



Résistance aux antiviraux

Jérôme LeGoff

Laboratoire de Microbiologie Hôpital Saint-Louis

Université Paris-Diderot

Inserm U941

Pourquoi les virus résistent ?

Virus ARN

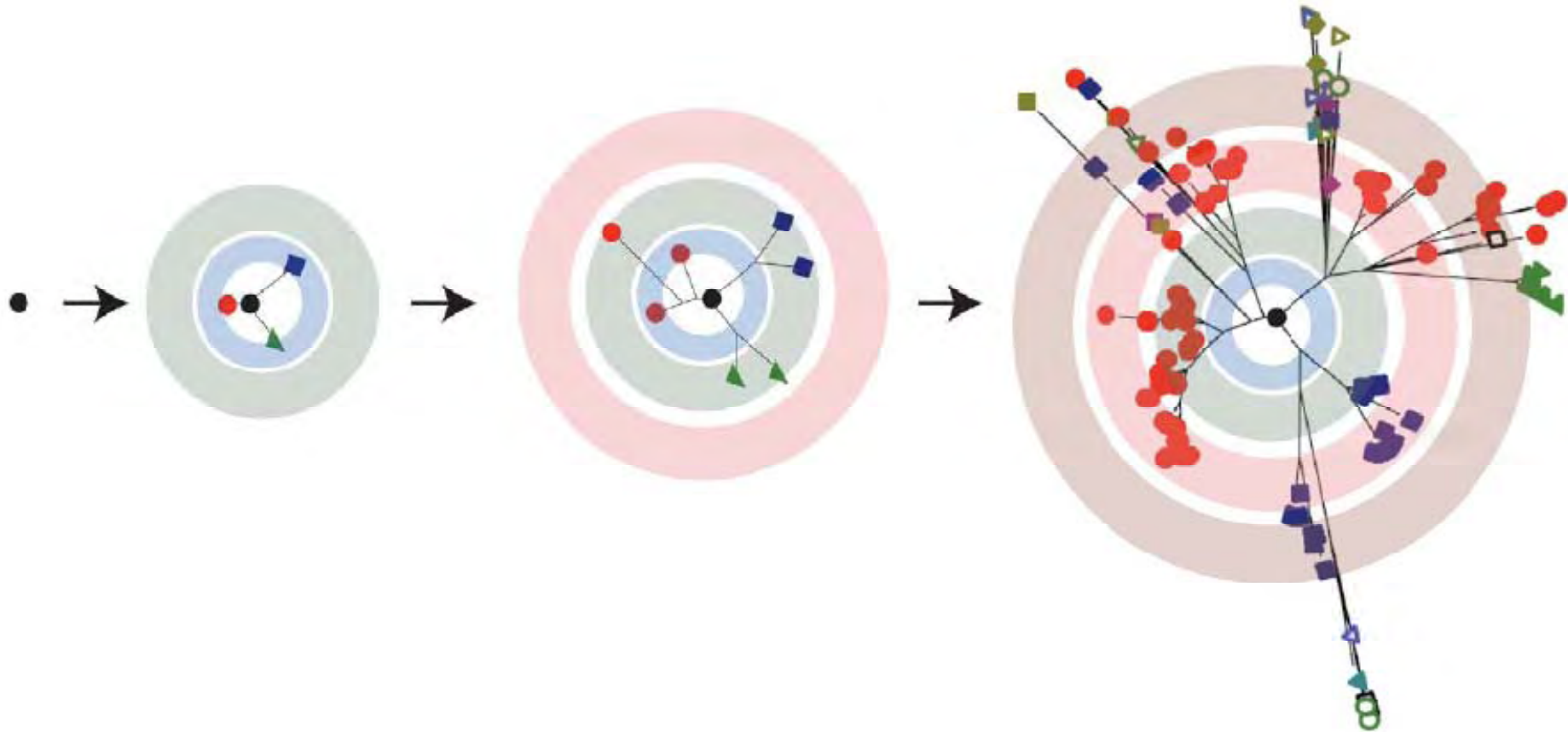
- ✓ Taux d'erreur des ARN polymérases virales : $1/10^4$ nt
 - ✓ VIH, production : 10^9 - 10^{10} particules par jour
- ✓ **Toutes les mutations pré-existent avant traitement**
- ✓ Taux de recombinaison: 5 à 10 évènements par cycle
- ✓ Evolution constante de la quasiespèce

Virus ADN

- ✓ Taux d'erreur des ADN polymérases virales : $1/10^7$ nt

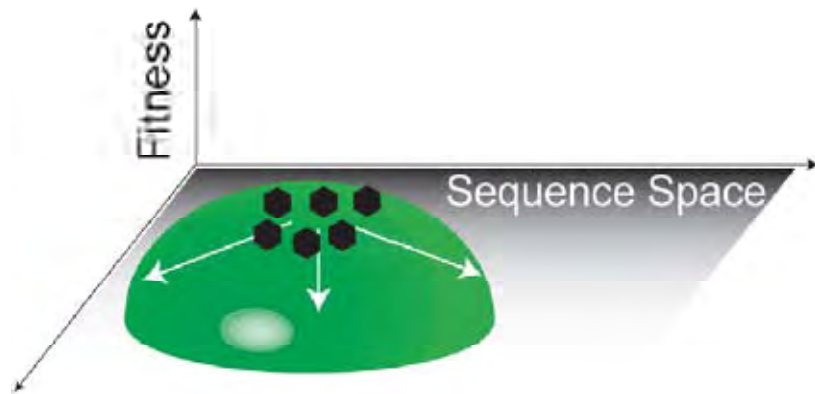
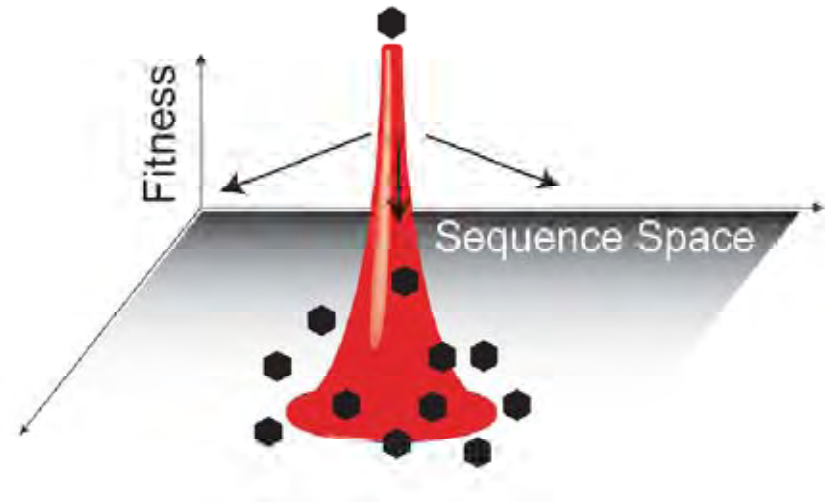
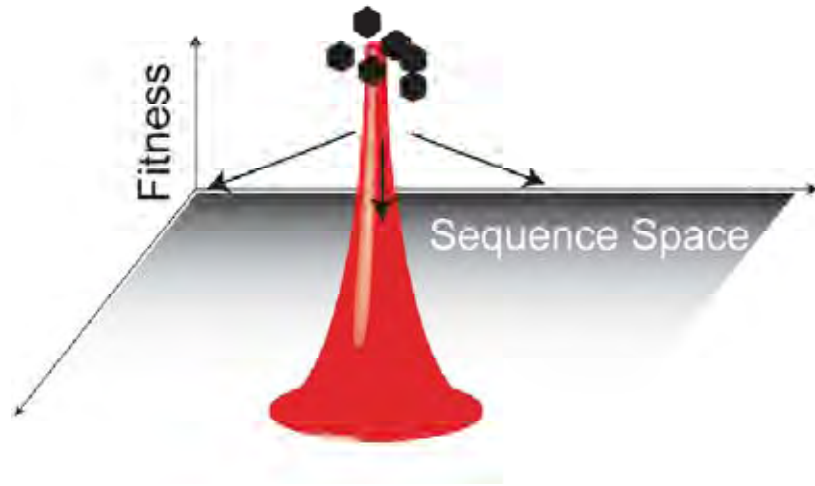
Génomés virus ADN > génomés virus ARN

Quasiespèces virales

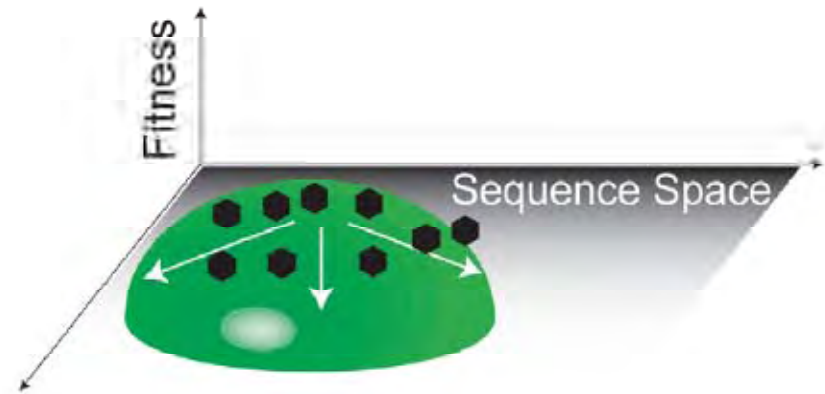


Lauring AS Plos pathogen 2010

Capacités réplcatives et taux de mutation



Low Mutation Rate



High Mutation Rate

Emergence d'une souche résistante

Avant
traitement




Traitement

Après
traitement

**Blocage du cycle viral des
souches sensibles**

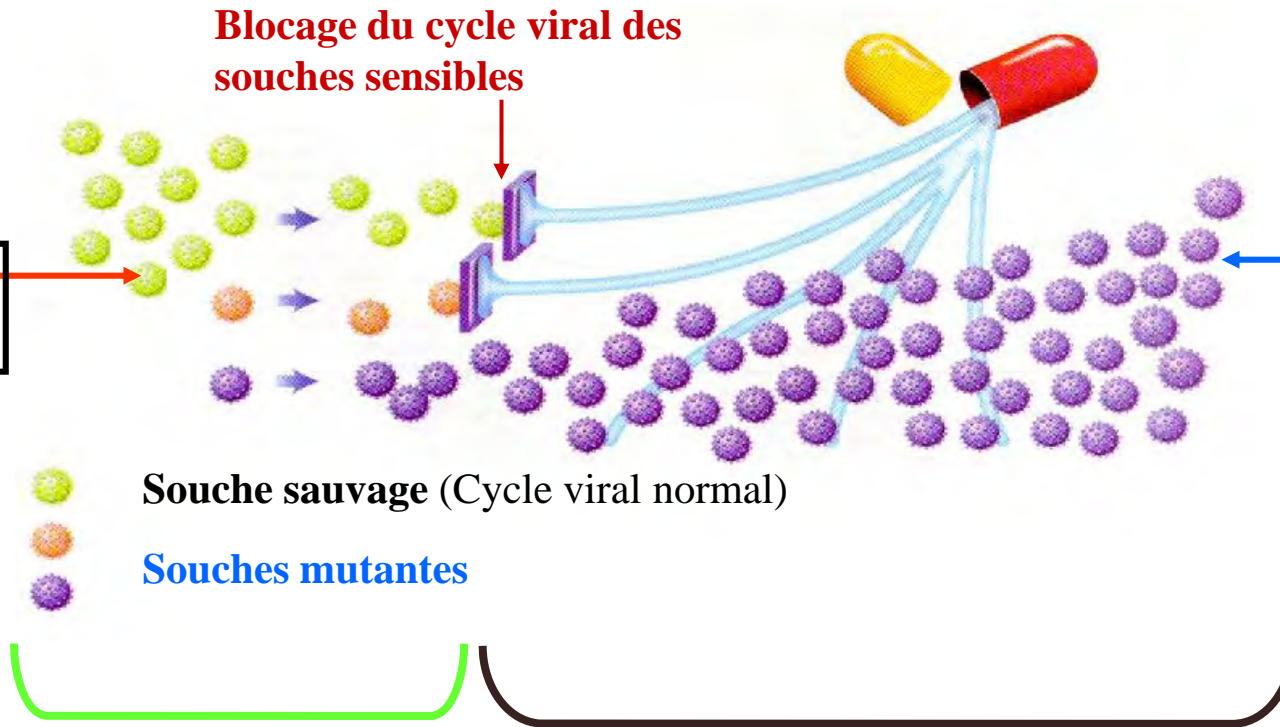
**Prédominance de
la souche sauvage**

**Prédominance de
la souche
résistante**

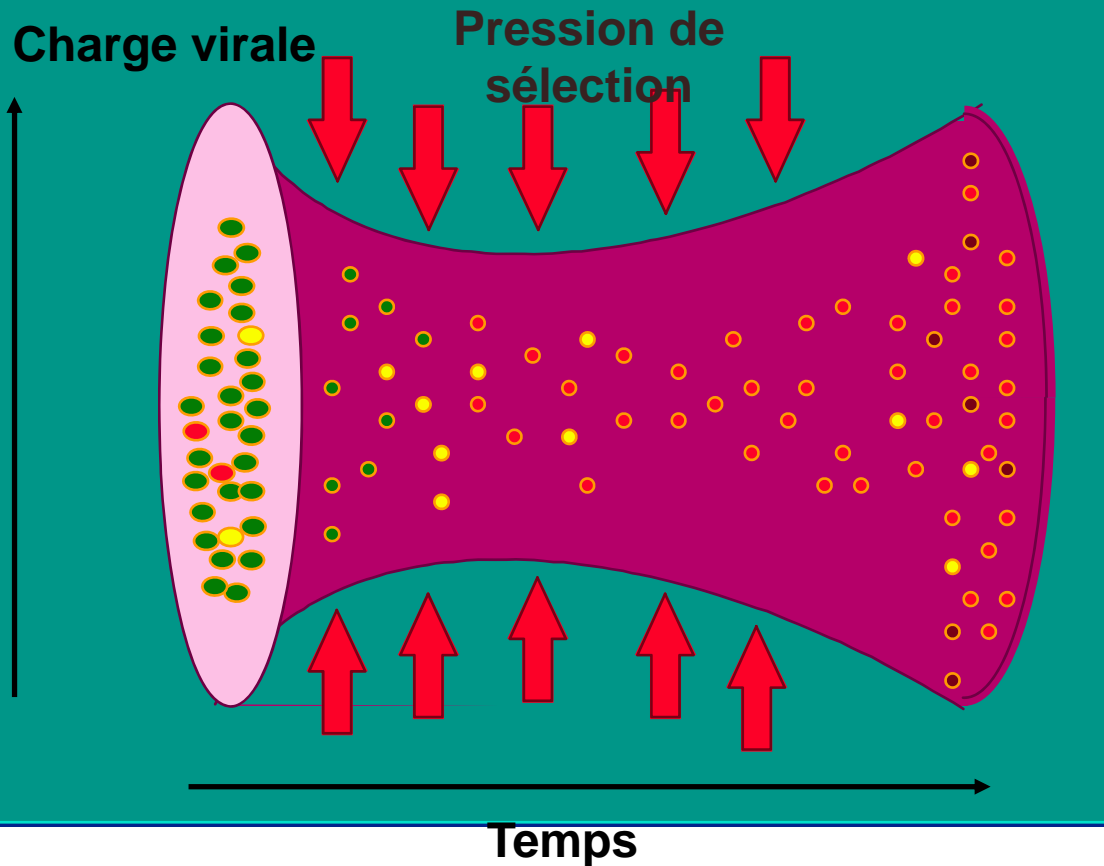
 **Souche sauvage** (Cycle viral normal)
 **Souches mutantes**


Réplication virale =>
mutations +/- favorables

Sélection



Suppression incomplète

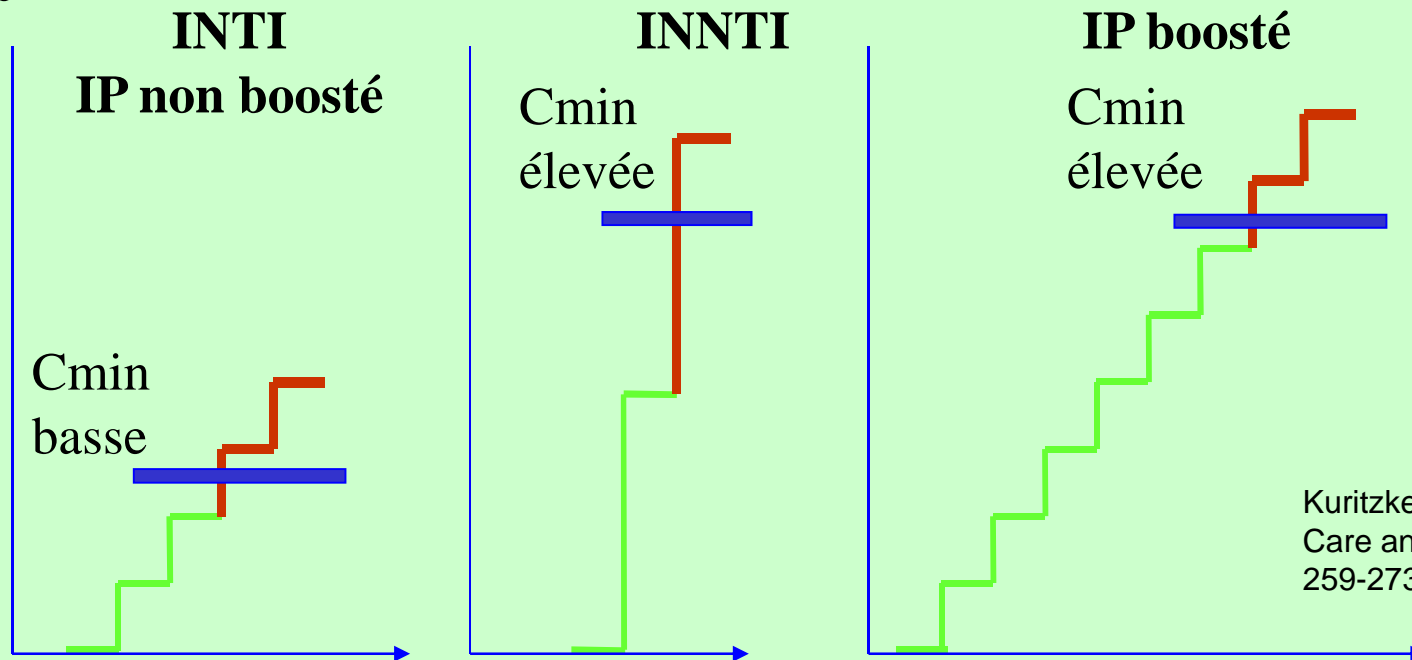


- ✓ Défaut d'observance
- ✓ Défaut de puissance
- ✓ Taux plasmatiques insuffisants
- ✓ Pré-existence de résistance
 - Echec précédent
 - Transmis

Barrière génétique

Nombre de mutations pour parvenir à la résistance

Concentrations
inhibitrices
efficaces



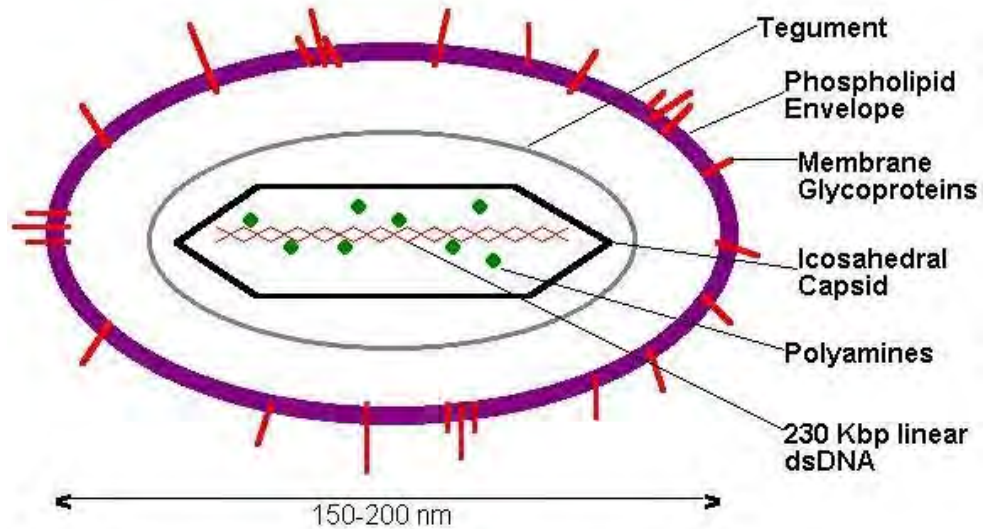
Survenue de mutations de résistance au cours du temps

Herpesvirus

- Famille des Herpesviridae

- 8 virus humains

- HSV-1
- HSV-2
- VZV
- CMV
- HHV-6
- HHV-7
- EBV
- HHV-8



Antiviraux

Mécanismes d'action des anti-herpétiques

- Analogues nucléosidiques ou nucléotidiques
 - Inhibition compétitive de l'ADN polymérase
 - Termineur de chaîne
 - Activation par phosphorylation par des kinases virales et cellulaires
 - Thymidine kinase (TK) UL23 (HSV-1, HSV-2) ORF36 (VZV)
 - UL97 (CMV)
- Pyrophosphates
 - Fixation à l'ADN polymérase
 - Inhibe le clivage du pyrophosphate des dNTP

Classes des anti-herpétiques

■ ANALOGUES NUCLEOSIDIQUES

○ Guanosine

- **Aciclovir, Valaciclovir, Fanciclovir/Penciclovir**

- **Ganciclovir**

○ Thymidine

- **Idoxuridine**

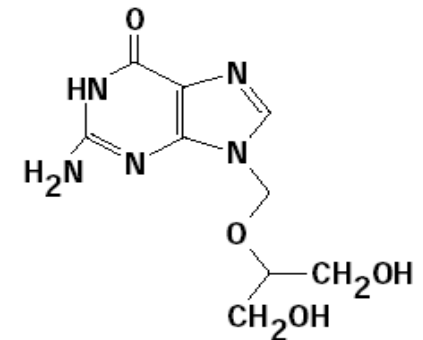
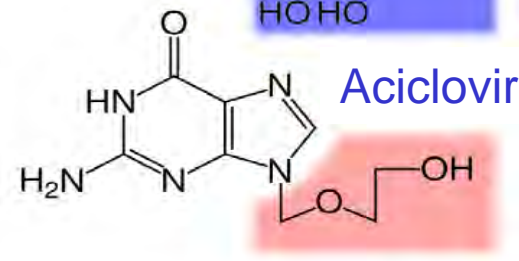
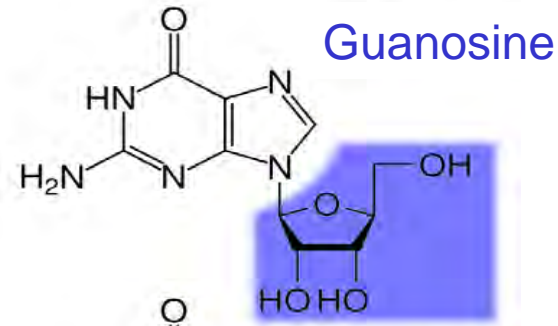
■ ANALOGUES NUCLEOTIDIQUES

○ Cytosine

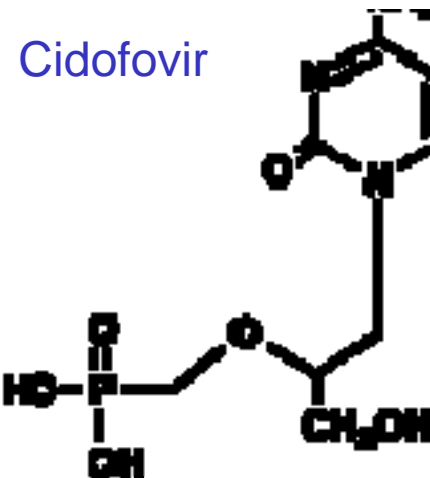
- **Cidofovir**

■ PYROPHOSPHATES

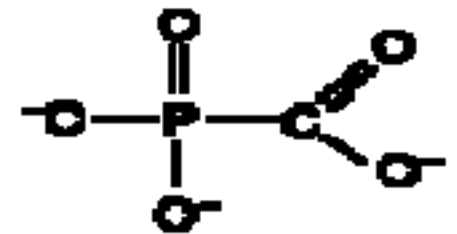
- **Foscarnet**



Ganciclovir



Foscarnet

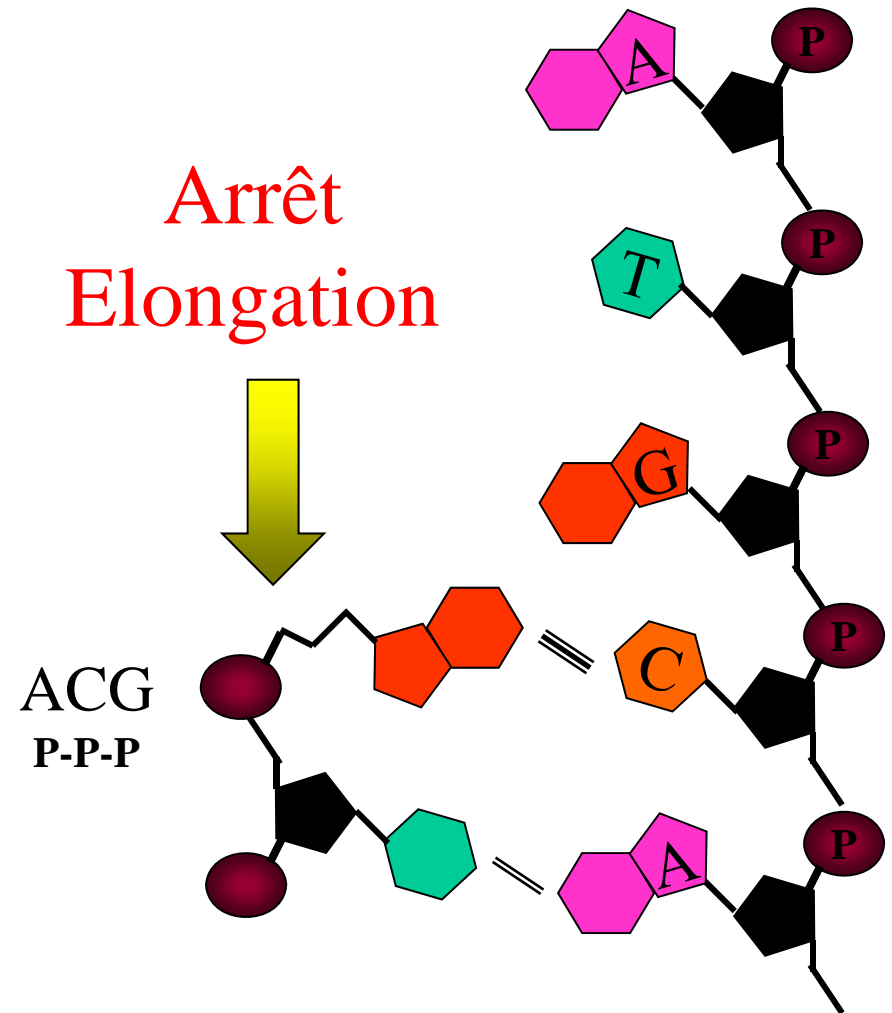


ACV agit de 2 façons

- Compétition avec le GTP
- Termineur de chaîne

Action sélective

- Activation par enzyme virale (TK)
- Affinité ACV
ADN pol virale > ADN pol cel

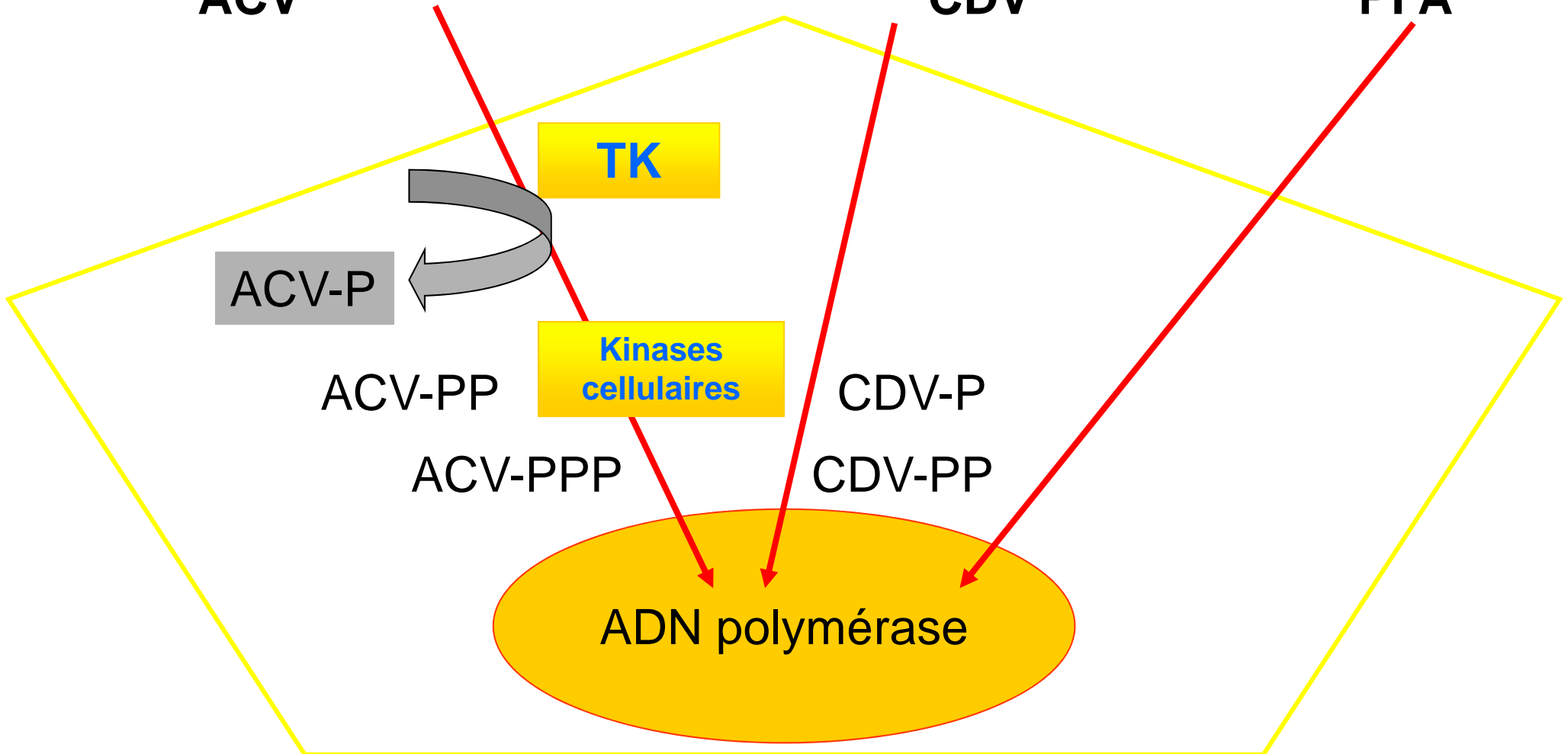


Inhibition de la réplication HSV-1 & 2, VZV

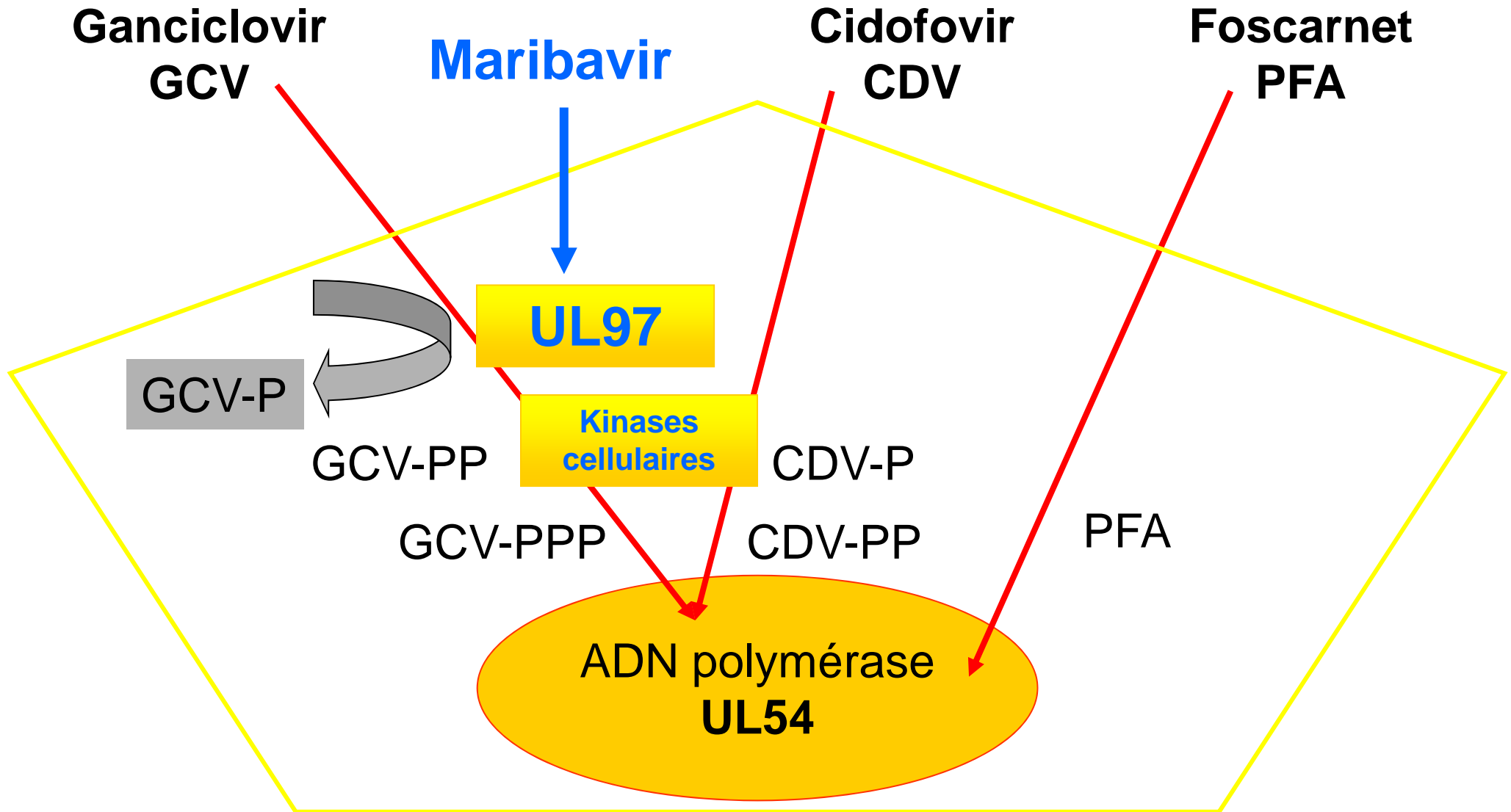
Aciclovir Penciclovir
ACV

Cidofovir
CDV

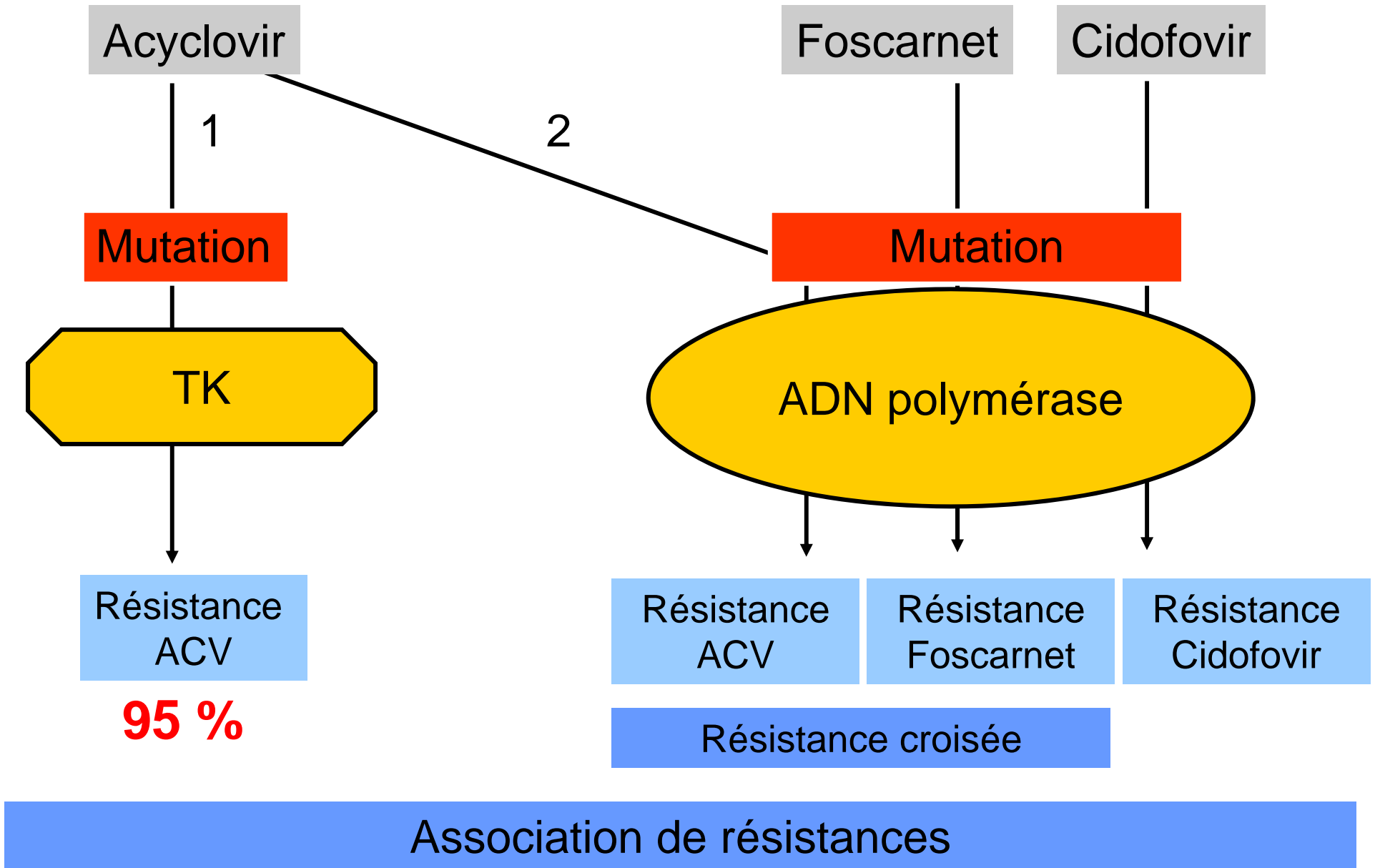
Foscarnet
PFA



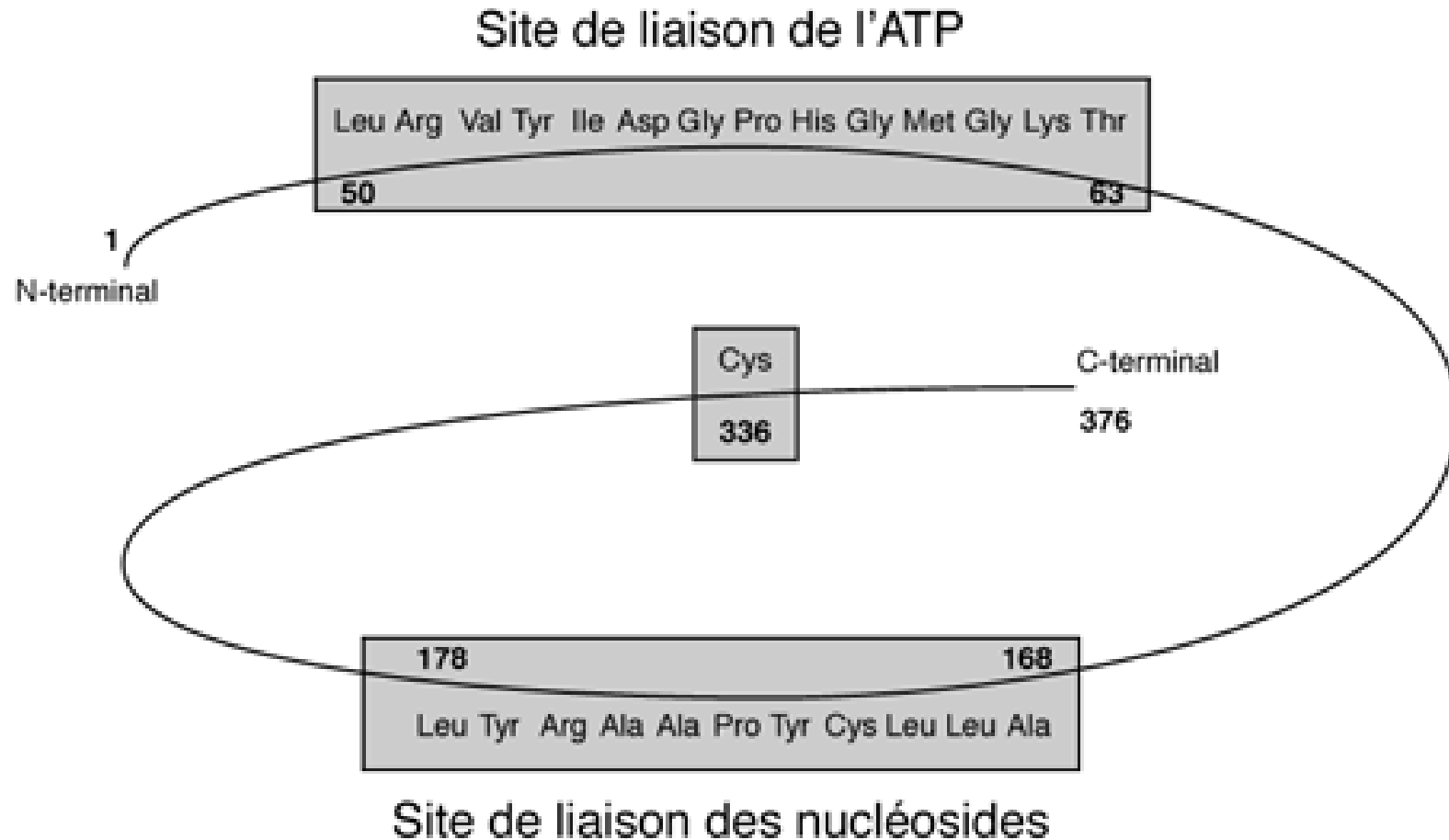
Inhibition de la réplication du CMV



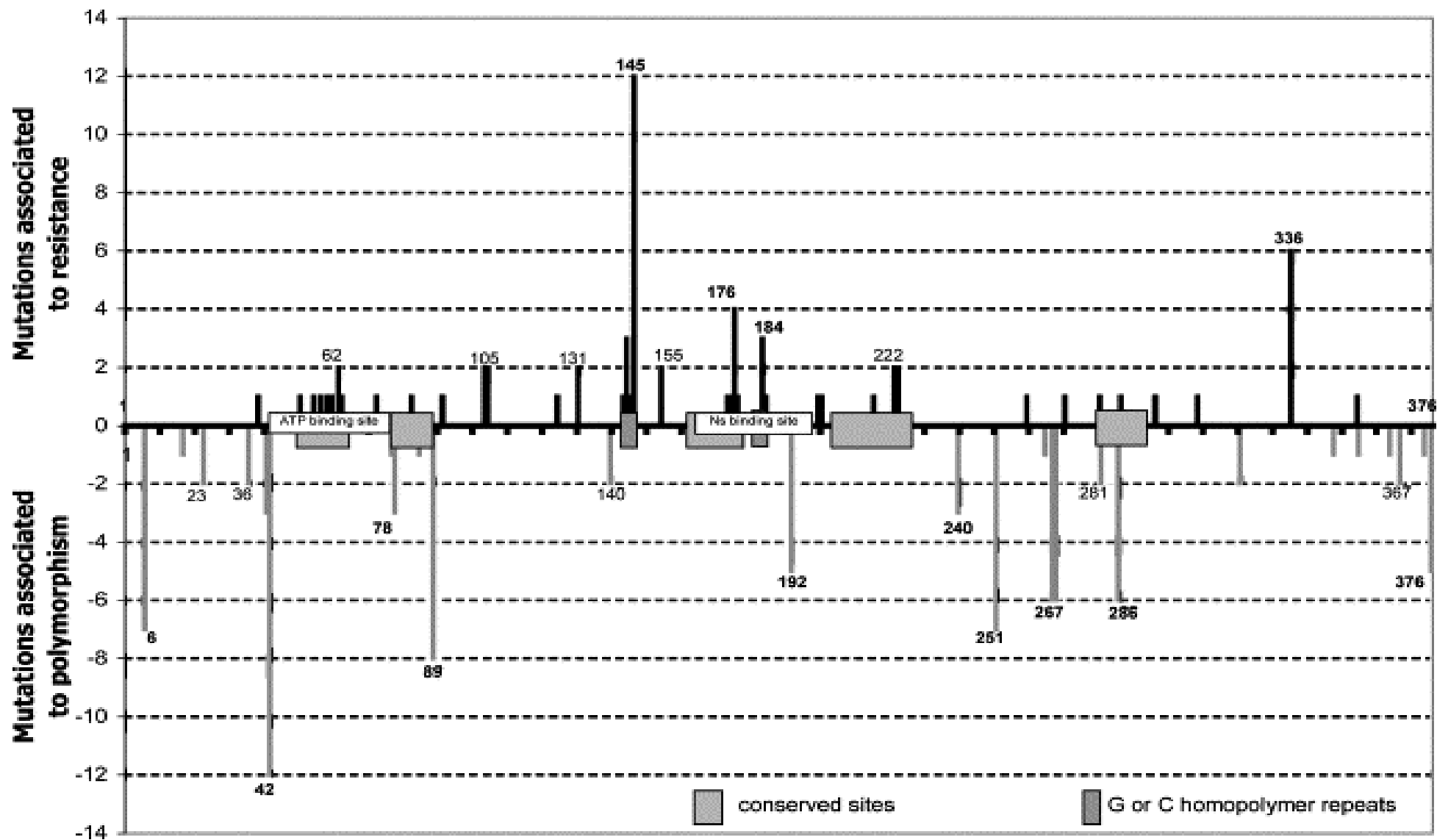
Résistance des virus HSV & VZV



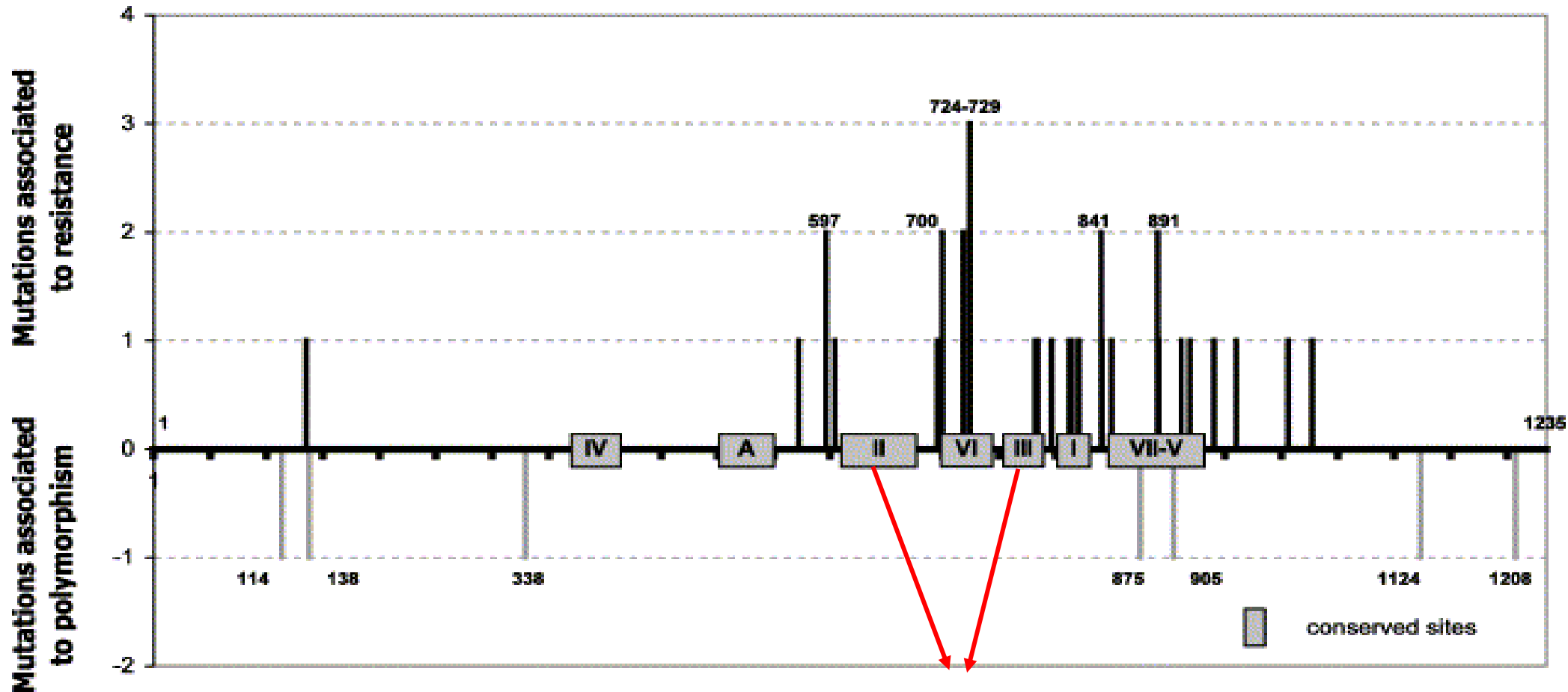
Mutations de résistance sur la TK



Mutations de résistance sur la TK 376 AA



Mutations de résistance ADN pol 1235 AA



R croisée ACV & Foscarnet

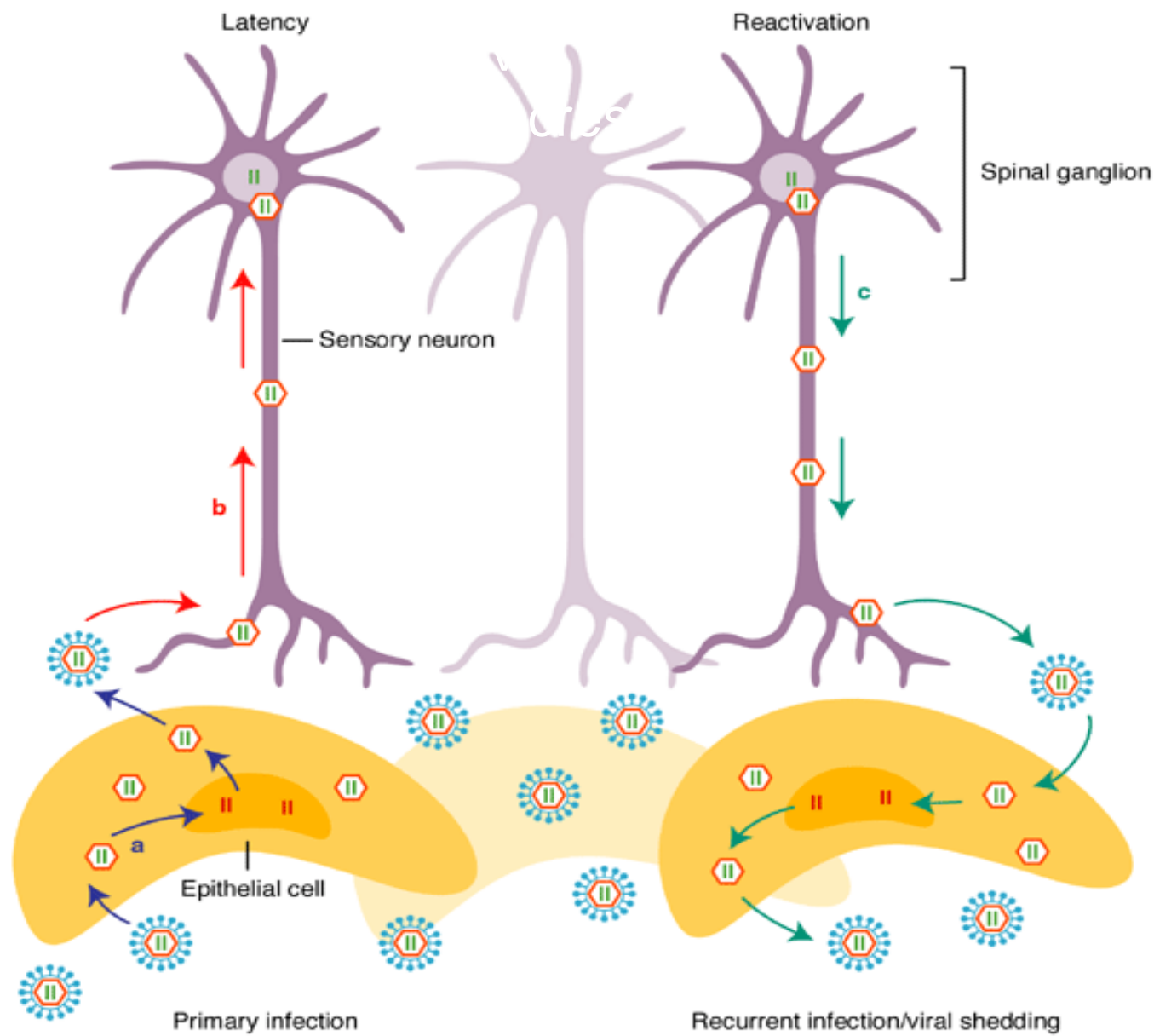
ADN polymérase ⊕ Activité proofreading

Prévalence des résistances à l'ACV

- < 1% Immunocompétent
 - Rarement associé à un échec thérapeutique
- 5 - 30% Transplantés - VIH+
 - Prévalence stable
 - + élevée chez les greffés de moelle (30%)

Résistance associée à la TK +++

- Résistance / TK + fréquente / ADN pol
- ADN pol nécessaire à la réplication virale
 - Faible taux de mutation → peu de mutations compensatrices
- TK non essentielle à la réplication virale
- Mutations TK
 - Insertion/délétion ⇔ TK déficiente (TK-)
 - Substitution ⇔ TK altérée
- TK nécessaire à la réactivation des sites de latence ganglionnaires
 - Après un épisode de résistance réactivation de virus sensibles possible



The herpes simplex virus life cycle

Impact d'un usage élargi d'ACV

■ Recommandations OMS

- Inclusion de l'ACV dans le traitement ulcérations génitales ACV
- Populations à risque d'infections / VIH / Immunodépression
- Sélection de résistance ?? Blower. Nature Medicine. 1998 – 10 – 30%

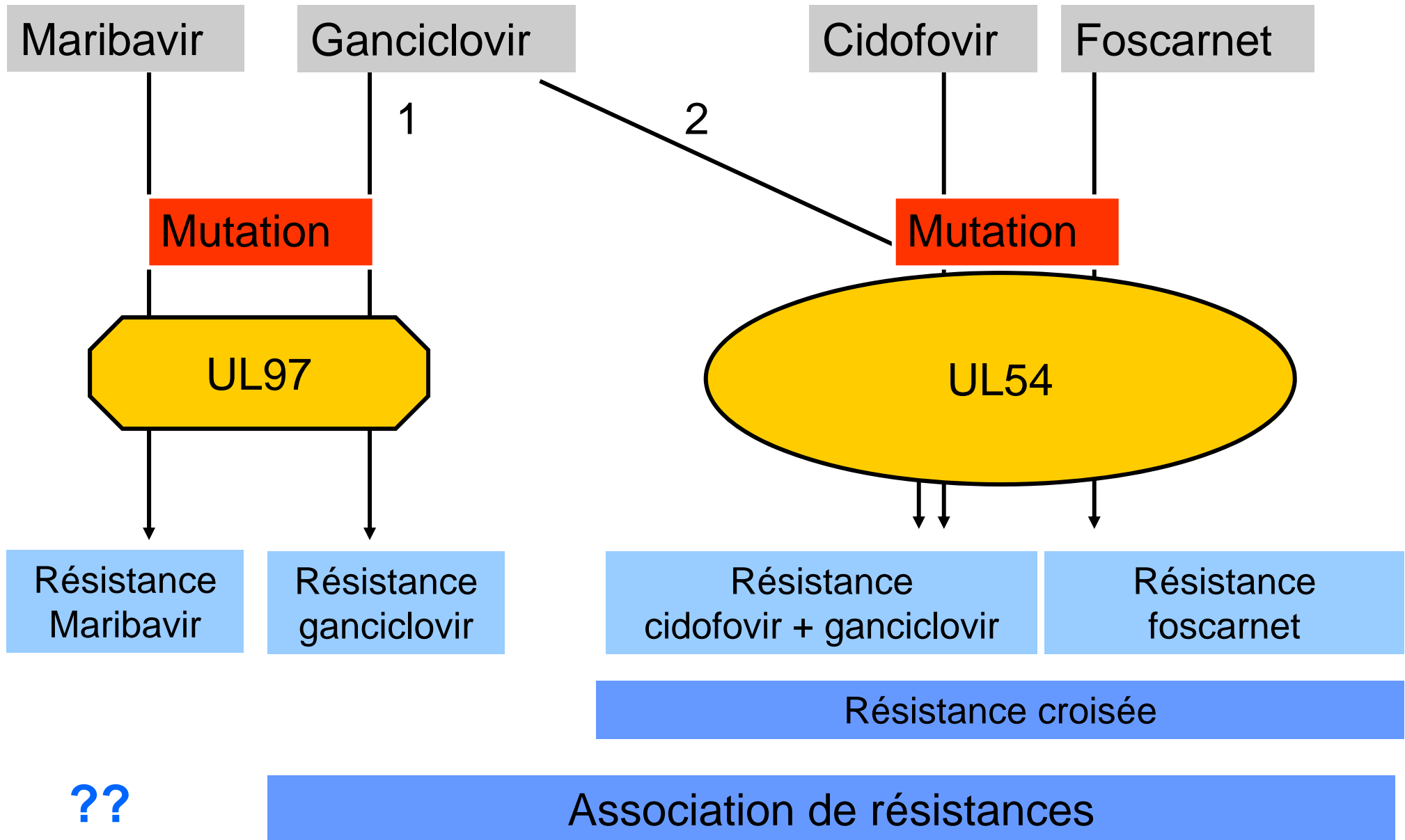
■ Essais suppressifs Watson-Jones J Clin Microb 2010

- 3 essais suppressifs ACV 400 mg x2/j (transmission / acquisition VIH)
- Analyse de 64 échantillons
- Aucune mutation de résistance détectée dans la TK

■ Essais épisodiques ??

- Traitement ulcérations génitales ACV 1200 – 1600 mg/j
- Etude en cours
 - Ghana, Rep Centrafricaine, Malawi, Burkina Faso, Afrique du Sud

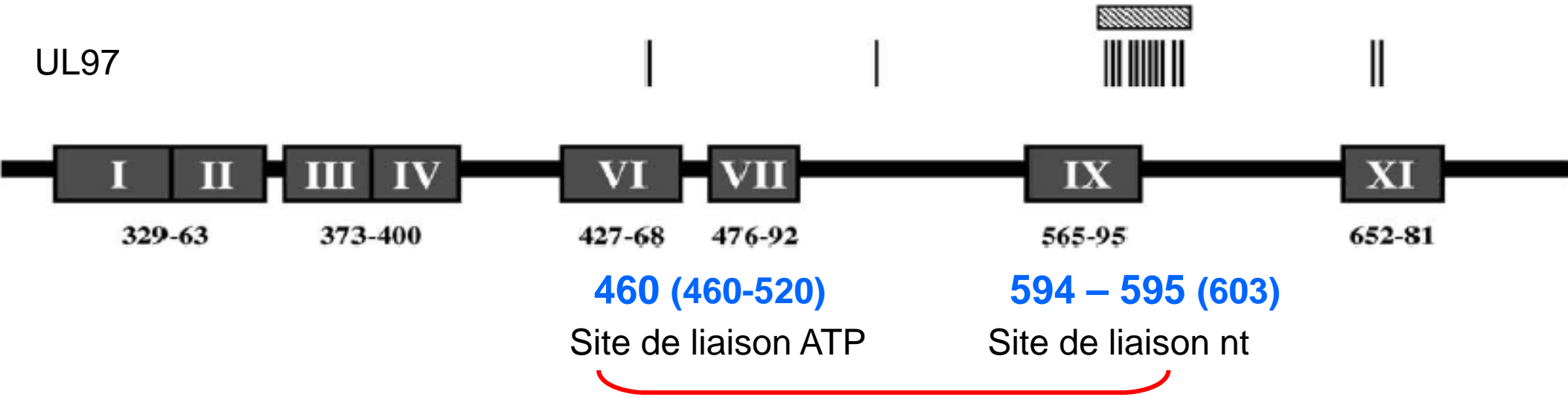
Résistance du CMV



Résistance associée à l'UL97

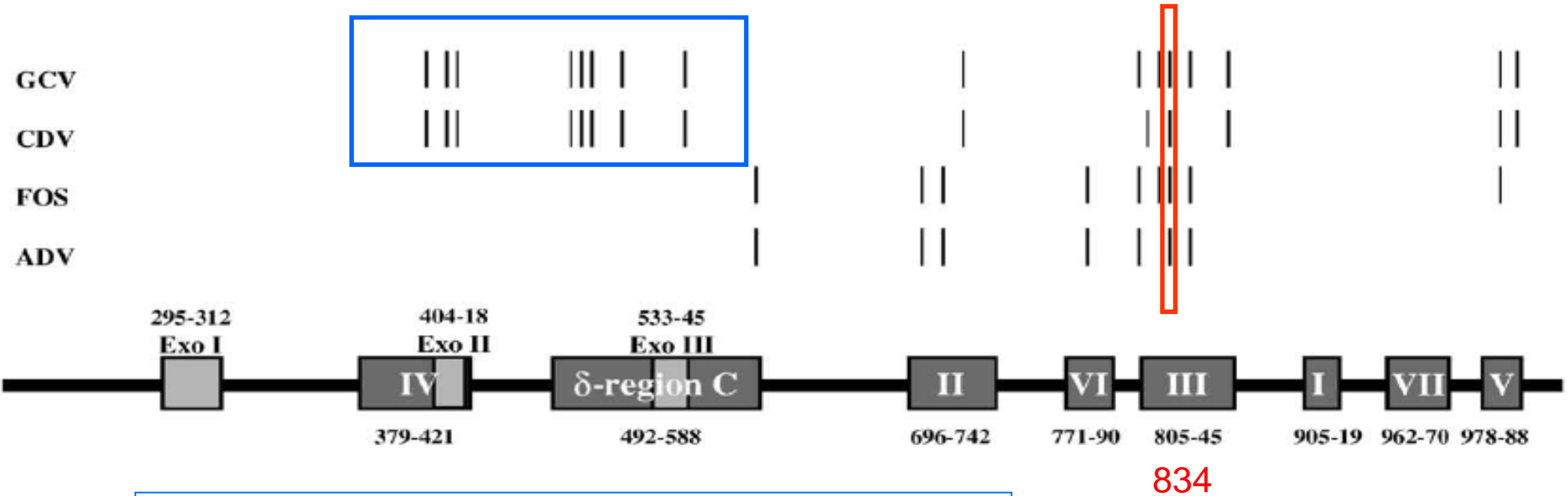
- Phosphorylation des nucléosides
- Rôle dans la synthèse de l'ADN viral et la sortie des nucléocapsides du noyau
 - Nécessaire à la réplication virale
 - Délétion UL97 ↘ 100x production virale
- Mutations
 - Substitution +++, délétion ⇨ UL97 altérée

Mutations de résistance sur l'UL97



75 % mutations de résistance GCV

Mutations de résistance sur l'UL54



Résistance croisée au GCV & CDV

Résistance croisée au GCV, CDV & PFA

Prévalence des résistances du CMV

- Résistance au ganciclovir après transplantation d'organe (Lurain JID 2002)
 - 9,5% chez les patients présentant une infection active à CMV
 - 15,2% après transplantation pulmonaire
- Résistance après prophylaxie possible < 5%
 - Sous valaciclovir (Alain et al., J Med Virol. , 2004)
 - Sous ganciclovir oral (Boivin et al., JID 2004)
 - Sous valganciclovir (Humar 2005, Boutolleau 2009; Hanz 2010)
- Aucune donnée de cohorte n'est disponible après greffe de CSH (PHRC national *Pr S Alain*)

Méthodes de détection des résistances

Phénotype

- Définit la concentration inhibitrice 50% (IC₅₀) et 90% de l'antiviral testé
- Etudie le comportement du virus quel que soit l'antiviral ou les mutations (nouveaux antiviraux)

Inconvénients

- Nécessite l'isolement du virus en culture cellulaire
- Long et difficile à standardiser



Foyer de
Cellules infectées

Méthodes de détection des résistances

Génotypage par séquençage

- Recherche les mutations de résistance dans TK / *UL97*, et ADN pol / *UL54*
- Directement dans le prélèvement
- Plus sensible que le phénotype
- Permet la détection de nouvelles mutations

Problèmes

- Sensibilité variable des méthodes de génotypage : de 10% à 50%
- Difficultés d'amplification de l'ADN pol - % GC élevé
- Absence de banque de données sur les mutations de résistances
 - Interprétation

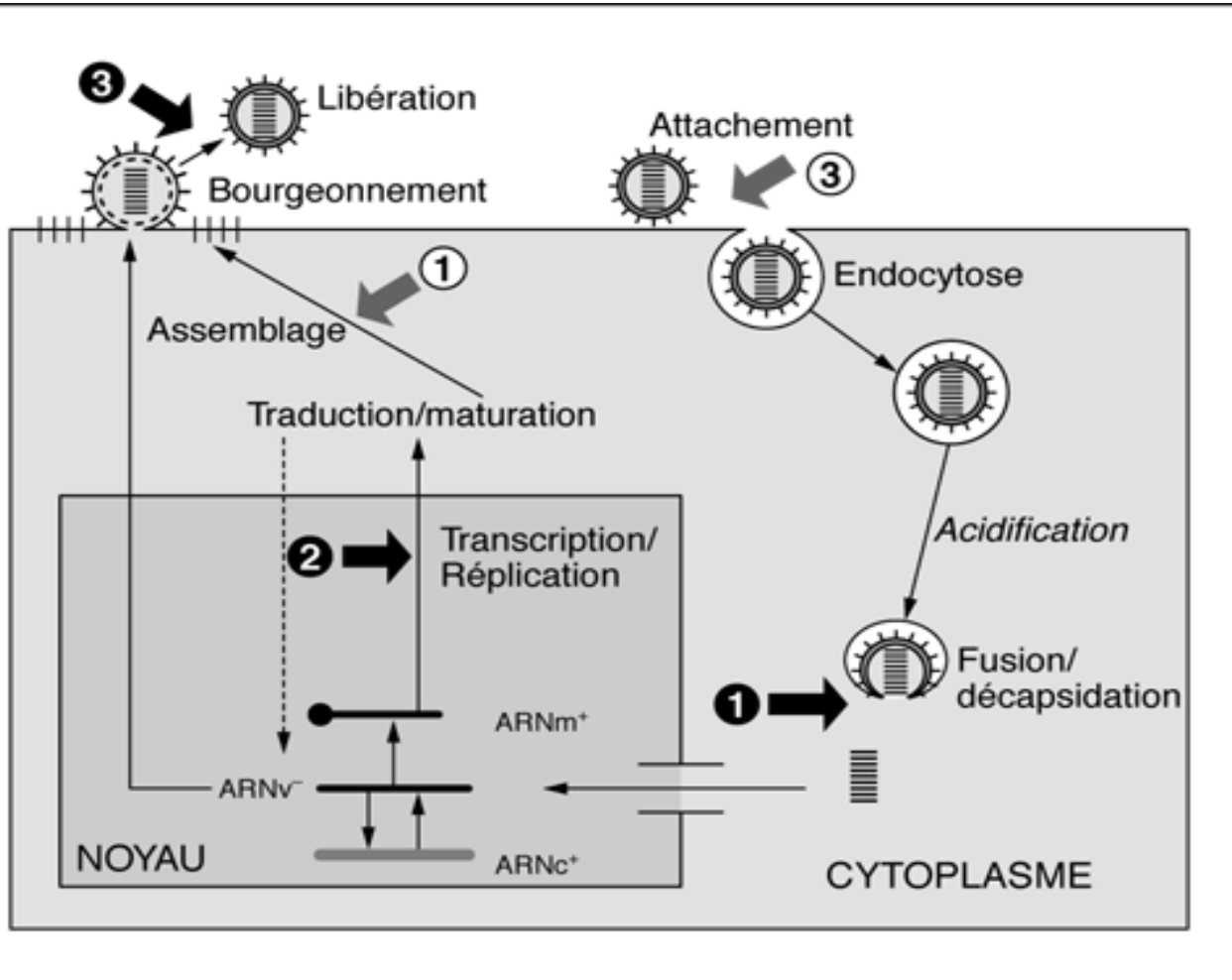
HSV1
TK

C6G	R51W	L170P
A12P	Y53=STOP	R176W
Y14D	P57H	R222H +E 273K
R20S	K62N	L139F
N23S	T63I	A207P
R30C	T103=STOP	R216P
R32C	Q104H	N23S K36E R89Q A265T V348I
K36E	H105P	G200S
K36D	G144R	
R41H	D162A	
R41Q	R176Q	
L42P	A189V	
M85 I	T201P	
R89Q	R216C	
E111K	R220C	
V138I	R222C	
L139F	L227F	
A140V	R281 =STOP	
E146G	L297S	
H151Y	C336Y	
F161L	L341=STOP	
V191A	-1C 58	
A192V	-4A 61-63	
G240E	-/+7G E9:F10143-146	
A243S	-1G 145-146=STOP 545	
G251C	-5C 153-155	
A265T	-/+ 6C 182-184	
V267L	+1C 184-185 =STOP 682	
P268T	-4C 222-224	
A272T	-3G 292-293	
E273Q	-5C 298-300	
E273K	-1G 333=frameshift	
P274T	+1G 437-438 = Stop 228	
S276G	+1G 437-438 = Stop 225	
R281Q	+1C 464-465 = Stop 228	
D286E	-1C 553 = frameshift	
A294V	-1G 856 = frameshift	
G302S		
H323Y		
L327M		
D328E		
S332P		
A334T		
C336Y		
V348I		
S357C		
N376H		
N376P		

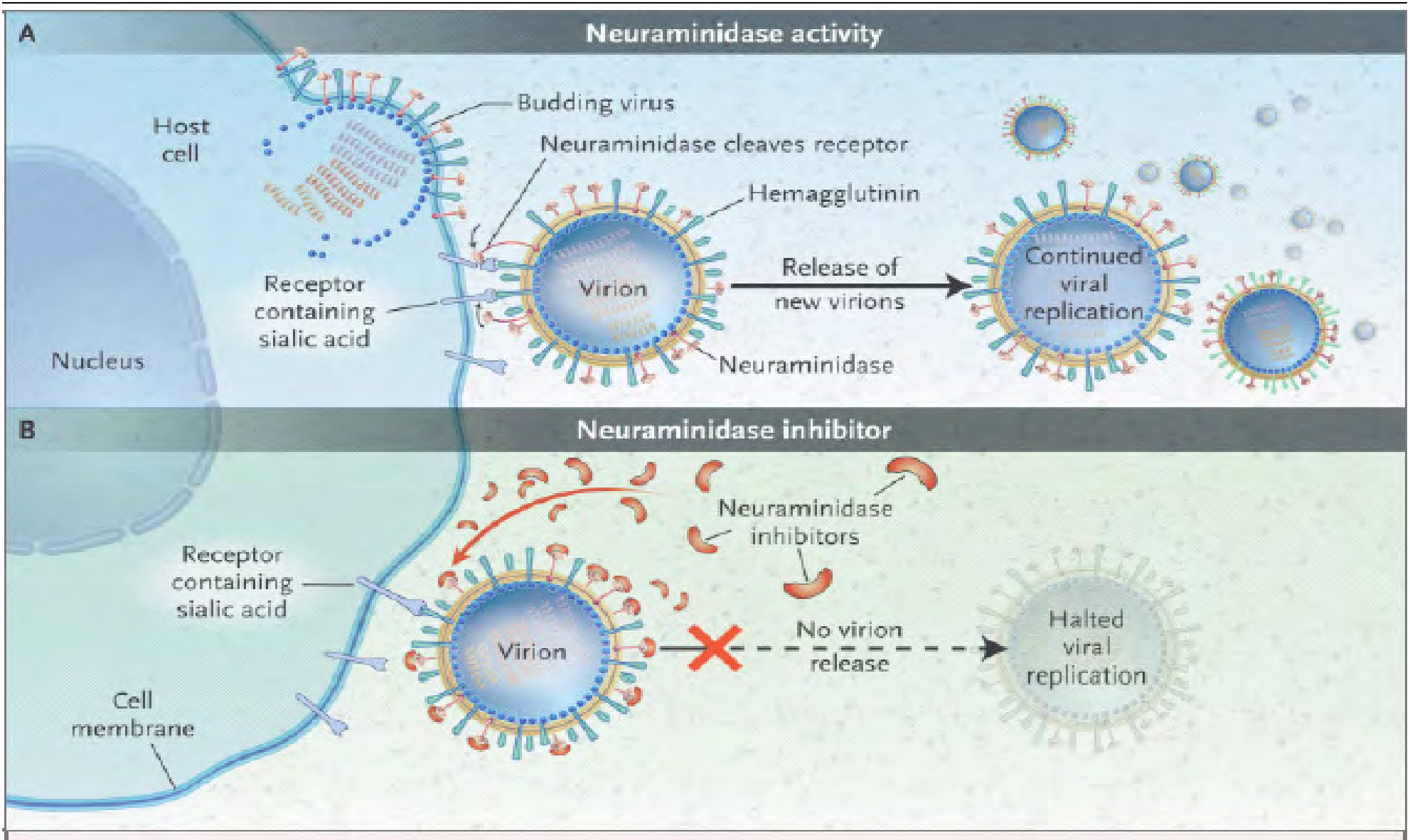
HSV1
ADN PoI

Position	Variant	Annotation
1	SKA	SKA
2	SKA	SKA
3	SKA	SKA
4	SKA	SKA
5	SKA	SKA
6	SKA	SKA
7	SKA	SKA
8	SKA	SKA
9	SKA	SKA
10	SKA	SKA
11	SKA	SKA
12	SKA	SKA
13	SKA	SKA
14	SKA	SKA
15	SKA	SKA
16	SKA	SKA
17	SKA	SKA
18	SKA	SKA
19	SKA	SKA
20	SKA	SKA
21	SKA	SKA
22	SKA	SKA
23	SKA	SKA
24	SKA	SKA
25	SKA	SKA
26	SKA	SKA
27	SKA	SKA
28	SKA	SKA
29	SKA	SKA
30	SKA	SKA
31	SKA	SKA
32	SKA	SKA
33	SKA	SKA
34	SKA	SKA
35	SKA	SKA
36	SKA	SKA
37	SKA	SKA
38	SKA	SKA
39	SKA	SKA
40	SKA	SKA
41	SKA	SKA
42	SKA	SKA
43	SKA	SKA
44	SKA	SKA
45	SKA	SKA
46	SKA	SKA
47	SKA	SKA
48	SKA	SKA
49	SKA	SKA
50	SKA	SKA
51	SKA	SKA
52	SKA	SKA
53	SKA	SKA
54	SKA	SKA
55	SKA	SKA
56	SKA	SKA
57	SKA	SKA
58	SKA	SKA
59	SKA	SKA
60	SKA	SKA
61	SKA	SKA
62	SKA	SKA
63	SKA	SKA
64	SKA	SKA
65	SKA	SKA
66	SKA	SKA
67	SKA	SKA
68	SKA	SKA
69	SKA	SKA
70	SKA	SKA
71	SKA	SKA
72	SKA	SKA
73	SKA	SKA
74	SKA	SKA
75	SKA	SKA
76	SKA	SKA
77	SKA	SKA
78	SKA	SKA
79	SKA	SKA
80	SKA	SKA
81	SKA	SKA
82	SKA	SKA
83	SKA	SKA
84	SKA	SKA
85	SKA	SKA
86	SKA	SKA
87	SKA	SKA
88	SKA	SKA
89	SKA	SKA
90	SKA	SKA
91	SKA	SKA
92	SKA	SKA
93	SKA	SKA
94	SKA	SKA
95	SKA	SKA
96	SKA	SKA
97	SKA	SKA
98	SKA	SKA
99	SKA	SKA
100	SKA	SKA

Antigrippaux



- 1 Amantadine, rimantadine
- 2 Ribavirine
- 3 Inhibiteurs neuraminidase
 - Zanamivir-Relenza®
 - Oseltamivir-Tamiflu®



Résistance virus H1N1

■ H1N1 « non pandémique » (Brisbane)

- 2008 ~ 100% résistant à l'oseltamivir
- Mutation H275Y dans la NA – barrière génétique basse
- H275Y ↘ activité neuraminidasique de surface et capacités répliquatives
- Mutations de compensation (R194G, R222Q, V234M) restaurent l'activité

■ H1N1(2009)

- Mutation H275Y plus rare
- Disparaît après la pression de sélection
- Potentiel d'évolution ??

Emergence d'une résistance croisée à l'oseltamivir et au zanamivir

- Patient allogreffé en rechute d'une leucémie
- Infection respiratoire aiguë non sévère

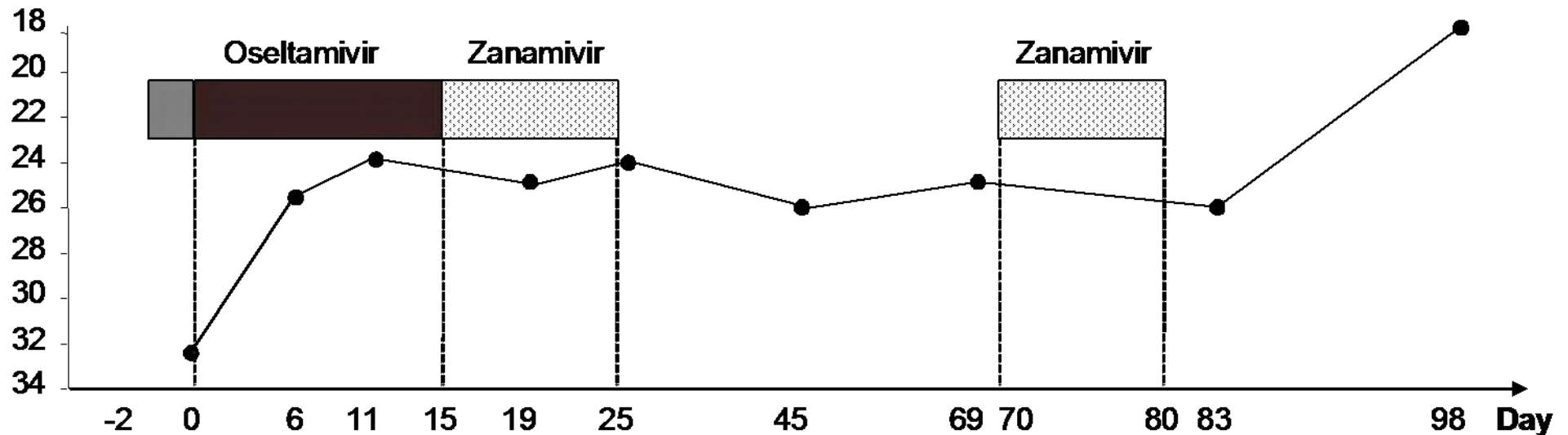
Fièvre, rhinite, toux, diarrhée pendant 10 j avant consultation urgences

Rx thorax normale

Pansinusite

Décès J140

N1 Ct values



Potentiel évolutif virus H1N12009

- 2 rapports similaires
 - Patients immunodéprimés
 - Boucher, NEJM 2010 – Nguyen CID 2010
- Acquisition de mutations de R (275Y, 223R)
- Résistance croisée
- Accumulation de mutations secondaires
- Restauration de la fitness virale de virus R et potentiel de diffusion ?

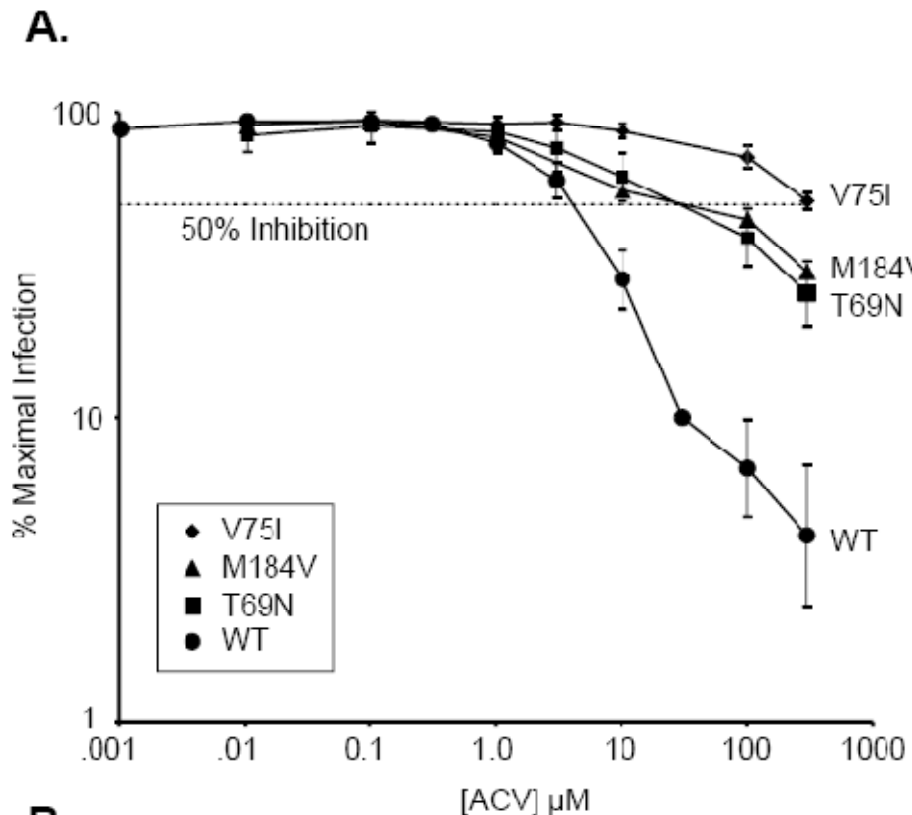
Impact de l'ACV sur la replication

VIH

- Inhibition directe du VIH $CI_{50}=5\mu M$ / Compétition avec dGTP HIV RT
- Cellules co-infectées par un herpesvirus ou non

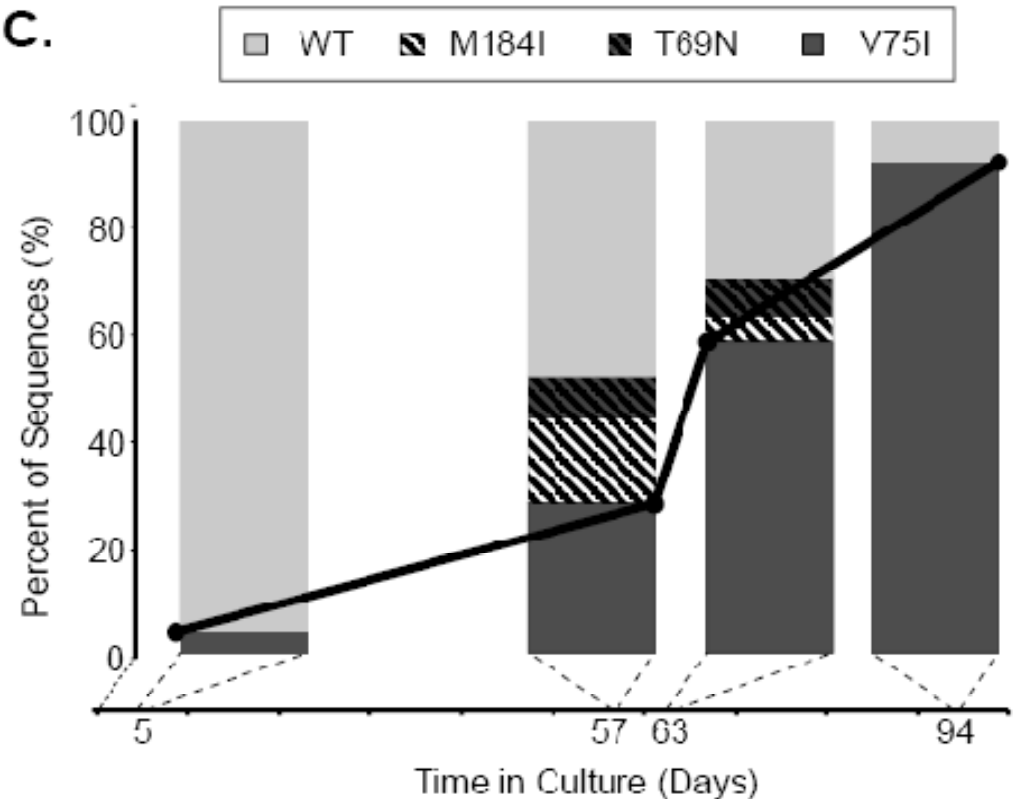
McMahon, J Biol Chem 2008

Lisco, Cell host Microb, 2008



B.

C.



Impact de l'ACV sur la réplication VIH

- Effet direct de l'ACV sur la réduction de la CV VIH ?
- Conséquences sur la sélection de mutations
- Traitement en monothérapie ACV ?
- Choix du traitement ARV chez les patients ayant reçu de l'ACV

Analyse d'un essai suppressif

Effect of Herpes Simplex Suppression on Incidence of HIV among Women in Tanzania

Deborah Watson-Jones, M.D., Ph.D., Helen A. Weiss, Ph.D.,
Mary Rusizoka, Dip.Med., John Changalucha, M.Sc., Kathy Baisley, M.Sc.,
Kokugonza Mugeye, Dip.Med., Clare Tanton, M.Sc., David Ross, M.D., Ph.D.,
Dean Everett, Ph.D., Tim Clayton, M.Sc., Rebecca Balira, M.Sc.,
Louise Knight, M.Sc., Ian Hambleton, Ph.D., Jerome Le Goff, M.Sc., Ph.D.,
Laurent Belec, M.Sc., Ph.D., and Richard Hayes, D.Sc.*

- Femmes recevant ACV 400 mg x 2/j
- Observance élevée (>90%)
- ARN VIH > 3 log₁₀ copies/ml après 12 mois
- 21 plasma disponibles
 - Absence de mutations V75I, T69N, M184I
 - Aucune autre mutation de résistance dans RT

Pas d'impact de l'ACV sur la sensibilité du VIH aux NRTI

Impact de l'ACV sur la réplication VIH

- 183 VIH+ ACV ou VAL
 - 8 semaines à 24 mois
 - n = 31 Peru, n = 14 US, n = 117 from Kenya & Botswana, n=21 Tanzania
 - Pas de sélection de mutation de résistance aux NRTI
- Concentrations plasmatiques après 400 mg x2/j < 1 μ M, 5 fois < IC50 pour le VIH

CONCLUSION

- Virus ARN
 - Sélection rapide de mutations de résistance
 - Surveillance – adaptation traitement
 - Potentiel de diffusion des résistances
- Virus ADN
 - Résistances moins fréquentes - Pas de transmission
 - Impasse thérapeutique
 - Dosage des antiviraux (ganciclovir, valganciclovir +++)
 - Relais traitement IV / traitement per os
 - Indéteçtabilité
- Multithérapies ???
 - Nouvelles cibles