLC (5×10^7 cellules pour chaque point) *série en parallèle*

A : 10^6 cellules par mesure

Numération : 200 μ L par mesure

Adam : 40 μ L par point

Au total : 20 flacons de lympho (20ml) + 3 flacons supplémentaires pour HPLC (50 ml)

ANNEXE 8

Cellules lymphoblastoïdes infectées par le CMV : plan d'analyse

	GCV 0				GCV 1				GCV 5				GCV 10				GCV 20			
	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
T0	NUMERATION ET VIABILITE ET APOPTOSE PCR APRES INFECTION																			
1J	L N* V* A P				L N* V* A P				L N* V* A P				L N* V* A P				L N* V* A P			
2J	N V P	L N* V* D* A P			N V P	L N* V* D* A P			N V P	L N* V* A P			N V P	L N* V* D* A P			N V P	L N* V* A P		
7 J	N V P	N V P	L N* V* A P		N V P	N V P	L N* V* A P		N V P	N V P	L N* V* A P		N V P	N V P	L N* V* A P		N V P	N V P	L N* V* A P	
14J	N V P	N V P	N V P	L N* V A P	N V P	N V P	N V P	L N* V A P	N V P	N V P	N V P	L N* V A P	N V P	N V P	N V P	L N* V A P	N V P	N V P	N V P	L N* V A P

S1 : exposition 1J

S2 : exposition 2J

ANNEXE 8

S3 : exposition 7J

S4 : exposition 14 J (reference)

Pour chaque série : GCV 0, 1, 5, 10 et 20

L=LAVAGE

N=NUMERATION

N*= NUMERATION AVANT ET APRES LAVAGE

A = APOPTOSE

P = PCR : 50 + T2heures + TEMOIN 2 heures+ Récolte = **53 PCR**

D* = ALIQUOTS POUR LA MISE AU POINT DOSAGE HPLC (**5×10^7 cellules pour chaque point**)

A : 10^6 cellules par point (0,5 à 1,5 ml en fonction de nbre de cellules/ml (J1, J2, J7 ou J14)

Numération : 200 μ L par point

Adam: 40 μ L par point NE FAIRE QU'A J7 et J14sauf si nbre de cellules suffisant (au moins 10^6 cel/ml)

P : 300 μ l par point

Dosage HPLC/MS : 5×10^7 par point

ANNEXE 8

LETTER TO THE EDITOR

Human herpes virus-6 encephalitis in a paediatric bone marrow recipient: successful treatment with pharmacokinetic monitoring and high doses of ganciclovir

Bone Marrow Transplantation (2006) **38**, 769–770.
doi:10.1038/sj.bmt.1705518; published online 2 October 2006

Like other herpes viruses, human herpes virus (HHV)-6 remains in a latent state after primary infection. Reactivation of infection can occur in immunodeficient situations^{1,2} and causes fever, rash, pneumonitis, hepatitis and, in some cases, encephalitis.^{1,3,4} In *in vitro* studies, ganciclovir (GCV), foscarnet and cidofovir have demonstrated an inhibitory effect against HHV-6, whereas acyclovir is only marginally effective and should not be used for this indication.⁵ Yoshida *et al.*⁵ have determined GCV 50% effective inhibitory concentrations (IC₅₀) in cord blood mononuclear cells to be at least 0.65 and 1.33 µg/ml (dependant on the virus strain). Despite the lack of controlled trials of antiviral treatment, several case reports have demonstrated GCV treatment as prophylactic^{6,7} or curative^{1,8,9} therapy for HHV-6 infections.

We report here the case of a 7-year-old patient, who reactivated HHV-6 virus after bone marrow transplantation (BMT) and was successfully treated with high doses of GCV.

A 7-year-old boy underwent mismatched (9/10) unrelated BMT for relapsed acute lymphoblastic leukaemia. He presented before transplantation with a positive serological status for HHV-6 (immunoglobulin G), negative sero-status for cytomegalovirus (CMV) and herpes simplex virus. The transplant was Epstein–Barr virus-positive, whereas HIV, CMV, HTLV, hepatitis (A, B, C), toxoplasmosis serologic assays were negative. HHV-6 status of the donor was unfortunately not tested. The conditioning regimen included 12 Gy total body irradiation, 12 g/m² cytarabine and 140 mg/m² melphalan. Cyclosporine (3 mg/kg/day) was introduced as twice daily 2-h infusions from BMT day-1 to prevent graft-versus-host disease (GVHD). Antilymphocyte globulins were administered before BMT at day-5, day-3 and day-1 (7.5 mg/kg total dose). Antimicrobial prophylactic treatments were started from BMT day +1. Immunosuppressive therapy between BMT day +1 and +13 consisted only of cyclosporine infusions, with a twice weekly therapeutic drug monitoring (TDM), to keep a trough blood concentration level between 80 and 100 ng/ml.¹⁰ A grade II GVHD occurred on day +13 post BMT and it was decided to add corticoid therapy and increase cyclosporine doses (to reach trough blood concentration levels of 150 ng/ml). GVHD was rapidly controlled. Engraftment occurred at day +17 post BMT and the chimaerism status at day +30 was

100% donor. The patient left hospital at 30 days post BMT with oral cyclosporine only to be continued for at least 2 months.

The early post transplant period was uncomplicated, but the patient presented with abnormal fever from day +51. He was admitted to the transplant unit with clinical symptoms of encephalitis: persistent high fever, progressive stupor, confusion, amnesia, haemiclonic convulsions. Neurological examination revealed no motor, sensory or cerebellar signs. Intensification of his antimicrobial treatment was started with cotrimoxazole, amphotericin B and valaciclovir before identifying the cause as sepsis. HHV-6 encephalitis infection was diagnosed with detection of viral DNA in cerebrospinal fluid (CSF) by means of polymerase chain reaction (PCR) at day +53, whereas results of PCR and serological assays for other herpes viruses were negative.

It was decided to switch the antiviral treatment from valaciclovir to GCV intravenously. First doses of GCV administered were 125 mg (5 mg/kg) twice a day (in a 1-h infusion). GCV plasma concentrations were measured for the first time 4 days after therapy initiation, by using a liquid chromatographic method. GCV plasma levels were 0.24 µg/ml (trough concentration) and 5.07 µg/ml (maximum concentration). These analytical results were then computed with the USC Pack pharmacokinetic software, and a new dosage regimen was forecast by using a Bayesian method to reach target trough concentration levels around 1–2 µg/ml. Therefore, it was decided to increase the doses of GCV to 150 mg three times a day. The duration of each GCV infusion was switched from 1 to 2 h (to get higher trough plasma levels without increasing the peak levels too much). Second plasma trough concentration was measured 5 days after changing the dosage regimen and showed a GCV level of 0.7 µg/ml, so GCV doses were increased to 200 mg three times a day in 2-h infusions, in order to reach a target trough concentration of 1 µg/ml in accordance with the Bayesian predictions. A third trough concentration level measurement showed an increase of plasma GCV level with a concentration of 1.1 µg/ml. The patient's renal function was controlled during the therapy with daily plasma creatinine measurement and the patient presented no adverse effects owing to the 'high dose' GCV regimen. The GCV dosage schedule used for the treatment is summarized in Figure 1.

The patient improved 10 days after initiation and therapeutic monitoring of GCV treatment, with apyrexia and regression of neurological abnormalities. At 3 months post BMT, the patient was alive and well with normal neurologic examination.

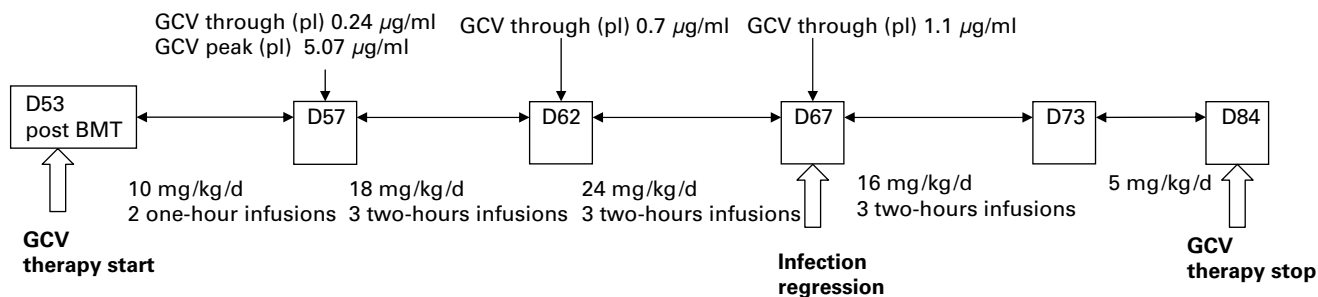


Figure 1 Summary of GCV dosage schedule.

As for many drugs, GCV adult doses (10 mg/kg/day for curative treatment) are most often directly applied in paediatric patients, because of the lack of clinical trials. *In vitro* IC_{50} GCV concentrations for HHV-6 viruses are known to be up to 0.94 µg/ml for HHV-6A and up to 1.58 µg/ml for HHV-6B.⁵ Plasma concentration levels have to be much greater than this to get efficient concentrations in the CSF. Moreover, if we do not know which type of HHV-6 is responsible (our virology laboratory does not test the serotypes), we have to target the highest values of GCV plasma concentrations to be sure to be efficient against HHV-6B if necessary. GCV doses commonly used in adults led to insufficient plasma levels (below IC_{50}) in this paediatric patient. TDM, associating clinical symptom and GCV plasma concentration measurements led to rapid improvement in clinical outcome for the patient. In our experience, TDM is of particular interest when the viral infection is severe and when localization of the virus is difficult to reach (as CSF). The manufacturer's recommendations propose a 1-h infusion duration, but the switch to 2 h is justified by the time-dependent profile of GCV as it leads to a higher GCV plasma minimal concentration. High doses of GCV were necessary to improve the patient's clinical outcome, and this dose was increased according to low trough concentration levels of the drug. TDM was helpful in allowing us to use such high doses (24 mg/kg/day) without occurrence of any adverse effects.

Conventional GCV dosage regimens are not suitable in some cases, and particularly in young patients because of the lack of knowledge about the pharmacokinetic paediatric profile. Owing to high kidney function values in children, GCV at conventional doses may be ineffective in severe infectious diseases. According to clinical symptoms, viral PCR results and plasma GCV measurements, the regimen must be adapted to reach concentrations up the value of the IC_{50} of the drug.

A Janoly-Duménil¹, C Galambrun², T Basset¹, V Mialou², Y Bertrand² and N Bleyzac¹

¹Pharmacy Department, Debrousse Hospital, Lyon, France and

²Paediatric Haematology Department, Debrousse Hospital, Lyon, France
E-mail: nathalie.bleyzac@chu-lyon.fr

References

- 1 Caserta MT, Mock DJ, Dewhurst S. Human herpesvirus 6. *Clin Infect Dis* 2001; **33**: 829–833.
- 2 Savolainen H, Lautenschlager I, Piiparinen H, Saarinen-Pihkala U, Hovi L, Vettentranta K. Human herpesvirus 6 and 7 in pediatric stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2005; **45**: 820–825.
- 3 Boeckh M, Erard V, Zerr D, Englund J. Emerging viral infectious after hematopoietic cell transplantation. *Pediatr Transplant* 2005; **9**: 48–54.
- 4 Dewhurst S. Human herpesvirus type 6 and human herpesvirus type 7 infections of the central nervous system. *Herpes* 2004; **11**: 105A–111A.
- 5 Yoshida M, Yamada M, Tsukazaki T, Chatterjee S, Lakeman FD, Nii S *et al.* Comparison of antiviral compounds against human herpesvirus 6 and 7. *Antiviral Res* 1998; **40**: 73–84.
- 6 Rapaport D, Engelhard D, Tagger G, Or R, Frenkel N. Antiviral prophylaxis may prevent human herpesvirus 6 reactivation in bone marrow transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2002; **4**: 10–16.
- 7 Tokimasa S, Hara J, Osugi Y, Ohta H, Matsuda Y, Fujisaki H *et al.* Ganciclovir is effective for prophylaxis and treatment of human herpesvirus 6 in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl* 2002; **29**: 595–598.
- 8 Mookerjee BP, Vogelsang G. Human herpesvirus 6 encephalitis after bone marrow transplantation: successful treatment with ganciclovir. *Bone Marrow Transpl* 1997; **20**: 905–990.
- 9 Zerr DM, Gupta D, Huang ML, Carter R, Corey L. Effect of antivirals on human herpesvirus 6 replication in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; **34**: 309–317.
- 10 Martin P, Bleyzac N, Souillet G, Galambrun C, Bertrand Y, Maire P *et al.* Relationship between CsA trough blood concentration and severity of acute graft-versus-host disease after paediatric stem cell transplantation from matched-sibling or unrelated donors. *Bone Marrow Transpl* 2003; **32**: 777–784.

ANNEXE 10

Impact of Duration and Intensity of Ganciclovir Exposure on Lymphoblastoid Cell Toxicity.

Inhibition of B lymphoblastoid cell growth by ganciclovir

A. Janoly-Dumenil ¹, I. Rouvet ², N. Bleyzac ^{1,3}, Y Bertrand ³, G. Aulagner ¹ and M.T. Zabet ²

¹ EA 3452 Faculty of Pharmacy, Nancy; ² Department of Cellular Biotechnology , Hospices Civils de Lyon; ³ Pediatric Oncologic and Hematologic Institution, Lyon, France.

audrey.janoly-dumenil@chu-lyon.fr

ANNEXE 10

Abstract

Human cytomegalovirus infection is still a major complication after pediatric bone marrow transplantation and can be fatal in some cases. Ganciclovir remains the standard treatment after pediatric bone marrow transplantation even though it has not been evaluated in children. The toxicity of the drug to dividing transplanted hematopoietic cells combined with the suppression of cell growth caused by the virus remains a major problem in managing *Human cytomegalovirus* infection. The aim of the current in vitro study was to evaluate the impact of the intensity (1 to 20 mg/L) and duration (1, 2, 7 or 14 days) of ganciclovir exposure on toxicity in B lymphoblastoid cells (using cell counting and viability measurements). We found a correlation between the dose of ganciclovir exposure and a decrease in total cell number when duration exceeds 2 days ($P < 0.01$ after 7 and 14 days of ganciclovir exposure respectively). High levels (20 mg/L) of ganciclovir were not more toxic than lower levels (5 mg/L) for the shortest durations of ganciclovir exposure (1 and 2 days), whereas a difference exists for longer exposures (NS, $P = 0.05$). After 14 days of culture a negative correlation was found between dose and cell viability when ganciclovir exposure was 2, 7 or 14 days ($P < 0.03$). Viability decrease was also dependent on duration of ganciclovir exposure. This study demonstrated for the first time that ganciclovir exhibits a duration-dependent toxicity on hematopoietic derived cells when in vivo doses of the drug is used.

ANNEXE 10

Introduction

Human cytomegalovirus (HCMV) remains a major problem after bone marrow transplantation (BMT) and can be fatal in some cases [1-6]. Ganciclovir (GCV) remains the standard treatment for HCMV after pediatric BMT [1, 7]. Because of a lack of pediatric recommendations, GCV therapy is actually based on adult schedules and adapted to patient weight. It has been shown that a human plasma trough concentration between 0.5 and 2 mg/L (above MIC 50%) should be maintained to obtain viral efficacy [8, 9], but therapeutic drug monitoring remains controversial in adult transplantation [10, 11] and no data is available for children after BMT. The antiviral action of this drug involves selective phosphorylation by viral kinases and subsequent selective viral DNA polymerase inhibition [12]. The major problem with GCV is hematological toxicity [13, 14] and myelosuppressive effects [14]. In fact, due to the resemblance of GCV triphosphate (GCVTP) to guanosine, this nucleoside analogue is likely to have adverse effects on mammalian DNA synthesis in addition to its effect on viral replication [15]. Ganciclovir is particularly toxic to rapidly dividing populations of blood cells and their precursors [15]. This side effect represents an in vivo risk factor for post-transplantation death [13], opportunistic infection [2], and tardive HCMV infection due to high immunosuppression [7]. Moreover, this cell toxicity is combined with the myelosuppression caused by HCMV [4, 6, 16-18] and it is difficult to attribute toxicity to either treatment or infection [5]. The duration of treatment is a risk factor for this potentially fatal situation [2, 7]. Despite the clinical use of GCV for 20 years, few studies have determined the toxicity of GCV on hematopoietic cells [14, 15, 19, 20] and no studies have tested both dose and duration effects on cell toxicity using B lymphoblastoid cell lines (BLCL), which exhibit a high

ANNEXE 10

similarity to the target cells for GCV toxicity in vivo. This led us to study the impact of GCV exposure on the growth of lymphoblastoid cells in vitro. The present study is a preliminary report from a project aimed at evaluating the antiviral effect of shorter treatments at higher doses, which is supposed to be less toxic for bone marrow.

Materials and Methods

Chemicals. Ganciclovir, 9- (1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine, was provided by Roche laboratories (Neuilly sur Seine, France). RPMI 1640 medium was purchased from Eurobio (Courtaboeuf, France). Fetal bovine serum was from Perbio Science (Bezons, France). Phosphate buffered saline (PBS) medium was from Jacques Boy (Reims, France). Penicillin/streptomycin (10000 U/mL) and amphotericin B were purchased from Bio Whittaker Europe, Cambrex (Verviers, Belgium) and Bristol Myers Squibb (Rueil Malmaison, France), respectively. Cyclosporin A (5 mg) was from Sigma (Steinheim, Germany).

Cell culture. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from the whole blood of healthy pediatric donors by Ficoll density gradient centrifugation. B lymphoblastoid cell lines were established from PBMC by ex vivo infection with a laboratory strain of Epstein-Barr virus (EBV), an effective procedure for inducing the long-term growth of certain human B lymphocytes. Immortalized B cell lines are obtained by latently infecting the BLCL with EBV, and they produce little or no infectious viral particles. The BLCL were then grown as suspension cultures in RPMI 1640 medium supplemented with 12% fetal bovine serum, penicillin (120 UI/mL), streptomycin (120

ANNEXE 10

µg/mL), and amphotericin B (1 µg/mL). The cell culture incubation was performed at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Cells were kept in the exponential phase over the course of the culture (14 days).

Incubation of lymphoblastoid cells with GCV. Ganciclovir stock solution was prepared at 1 mg/mL and diluted in water before the assay to obtain a range of GCV concentrations in lymphoblastoid cell culture medium from 1 to 20 mg/L. For each applied concentration (1, 5, 10, and 20 mg/L), the period of GCV exposure included 1, 2, 7, and 14 days, with three consecutive washings applied to completely remove extracellular GCV. The total culture duration, independent of the GCV exposure periods, was 14 days.

Lymphoblastoid cell counting. Total cell number was determined using a coulter particle counter and size analyzer (Beckman coulter counter Z2). For the 2 day GCV exposure, cell number was measured at day 2, before and after drug removal, and at days 7 and 14. For the 7 day GCV exposure, counting was performed at day 2; day 7, before and after drug removal; and day 14. Lastly, for the 14 day GCV exposure, lymphoblastoid cell number was counted at days 2, 7, and 14.

Viable cells number determination. Viable lymphoblastoid cell number was determined using ADAM Counter (Labtech France): samples are stained with fluorescent dye, propidium iodide, which intercalates DNA to stain the nucleus of target cells, and fluorescent image are taken automatically and processed by **image analysis**

ANNEXE 10

software. Viable cell number was measured at day 7 (for the 1 day, 2 day and 7 day GCV exposure) and at day 14 (for the 1 day, 2 day, 7 day and 14 day GCV exposure).

Microscopic examination of lymphoblastoid cells. After the varying periods of incubation with GCV (2, 7, and 14 days), cells were examined (magnification 40 x and 100 x) and photographed by inverted microscopy (Nikon eclipse TE-2000 - U and NIS NIKON software).

ANNEXE 10

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using SPSS software for windows (version 12.0, Chicago, IL, USA). The total cell number versus drug concentration was tested using least squares linear regression analysis (regression coefficient and slope test) after 1, 2, 7, and 14 days of GCV exposure. The mean number of lymphoblastoid cells at low (5 mg/L) and high (20 mg/L) GCV concentration were compared using the nonparametric Kruskal Wallis test after 1, 2, 7, and 14 days of GCV exposure. The cell viability versus drug concentration was tested using least squares linear regression analysis (regression coefficient and slope test) after 7 days of cell culture (for 1, 2, and 7 days of GCV exposure) and after 14 days of cell culture (for the 1, 2, 7, and 14 days of GCV exposure). A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

Results

Cell number analysis of toxicity Incubation with GCV was associated with cell toxicity and decreased growth at days 7 and 14 for all concentrations (1 to 20 mg/L) and for all GCV incubation periods (Figures 1a, 1b, 1c and 1d). However, the shortest GCV incubation period (1 day; Figure 1a) had only little effect on lymphoblastoid cell growth at day 7 and day 14. Also, a correlation between drug concentration and cell toxicity was found when the duration of GCV incubation was longer than 2 days (Figures 2c and 2d; $P < 0.01$ and $P < 0.005$ respectively), but no significant correlation was demonstrated for 1 or 2 days of GCV exposure (Figures 2a and 2b).

ANNEXE 10

No difference on cytotoxicity was found between the highest concentration of GCV (20 mg/L) and 5 mg/L when the duration of GCV exposure did not exceed 2 days (Figure 3).

On the contrary, 20 mg/L was more toxic than 5 mg/L when cells were exposed to the drug for 7 or 14 days (Figure 3) even if the difference was not significant ($P = 0.05$).

The degree of cell viability was significantly associated with the GCV concentration after 7 days of cell culture (Figure 4 a) and independent of GCV exposure duration (1 day, 2 days or 7 days). Lastly, the degree of cell viability was significantly associated with the GCV concentration after 14 days of cell culture (Figure 4 b) and when GCV exposure duration exceeds 1 day. The more important viability decrease was obtained with the highest GCV concentration and the longest duration of exposure.

Microscopic analysis. Examination of BLCL after 7 days of culture with either no GCV (Figures. 5a and b) or after 7 days of GCV incubation at 5 mg/L (Figures. 5c and 5d) or 20 mg/L (Figures 5e and f) indicated an alteration and decrease in cell clusters associated with high GCV concentration (20 mg/L). Equivalent results were found by microscopic examination after 14 days (data not shown). No GCV concentration-dependent alteration of BLCL was observed for the 2-day incubation (data not shown).

Discussion

In our pediatric hospital, GCV treatment usually consists of an intravenous infusion of 5 mg/Kg twice a day maintained for 15 to 21 days according to PCR results of viral load. The duration of in vitro exposure in the current study was based on this clinical situation and the 14 day GCV exposure should be considered as the “standard

ANNEXE 10

treatment". Target plasma trough levels retained during therapeutic drug monitoring range from 1 to 2 mg/L. Therefore, the choice of in vitro drug concentrations used for incubation was based on these target levels and previous in vitro studies [12, 21-24]. Low levels (1 and 5 mg/L) were chosen to correspond to clinically relevant trough plasma levels. Higher GCV levels (10 and 20 mg/L) were tested to approach toxic human plasma levels.

BLCL toxicity. The results of the present study show that shorter exposures are less cytotoxic, independent of the dose. Interestingly, a hard exposure (20 mg/L) over the course of 1 day is no more toxic than a lower concentration (5 mg/L). For longer exposure times (more than 1 days), there was a positive correlation between the dose and the cytotoxicity. Therefore, the results obtained with BLCL underline the advantage to limiting the duration of exposure for the prevention of cell toxicity. Few clinical reviews have related an experience with GCV treatment consisting of higher doses for a shorter duration than those recommended by guidelines. Only one case report dealt with intravenous treatment for severe human *herpesvirus-8* infection [25], and others related oral or intravitreal therapy for CMV retinitis [26-29]. In each case, these "high doses" of GCV led to successful treatment with no increase in side effects.

Previous in vitro cell studies. For in vitro cell toxicity, previous studies were conducted prior to the authorization of GCV marketing (1988) and did not concern hematological cells; they dealt with fibroblastic [21, 22], Vero, and Hela cells [12, 24]. The studies essentially consisted of metabolism studies of GCV as GCVTP, but not really cell toxicity analysis, even though GCVTP appears to be responsible for part of

ANNEXE 10

the toxic effects. St Clair et al. [23] reported no detectable GCVTP in uninfected cells even when incubated with high levels of GCV (25 mg/L). Other publications [12] demonstrated 100-fold lower GCVTP levels in uninfected compared to infected cells when using 2.5 to 12.5 mg/L of GCV. Biron et al. [21] observed an equal amount of GCVTP in uninfected and infected cells during the first 48 hours of incubation and 10-fold more GCVTP in infected cells after this 48-hour period when using 12.5 mg/L of GCV. Using 2.5 mg/L GCV, Freitras et al. [22] found at least 10-fold more GCVTP in infected cells than uninfected cells and demonstrated that GCV is a more potent inhibitor of viral DNA polymerase than cellular DNA polymerase. Moreover, an inhibition of cell growth [23] has been shown with high levels of GCV (greater than 30 mg/L). Finally, these in vitro cell models seem to be less sensitive to GCV side effects than hematological cells.

Previous specific blood cell toxicity studies in vitro. Previous studies have used CFU granulocyte-macrophage, burst forming unit erythroid, or PBMC [14, 15, 19] and not BLCL as cell models. Somadossi et al. [14] demonstrated that GCV has a direct dose-dependent inhibitory effect on myeloid and erythroid human progenitor cells with low levels of exposure (0.8 mg/L) in vitro. Heagy et al. [15] showed that GCV inhibits thymidine incorporation into PBMC at low concentrations (1 mg/L). Importantly, these low levels correspond to the active level found in clinical practice. Several hypotheses have been considered to understand this specific toxicity: an increased conversion of GCV to its active triphosphate, despite specific viral kinases and viral DNA polymerase; the presence of a larger fraction of rapidly dividing cells (S-phase) in human bone marrow progenitor cells compared with other cell lines [14, 15] and/or a depletion in

ANNEXE 10

endogenous nucleotides [15]. This previous studies have never determined the effect of the duration of GCV incubation on cell toxicity.

Conclusions. The present study demonstrates for the first time that GCV exhibits both a duration-dependent and dose-dependent toxicity on hematopoietic-derived cells using in vivo comparable drug concentrations. A test of effectiveness, a decrease in CMV viral load, using infected cells is currently being investigated to confirm the benefits of a shorter, though more intensive, GCV treatment than those currently applied. If our hypothesis is confirmed, we will be able to propose new GCV guidelines for CMV treatment management that preserve hematological cells from GCV toxicity after pediatric bone marrow transplantation.

References

1. Atkinson K, Arthur C, Bradstock K et al. Prophylactic ganciclovir is more effective in HLA-Identical family member marrow transplant recipients than in more heavily immune-suppressed HLA-identical unrelated donor marrow transplant recipients. Bone Marrow Transplant 1995; 16: 401-405.
2. Einsele H, Hebart H, Kauffmann-Schneider C et al. Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV- infection. Bone Marrow Transplant 2000; 25: 757-763.
3. Forman SJ, Zaia JA. Treatment and prevention of cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation: where do we stand? Blood. 1994; 83: 392-398.

ANNEXE 10

4. Holberg-Petersen M, Rollag H, Beck S et al. Direct growth suppression of myeloid bone marrow progenitor cells but not cord blood progenitors by human cytomegalovirus in vitro. *Blood* 1996; 88: 2510-2516.
5. Mori T, Okamoto S, Watanabe R et al. Dose-adjusted preemptive therapy for cytomegalovirus disease based on real-time polymerase chain reaction after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 777-782.
6. Tomonari A, Iseki T, Takahashi S et al. Ganciclovir-related neutropenia after preemptive therapy for cytomegalovirus infection: comparison between cord blood and bone marrow transplantation. *Ann Hematol* 2004; 83: 573-577.
7. McGavin JK, Goa KL. Ganciclovir: an update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipient. *Drugs* 2001; 61: 1153-1183.
8. Filler G, Lampe D, Von Bredow MA et al. Prophylactic oral ganciclovir after renal transplantation-dosing and pharmacokinetics. *Pediatr Nephrol* 1998; 12: 6-9.
9. Fletcher C, Sawchuk R, Chinnock B, De Miranda P, Balfour HH. Human pharmacokinetics of the antiviral drug DHPG. *Clin Pharmacol Ther* 1986; 40: 281-286.
10. Greanya ED, Ensom MHH. Therapeutic drug monitoring of ganciclovir in bone marrow transplants. *Eur J Hosp Pharm* 2005; 11: 43-45.
11. Scott JC, Partovi N, Ensom MH. Ganciclovir in solid organ transplant recipients: is there a role for clinical pharmacokinetic monitoring? *Ther Drug Monit* 2004; 26: 68-77.

ANNEXE 10

12. Smee DF, Boehme R, Chernow M, Binko BP, Matthews TR. 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* 1985; 34: 1049-1056.
13. Salzberger B, Bowden RA, Hackman RC, Davis C, Boeckh M. Neutropenia in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease: Risk factors and outcome. *Blood*. 1997; 90: 2502-2508.
14. Sommadossi JP, Carlisle R. Toxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine for normal human hematopoietic progenitor cells in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 452-454.
15. Heagy W, Crumpacker C, Lopez PA, Finberg RW. Inhibition of immune functions by antiviral drugs. *J Clin Invest* 1991; 87: 1916-1924.
16. Randolph-Habecker J, Iwata M, Torok-Storb B. Cytomegalovirus mediated immunosuppression. *J Clin Virol* 2002; 25: S51-56.
17. Giebel S, Maccario R, Lilleri D et al. The immunosuppressive effect of human cytomegalovirus infection in recipients of allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36: 503-509.
18. Torok-Storb B, Simmons P, Khaira D, Stachel D, Myerson D. Cytomegalovirus and marrow function. *Ann Hematol* 1992; 64: A128-131.
19. Dornsife RE, Averett DR. In vitro potency of inhibition by antiviral drugs of hematopoietic progenitor colony formation correlates with exposure at hemotoxic levels in human immunodeficiency virus positive humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 514-519.

ANNEXE 10

20. Snoeck R, Lagneaux L, Delforge A et al. Inhibitory effects of potent inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus on the growth of human granulocyte-macrophage progenitor cells in vitro. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9: 615-619.
21. Biron KK, Stanat SC, Sorrell JB et al. Metabolic activation of the nucleoside analog 9-(2-hydroxy-1-hydroxymethylethoxymethyl) guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 2473-2477.
22. Freitas VR, Smee DF, Chernow M, Boehme R, Matthews TR. Activity of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine compared with that of acyclovir against human, monkey, and rodent cytomegaloviruses. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28: 240-245.
23. St Clair MH, Lambe CU, Furman PA. Inhibition by ganciclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with herpes virus genetic information. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 844-849.
24. St Clair MH, Miller WH, Miller RL, Lambe CU, Furman PA. Inhibition of cellular α DNA polymerase and herpes simplex virus-induced DNA polymerases by the triphosphate of BW759U. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25: 191-194.
25. Janoly-Dumenil A, Galambrun C, Basset T et al. Human herpes virus-6 encephalitis in a paediatric bone marrow recipient: successful treatment with pharmacokinetic monitoring and high doses of ganciclovir. *Bone Marrow Transplant* 2006; 38: 769-770.

ANNEXE 10

26. Arevalo JF, Garcia RA and Mendoza AJ. High-dose (5000-microg) intravitreal ganciclovir combined with highly active antiretroviral therapy for cytomegalovirus retinitis in HIV-infected patients in Venezuela. *Eur J Ophthalmol* 2005; 15: 610-618.
27. Lalezari JP, Friedberg DN, Bissett J et al. High dose oral ganciclovir treatment for cytomegalovirus retinitis. *J Clin Virol* 2002; 24: 67-77.
28. Velez G, Roy CE, Whitcup SM, Chan CC, Robinson MR. High-dose intravitreal ganciclovir and foscarnet for cytomegalovirus retinitis. *Am J Ophthalmol* 2001; 131: 396-397.
29. Young S, Morlet N, Besen G et al. High-dose (2000-microgram) intravitreal ganciclovir in the treatment of cytomegalovirus retinitis. *Ophthalmology* 1998; 105: 1404-1410.

ANNEXE 10

Figure Legends

FIG. 1. Effect of ganciclovir (GCV) on B lymphoblastoid cell growth. Cells were incubated with either no drug (◆) or GCV at a concentration of 1 mg/L (■), 5 mg/L (▲), 10 mg/L (×), or 20 mg/L (*) for 1 day (a), 2 days (b), 7 days (c), or 14 days (d). The total culture duration was 14 days and cell number was measured at day 0, day 1, day 2, day 7, and day 14 (Coulter counter) in triplicate. Values represent the average.

FIG. 2. B lymphoblastoid cell number versus ganciclovir (GCV) concentration. Cells were incubated with GCV for 1 day (a), 2 days (b), 7 days (c), or 14 days (d). Total cell number was measured by Coulter counter after each period of incubation. Values are expressed as mean (n = 3). The result of least squares linear regression analysis are as follows: (a) $r^2 = 0.33$, NS; (b) $r^2 = 0.12$, NS; (c) $r^2 = 0.92$, test slope $P < 0.01$; (d) $r^2 = 0.93$, test slope, $P < 0.005$.

FIG. 3. Effect of the duration of ganciclovir (GCV) incubation on toxicity of a high (20 mg/L) and a low (5 mg/L) concentrations. Cells were incubated either no drug (■) or with GCV at a concentration of 5 mg/L (■) or 20 mg/L (■) for 1, 2, 7, or 14 days. Total Cell number was measured at day 1, day 2, day 7, and day 14 (Coulter Counter). Values are expressed as (n = 3).

FIG 4 B lymphoblastoid viable cell number versus ganciclovir (GCV) concentration. Data are expressed as the percentage of viable lymphoblastoid cells compared with viable lymphoblastoid cells not exposed to GCV. B lymphoblastoid cells were exposed for GCV

ANNEXE 10

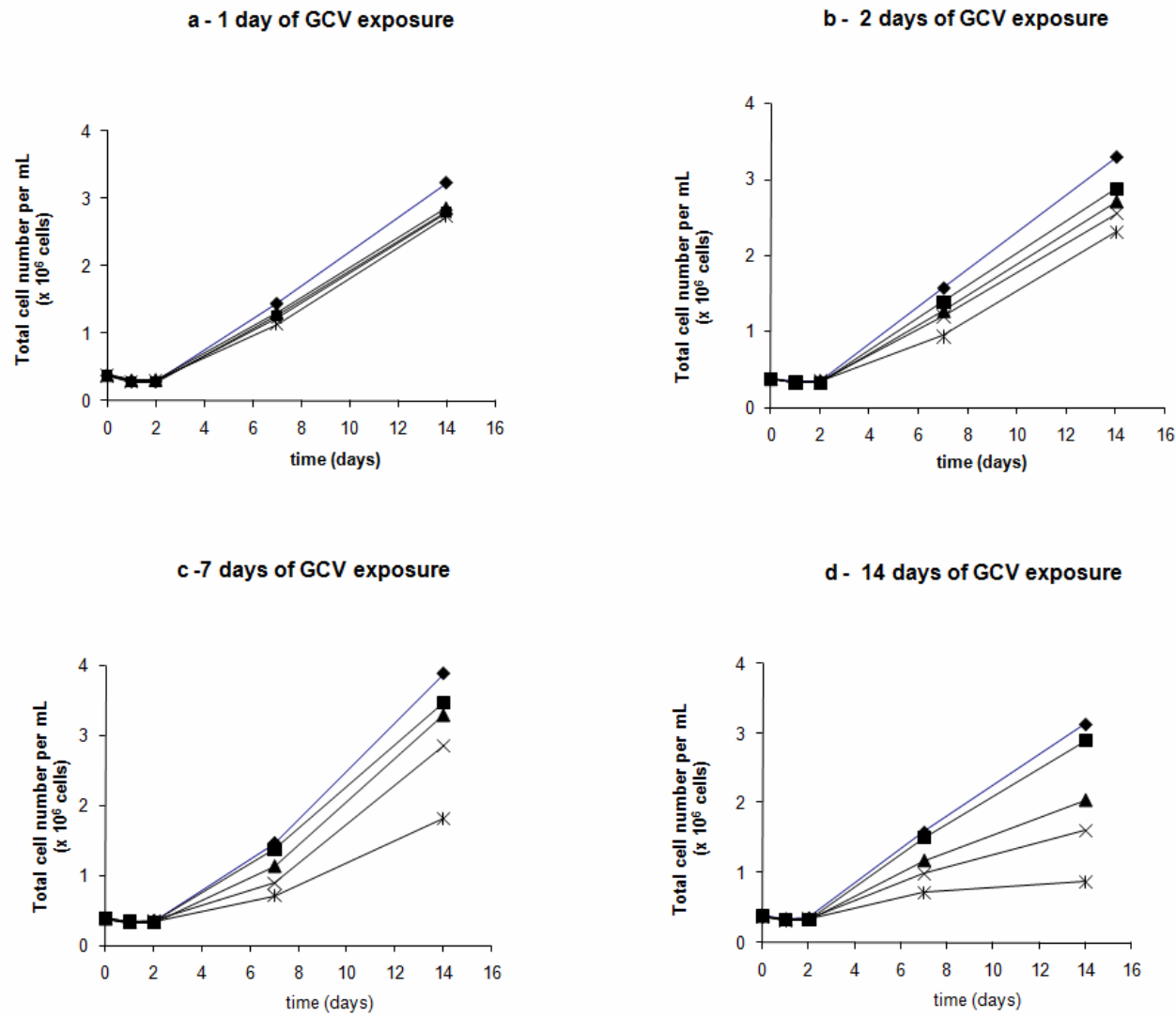
concentrations of 1, 5, 10, and 20 mg/L. Cells were incubated with GCV for 1 (◆), 2 (■), 7 (▲), or 14 (X) days. Viable cells were measured after 7 (a) or 14 (b) days of cell culture (ADAM counter) in triplicate.

The result of least squares linear regression analysis are as follows: (a) $r^2 = 0.99$, test slope $P < 0.001$; $r^2 = 0.87$, test slope $P < 0.02$; $r^2 = 0.88$, test slope $P < 0.01$ for 1 day, 2 day and 7 days of GCV exposure respectively. (b) $r^2 = 0.007$, NS; $r^2 = 0.90$ test slope $P < 0.01$; $r^2 = 0.92$ test slope $P < 0.01$; $r^2 = 0.70$ test slope $P < 0.03$ for 1 day, 2 days, 7 days and 14 days respectively.

FIG. 5. B lymphoblastoid cell growth under microscopic examination after 7 days of cell culture without ganciclovir (a, b), with 5mg/L ganciclovir (c, d), and with 20 mg/L ganciclovir (e, f). Magnification 40 x (Fig 5a, 5c and 5e); magnification x 100 (Fig 5b, 5d and 5f).

ANNEXE 10

Figure 1



ANNEXE 10

Figure 2

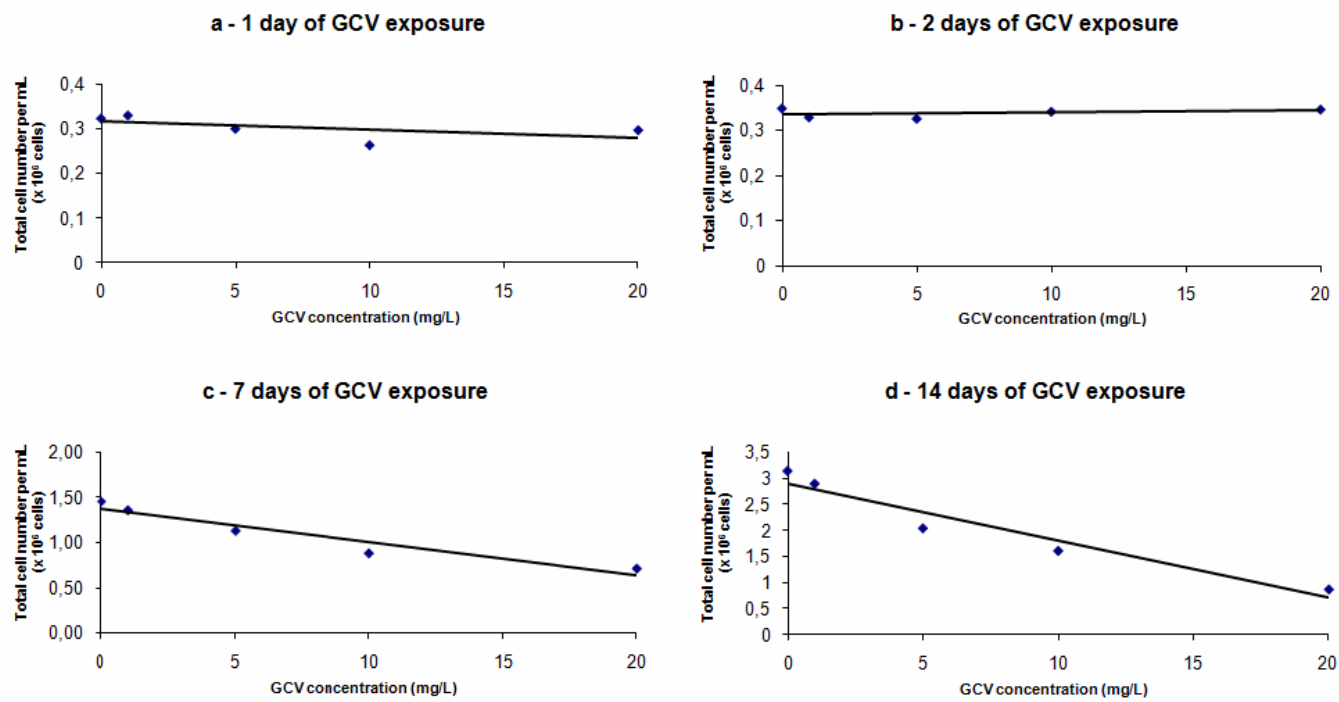
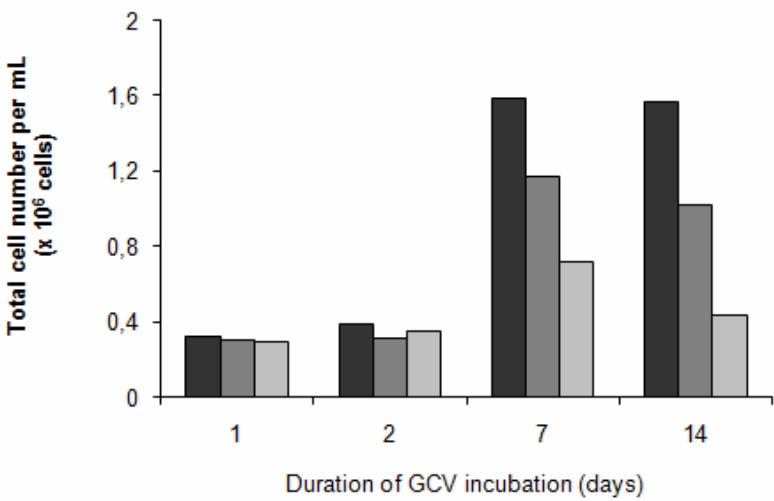
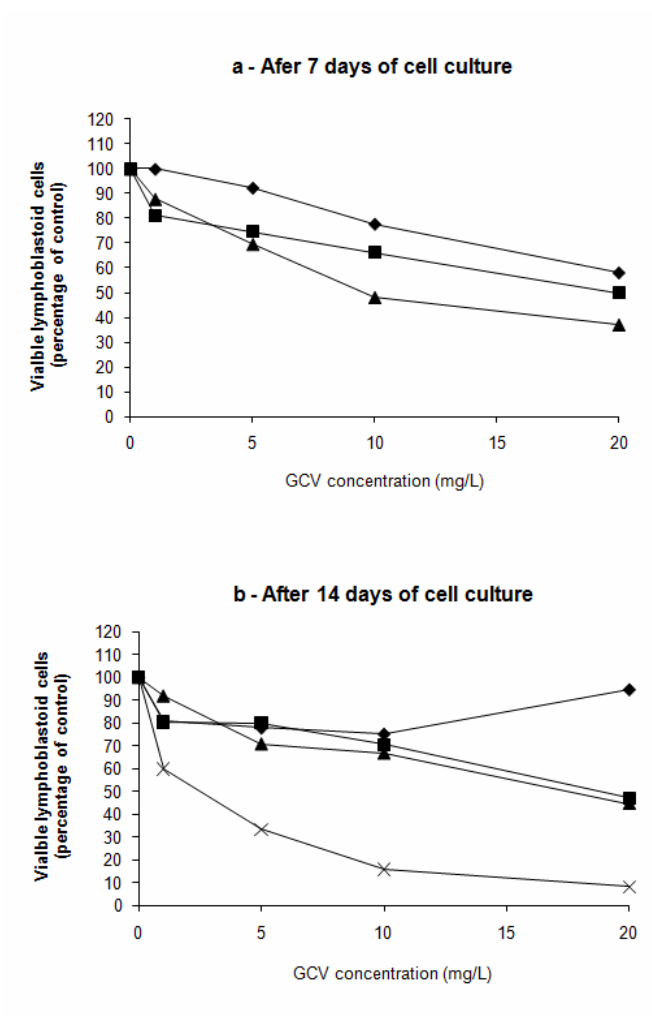


Figure 3



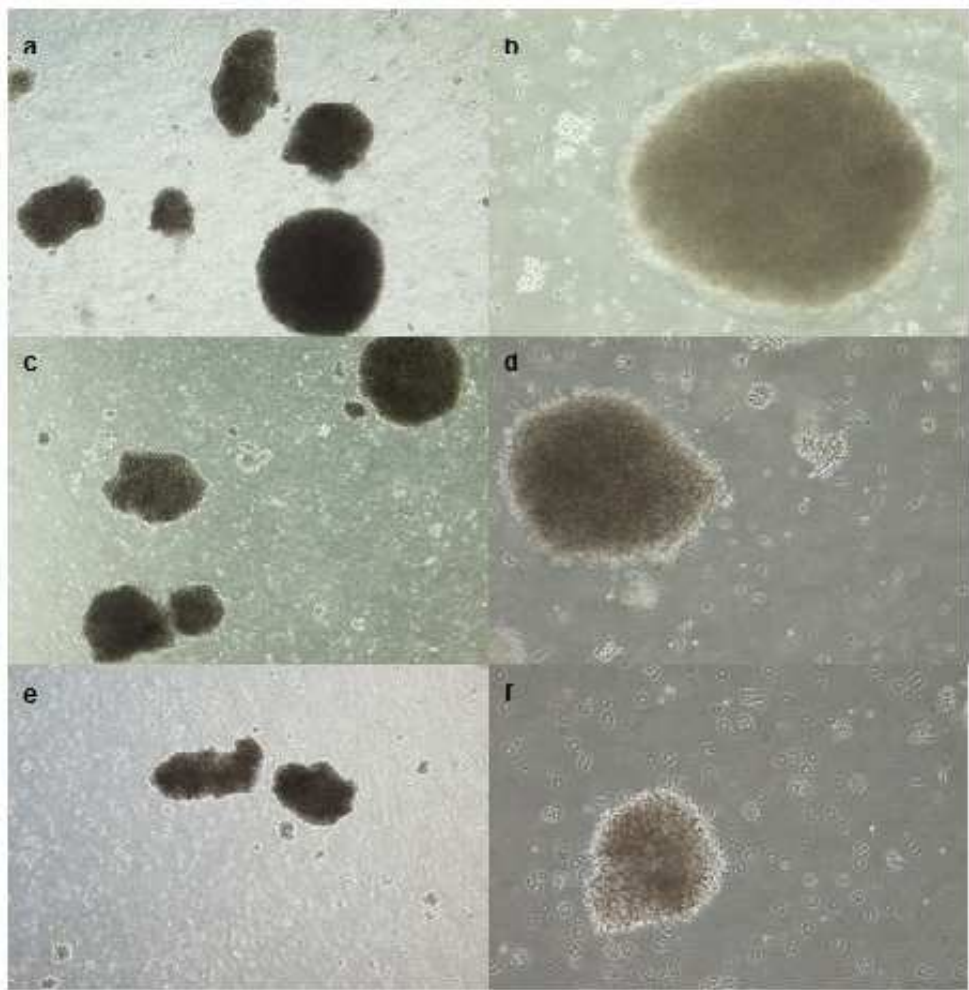
ANNEXE 10

Figure 4



ANNEXE 10

Figure 5



INFECTION A HERPES VIRUS 6 EN TRANSPLANTATION DE MOELLE OSSEUSE PEDIATRIQUE TRAITEE AVEC SUCCES PAR GANCICLOVIR HAUTE DOSE

A. Janoly-Dumenil¹, N. Bleyzac¹, C. Galambun², T. Basset¹, H. Constant¹, Y. Bertrand²,
¹Service de pharmacie, ²Service d'oncologie - hématologie clinique, hôpital Debrousse, HCL, Lyon.



INTRODUCTION- OBJECTIF

Herpes virus 6 (HHV6): Stade latent après primo-infection et réactivation possible, notamment dans des situations d'immunodépression⁽¹⁾

Manifestations cliniques

Fièvre, rash cutané, syndrome mononucléosique pour les formes non compliquées
 Pneumopathie, hépatite, méningite pour les formes les plus graves

Traitement

Efficacité in vitro du ganciclovir, foscarnet et cidofovir

Efficacité clinique du GCV dans les méningites à HHV6:

- quelques cas rapportés sur des patients adultes atteints de méningite à HHV-6
- seulement 1 cas publié en transplantation de moelle osseuse (TMO) pédiatrique⁽²⁾



Enfant traité par Ganciclovir (GCV) pour une encéphalite herpétique à HHV 6 suite à une transplantation de moelle osseuse (TMO)



INTERET DU SUIVI THERAPEUTIQUE DANS LA REUSSITE DU TRAITEMENT

PATIENT- METHODES

CE, garçon de 7ans

- **Hospitalisation en décembre 2004** pour TMO (leucémie aigüe lymphoblastique)
- HHV6 et EBV séropositif avant greffe
- Traitement médicamenteux du patient:
 - Chimiothérapie myélosuppressive (conditionnement greffe):
 - aracytine et melphalan + irradiation corporelle totale
 - Ciclosporine initiée à J-1 de la TMO
 - Corticothérapie ajoutée à J 13 pour GVH grade II
- Évolution clinique favorable avec sortie du patient à J30 post-TMO
- **Réhospitalisation à J50** post-TMO pour état fébrile
 - Traitement empirique par cotrimoxazole, amphotéricin B et aciclovir dans l'attente d'identification de la cause septique.
 - Diagnostic d'une méningite à HHV6 à J53/détection ADN viral dans Le LCR par méthode PCR

→ **Instauration du traitement par GCV dès résultat PCR 10 mg/kg/j en 2 perfusions intraveineuses d'1 heure**



Suivi thérapeutique du traitement par GCV

- PCR
- Evolution clinique
- Dosage plasmatique du ganciclovir à la pharmacie (méthode HPLC avec détection UV)
- Adaptation bayésienne des posologies (USCPACK®)

D'après des mesures

- de concentrations plasmatiques résiduelles de GCV définies avec les cliniciens (GCV_{res}) = 1-2 µg/ml
- de concentrations plasmatiques au pic (GCV_{pic}) ≤ 15 µg/ml
- de concentrations plasmatiques quotidiennes de créatinine

RESULTATS-DISCUSSION



A partir de J67 et étant donné l'évolution clinique très favorable du patient, diminution progressive des doses de 16 mg/kg/j de J67 à J73 puis 5mg/kg/j avec arrêt à J84 post-TMO

Concentration efficace 50% (in vitro et sur des cultures de sang de cordon)

0.65 µg/ml pour HHV6A et 1, 33 µg/ml pour HHV6B⁽³⁾

Nécessité d'avoir des concentrations plasmatiques au moins > 1 µg/ml pour atteindre les concentrations efficaces dans le liquide céphalo-rachidien

Modalité d'administration

Passage à 3 administrations par jour à J57: augmentation du taux résiduel de GCV, en conservant un GCV_{pic} <15 µg/ml

Passage à des perfusions de 2 heures à J57: respect de l'action temps-dépendante du GCV

Posologies utilisées/posologies recommandées

Posologies standards adultes: concentrations plasmatiques infra thérapeutiques chez ce patient

Fonction rénale/effets indésirables

L'augmentation des posologies: progressive et en accord avec des concentrations plasmatiques basses témoignant d'une élimination rapide du médicament (Clairance de la créatinine estimée: 116ml/min)
 sans augmentation des concentrations plasmatiques de créatinine
 sans apparition d'effets indésirables

Avec cette prise en charge thérapeutique

Clinique + biologique (PCR) + dosage plasmatique GCV + adaptation bayésienne des posologies → **REUSSITE DU TRAITEMENT**



CONCLUSION

Ce schéma thérapeutique « haute-dose » montre une nouvelle fois les limites de la transposition de posologies standards adultes chez l'enfant. Dans le cas du traitement par GCV d'une méningite due à HHV 6, les études cliniques étant très insuffisantes voire inexistantes en TMO pédiatrique, le profil pharmacocinétique du médicament reste peu connu et la réussite du traitement passe nécessairement par un suivi thérapeutique étroit.

BIBLIOGRAPHIE

- Oswald S. Human herpes virus type 6 and type 7 infections of the central nervous system. Herpes 2004; 11 (2): 105A-111A
- Kawano Y, Miyazaki T, Watanabe T, Saito A, Kimura S, Roberts C, Oishi T, Tanaka M, Kikunishi S, Nakano Y, Nakagawa R, Suenaga S, Arita T, Nagahiro S, Kuroda Y, Takawa Y. HLA mismatched CD34-selected stem cell transplant complication by HHV6 reactivation in the central nervous system. Bone marrow transplant 2002; 25: 737-750
- Yoshida M, Yamada M, Tsukazaki T, Chetani S, Lakeman FD. Comparison of antiviral compounds against human herpes virus 6 and 7. Antiviral Res. 1998; 40: 73-84

GANCICLOVIR ET TOXICITE HEMATOLOGIQUE CELLULAIRE IMPACT DE LA CONCENTRATION ET DE LA DUREE D'EXPOSITION

Janoly-Dumenil A¹, Rouvet P², Bleyzac N^{1,3}, Aulagner G¹, Zabot M²

(¹) EA 3452 Université Henry Poincaré, Nancy ; (²) Service de Biotechnologie Cellulaire, Groupement Hospitalier Est, Lyon ; (³) Institut d'hématologie et oncologie pédiatrique, Lyon

INTRODUCTION - OBJECTIFS

Infection par le CYTOMEGALOVIRUS (CMV)

• Reste un problème majeur en transplantation de moelle osseuse pédiatrique

GANCICLOVIR (GCV)

- Métabolite actif triphosphorylé
 - 1^{ère} phosphorylation virus dépendante (kinases virus dépendantes)
 - 2^{ème} et 3^{ème} phosphorylations dépendantes de kinases cellulaires
 - Analogue du dGTP - interaction ADN polymérase virale

• Constitue le traitement de référence ...MAIS

- évaluation insuffisante : pas d'AMM chez l'enfant de moins de 12 ans
- Majoration du risque de toxicité hématologique si traitement prolongé
- pouvant conduire à des échecs thérapeutiques/ toxicité combinée infection (CMV) + traitement (GCV)

- Mesurer l'impact de l'intensité et de la durée d'exposition au GCV sur la toxicité d'une lignée de cellules lymphoblastoïdes
- Exposition plus courte mais plus intense moins toxique?
- Optimiser les schémas thérapeutiques actuels ...

MATERIEL ET METHODES

CELLULES

- Cellules sanguines mononucléaires périphériques isolées du sang total (donneurs volontaires) par centrifugation - gradient de Ficoll
- A partir de l'isolement des cellules sanguines mononucléaires périphériques:
 - Infection /EBV et production de lignées B lymphoblastoïdes
 - Infection latente (non lytique)
 - Cellules « immortalisées »
- Cellules lymphoblastoïdes mises en suspension dans RPMI 1640 supplémenté par 12% de sérum de veau fœtal, pénicilline, streptomycine et amphotéricine B
- 37°C, CO2 5%, Air 95%
- Cellules maintenues en phase exponentielle de croissance pendant la durée de la culture (14 jours)

INCUBATION AVEC LE GANCICLOVIR

- Préparation de solution de GCV à 1 g/L puis dilution pour obtenir des concentrations de 1, 5, 10 et 20 mg/L dans le milieu de culture
- Pour chaque concentration, durées d'exposition de
 - 2, 7, ou 14 jours
 - Après exposition, 3 lavages consécutifs pour retirer complètement le GCV du milieu extracellulaire
 - La durée totale de la culture cellulaire, indépendamment de la durée d'exposition au GCV était de 14 jours

NUMERATION ET EXAMEN MICROSCOPIQUE DES CELLULES LYMPHOBLASTOÏDES

- Nombre de cellules déterminé par compteur Coulter (Beckman, Z2)
- Exposition GCV 2 jours:
 - Numération cellulaire à 2 (avant et après lavage du milieu extracellulaire), 7 et 14 jours
- Exposition GCV 7 jours:
 - Numération cellulaire à 2, 7 (avant et après lavage du milieu extra cellulaire) et 14 jours
- Exposition GCV 14 jours
 - Numération cellulaire à 2, 7 et 14 jours (pas de lavage du milieu extra cellulaire)
- En plus et à la fin de chaque période d'incubation au GCV
 - Observation des cellules et des dusters avec le microscope Nikon éclipse TE-2000-U (et logiciel NIS NIKON)
 - Agrandissement X 40

ANALYSE STATISTIQUE

- Logiciel SPSS pour Windows (version 12.0)
- Régression linéaire du nombre de cellules versus concentration de GCV après 2, 7 et 14 jours d'incubation (coefficient de régression, test de la pente)
- Comparaison du nombre de cellules pour des concentrations en GCV de 1 et 20 mg/L après 2, 7 et 14 jours d'incubation (test de Kruskal Wallis)
- Corrélation à 114 entre la durée d'exposition au GCV et le nombre de cellules mesurées, pour chaque niveau de concentration en GCV (coefficient de Pearson)

RESULTATS ET DISCUSSION

NOMBRE DE CELLULES VERSUS CONCENTRATION EN GCV après 2, 7 et 14 jours d'exposition

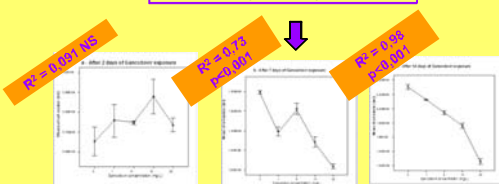


Figure 2: Nombre de cellules B lymphoblastoïdes versus la concentration en GCV. Cellules exposées au GCV pendant 2 jours (figure 2a), 7 jours (figure 2b), ou 14 jours (figure 2c). Valeurs moyennes ± sd (n = 3)

EXAMEN MICROSCOPIQUE DES CLUSTERS DE CELLULES après 14 jours de culture



Figure 5: Cellules B lymphoblastoïdes (x 40) après 14 jours de culture cellulaire sans ganciclovir (figure 5a), exposées au ganciclovir 1mg/L (figure 5b) et ganciclovir 20 mg/L (figure 5c).

EFFET DU GCV SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE

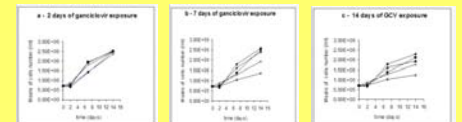


Figure 1: Effet du Ganciclovir sur la croissance de cellules B lymphoblastoïdes. Cellules non exposées au GCV (●), ou exposées au GCV à la concentration de 1 mg/L (■), 5 mg/L (▲), 10 mg/L (x) ou 20 mg/L (*). Pendant 2 jours (figure 1a), 7 jours (figure 1b) ou 14 jours (figure 1c) Culture cellulaire maintenue pendant 14 jours. (Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures)

COMPARAISON CONCENTRATION BASSE (1mg/L) ET CONCENTRATION HAUTE (20 mg/L)

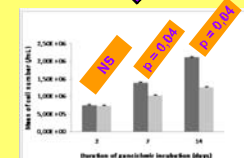


Figure 3: Effet de la concentration en GCV sur la toxicité cellulaire à 2, 7 et 14 jours. Cellules exposées à des concentrations en GCV de 1 mg/L (■) et 20 mg/L (●) pendant 2, 7 ou 14 jours. Nombre de cellules mesurées à 2, 7 et 14 jours. Valeurs moyennes ± sd (n = 3)

CORRELATION DUREE D'EXPOSITION AU GCV ET NOMBRE DE CELLULES

Après 14 jours de culture
Pour tous les niveaux de concentration

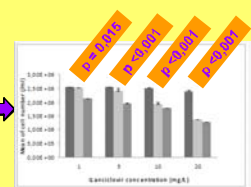


Figure 4: Effet de la durée d'exposition au GCV sur la toxicité cellulaire (pour des concentrations en GCV de 1, 5, 10 et 20 mg/L). Cellules exposées au GCV pendant 2 (■), 7 (●) ou 14 (▲) jours. Mesures réalisées après 14 jours de culture (indépendamment de la durée d'exposition au GCV). Valeurs moyennes ± sd (n = 3)

CONCENTRATIONS TESTEES SE RAPPROCHANT DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES EFFICACES RECHERCHEES EN SUIVI THERAPEUTIQUE CLINIQUE

- Mise en évidence d'une toxicité exposition- dépendante concentration indépendante après 14 jours de culture
- Toxicité dose dépendante UNIQUEMENT SI durées d'exposition > 2 jours
- Pas de différence de toxicité pour les expositions courtes : 2 jours

- Modèle cellulaire proche des cellules hématopoïétiques particulièrement sensibles à la toxicité du GCV en période de post-transplantation de moelle osseuse

- Toxicité sur Cellules sanguines non infectées +++ (a, b, c)

- Toxicité sur cellules adhérentes peu décrite

- Mécanisme de toxicité toujours non élucidé???

- Phosphorylation non négligeable même en l'absence des kinases virales ???

PERSPECTIVES

Etude d'efficacité sur des cellules lymphoblastoïdes infectées par le CMV

- Impact de l'intensité et durée d'exposition sur la diminution de la charge virale

• Compilation résultats Toxicité et Efficacité

- Modélisation PK/PD : détermination de la dose et durée optimales pour efficacité +++ et toxicité - - -

- Perspectives cliniques avec proposition de nouveaux schémas posologiques à tester dans le traitement des infections à CMV en post-transplantation de moelle osseuse pédiatrique

REFERENCES

(1) Domsife, R.E., D.R. Averett. 1996. In vitro potency of inhibition by antiviral drugs of hematopoietic progenitor colony formation correlates with exposure to hemotoxic levels in human immunodeficiency virus positive humans. Antimicrob Agents Chemother. 40: 514-519. (2) Heagy, W., C. Crumpacker, P.A. Lopez, R.W. Finberg. 1991. Inhibition of immune functions by antiviral drugs. J. Clin. Invest. 87: 1916-1924. (3) Sommadossi, J.P., R. Carlisle. 1987. Toxicity of 3'-azido-2'-deoxythymidine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine for normal human hematopoietic progenitor cells in vitro. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 452-454