

## **Chimiothérapie antivirale**

### **PLAN**

- I. Introduction**
- II. Cibles des antiviraux**
- III. Les différentes classes d'antiviraux**
- IV. Méthodes d'étude de la sensibilité aux antiviraux**
- V. Surveillance virologique du traitement antiviral : Mesure in vivo de la décroissance de la charge virale**
- VI. Limites de la chimiothérapie antivirales**

### **OBJECTIFS :**

- Énumérer les cibles des antiviraux
- Connaître les différentes classes d'antiviraux
- Maîtriser les méthodes d'étude de la sensibilité aux antiviraux

## I. Introduction :

L'émergence d'infections virales persistantes et mortelles telle que le sida et l'hépatite C a été à l'origine de la relance des recherches sur le développement de nouvelles molécules et de nouveaux concepts en thérapie antivirale. La stratégie consistant à cibler les enzymes virales spécifiques a abouti à des traitements anti-VIH très efficaces, aussi l'utilisation d'associations médicamenteuses a permis d'obtenir de bons résultats (trithérapie).

## II. Cibles des antiviraux :

Le cycle de multiplication intracellulaire des virus se décompose en six étapes: (1) Attachement du virus sur des récepteurs de la membrane cellulaire. (2) **Pénétration** (endocytose ou fusion), (3) **Décapsidation** et **libération** du génome viral, (4) **Réplication**, (5) **Assemblage** et **maturation** des nouveaux virus et enfin (6) **libération** des virions néo-formés. Ces six étapes sont des cibles potentielles des antiviraux, la majorité de ces derniers n'agissent actuellement que pendant la phase de réplication.

## III. Les différentes classes d'antiviraux :

### 1. Les inhibiteurs de la pénétration :

-les **Inhibiteurs de fusion** :

#### **L'enfuvirtide : T20**

Le T20 Est un peptide synthétique qui, en se liant à gp 41 du VIH, empêche le changement de conformation requis pour la fusion de l'enveloppe avec la membrane de la cellule. Il inhibe ainsi l'entrée du HIV dans les cellules hôtes.

### 2. Inhibiteurs de la décapsidation :

#### **Amantadine et la Rimantadine :**

Les deux molécules sont actives sur le virus influenza de type A en bloquant le canal ionique de la protéine virale M2 ; L'absence d'acidification qui en résulte bloque la décapsidation des virions endocytés.

Elles ont été utilisées dans la prévention et le traitement de la grippe A.

L'élimination de l'amantadine est rénale cependant que la rimantadine est métabolisée dans le foie.

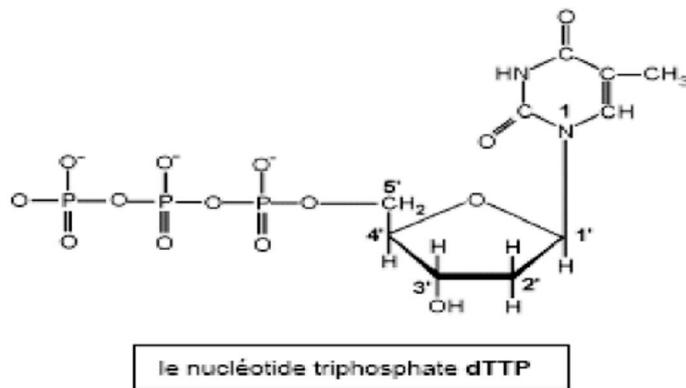
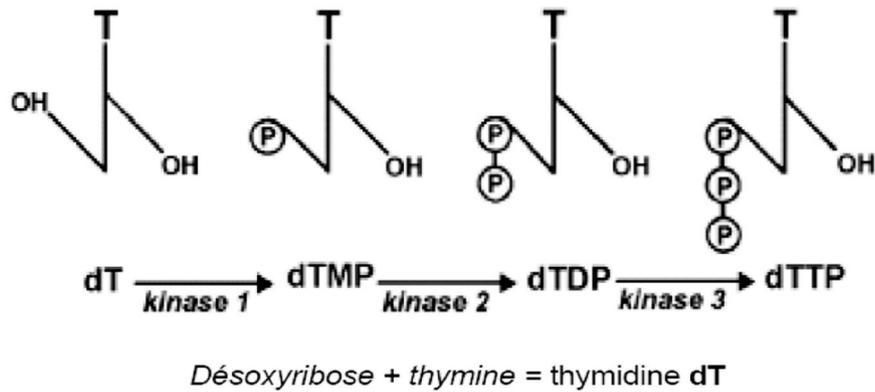
### 3. Les inhibiteurs de la réplication :

#### a) **Les analogues du substrat de l'enzyme.**

##### ► **les analogues des nucléosides :**

Un **nucléoside** correspond à un sucre+une base.

Il est phosphorylé en nucléotide par des kinases au niveau du cytoplasme des cellules.



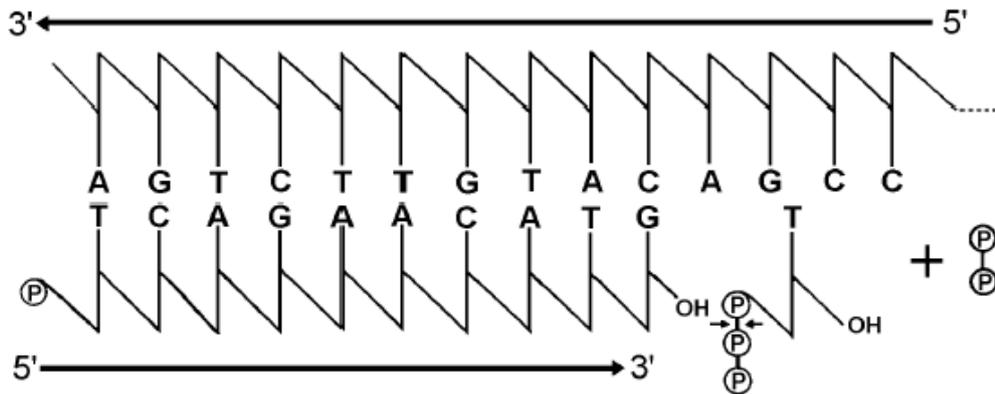
Les désoxyribonucléotides triphosphates des quarts bases sont des substrats des ADN polymérase. Les nucléosides sont modifiés au niveau du sucre ou, rarement, au niveau de la base.

Tous les inhibiteurs nucléosidiques sont des *pro-médicaments* : ils subissent une **triphosphorylation** intracellulaire conduisant au dérivé actif (une triple phosphorylation est nécessaire pour qu'ils entrent en compétition avec les métabolites « normaux »).

#### -Modes d'action :

*Les analogues de nucléosides* vont perturber la réplication par deux mécanismes :

- ▶ **L'inhibition compétitive** : l'analogue entre en compétition avec les nucléotides normaux pour le site actif de l'enzyme virale qu'il inactive.
- ▶ **la terminaison de chaîne** : Cette terminaison résulte de l'incorporation dans la chaîne en élongation d'un **analogue** structural, à base azotée ou à sucre modifié, dépourvu d'un OH en 3'. Comme ces composés ne présentent pas de groupement 3'-OH, leur incorporation produit une terminaison de la synthèse de la chaîne d'ADN entraînant l'effet antiviral. Exemple : didéoxyinosine ou ddI, didéoxycytidine ou ddC, didéoxyadénosine ou ddA, lamivudine, ou 3TC (analogue lévogyre de la didéoxycytidine, utilisée contre le virus de l'hépatite B).



## -Les différentes classes d'inhibiteurs nucléosidiques

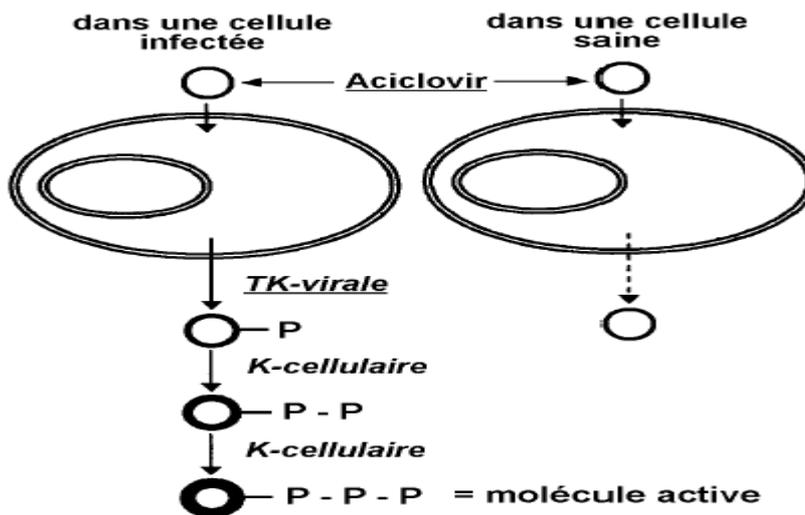
On trouve parmi ces composés un certain nombre de molécules utilisées contre le VIH. Ces substances à spectre étroit, ont souvent une certaine toxicité pour les enzymes cellulaires. Leur activité découle de diverses modifications :

### a. Analogue nucléosidique par substitution du sucre :

#### ► Acycloguanosine (acyclovir, Zovirax):

L'acyclovir est un analogue de la 2<sup>o</sup> désoxyguanosine, pour être active, elle doit d'abord être monophosphorylée puis di et triphosphorylée aboutissant ainsi à l'Acycloguanosine-triphosphate (l'ACG-TP).

L'ACG-TP va inhiber la synthèse de l'ADN viral en entrant en compétition avec la 2<sup>o</sup> désoxyguanosine-triphosphate pour l'accès à l'ADN polymérase de plus elle va être incorporée dans la chaîne d'ADN sans pouvoir en être excisée par la 3<sup>o</sup>5<sup>o</sup> exonucléase et entraîne ainsi l'inactivation de l'ADN polymérase.



L'acyclovir est un inhibiteur nucléosidique ne présentant pratiquement pas de cytotoxicité parce que:

1. la première phosphorylation de l'ACV en ACV-MP n'est réalisée que par la **thymidine-kinase virale**. Les deux suivantes sont assurées par des kinases cellulaires. ainsi le produit actif, l'ACV-TP n'est présent que dans les cellules infectées.

2. L'affinité de l'ADN polymérase **virale** pour l'ACV-TP est plus élevée que celle de l'ADN polymérase **cellulaire**.

Enfin son spectre d'action est étroit : HSV-1, HSV-2 et VZV.

► **Gancyclovir :**

Cette molécule diffère de l'acyclovir par l'adjonction d'un groupement hydroxy-méthyle en position 3'. Le gancyclovir est phosphorylé par une phosphotransférase codée par le CMV dans la cellule infectée ; le gancyclovir est donc un traitement de choix de l'infection à CMV.

C'est un antiviral toxique (toxicité médullaire), qui n'est utilisé que dans le traitement des **infections sévères** chez les immunodéprimés, au cours du sida ou après une greffe.

Valacyclovir et famcyclovir sont des dérivés à biodisponibilité orale améliorée par rapport aux gancyclovir et son dérivé pencyclovir.

► **Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse :**

Les inhibiteurs nucléosidiques aussi appelés les analogues de nucléosides sont incorporés dans la chaîne d'ADN par la transcriptase inverse et qui vont bloquer l'élongation de cette chaîne.

DCI		Nom chimique
1 - zidovudine	AZT	Azidothymidine
2 - lamivudine	3TC	Déoxythiacidine
3 - abacavir	ABC	Analogue de la guanosine
4 - didanosine	ddI	Didéoxyinosine
5 - stavudine	d4T	Didéhydrodidéoxythymidine
6 - zalcitabine	ddC	Didéoxycytidine

Combivir = zidovudine + lamivudine.

Trizivir = zidovudine + lamivudine + abacavir.

Le HIV ne codant aucune kinase, les analogues sont phosphorylés par les **kinases cellulaires**.

**Toxicité cellulaire des analogues :**

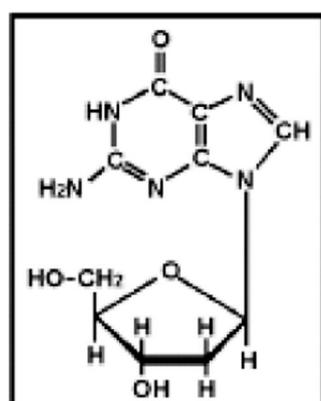
Les analogues inhibent l'ADN polymérase mitochondriale, et entraînent à long terme le développement de toxicités diverses :

L'**AZT** : toxicité **hématologique** (anémies et neutropénies).

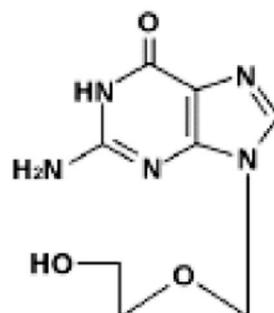
Les **ddI**, **d4T** et **ddC** : **neuropathies** périphériques douloureuses.

Les **ddi** et **d4T** : **pancréatites** aiguës. (L'arrêt du traitement est obligatoire).

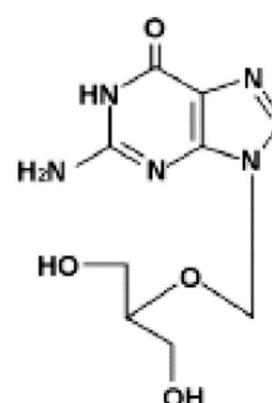
## Inhibiteurs nucléosidiques :



guanosine

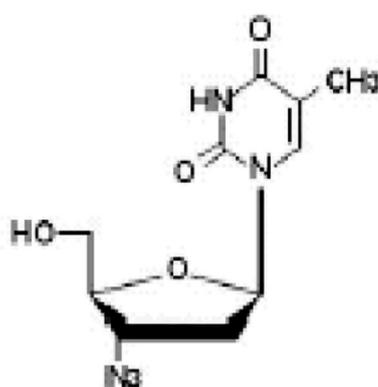


Aciclovir  
Zovirax

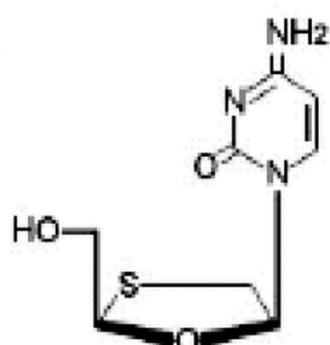


Ganciclovir  
Cymévan

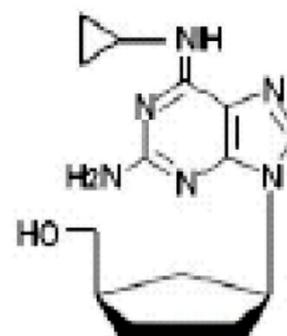
## Les inhibiteurs nucléosidiques de la RT du HIV :



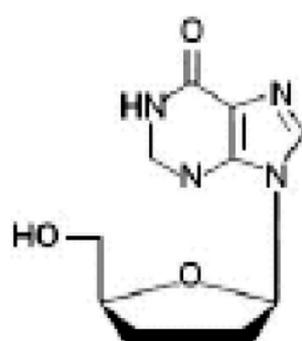
Zidovudine (AZT)



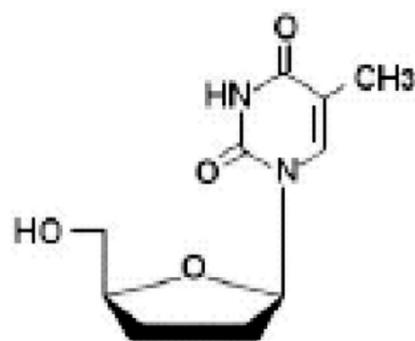
Lamivudine (3TC)



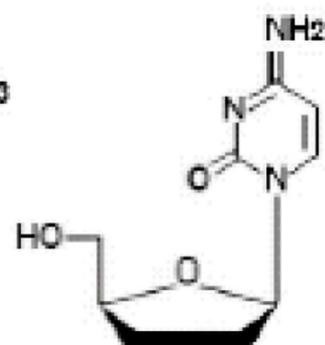
Abacavir (ABC)



Didanosine (ddI)



Stavudine (d4T)



Zalcitabine (ddC)

## b) Analogue nucleosidique par substitution de la base :

### ► La ribavirine :

La ribavirine est un analogue de ribonucléoside : la base dérive de la **guanine**, mais le sucre reste le **ribose**.

Cet analogue doit être triphosphorylé pour agir interférant avec des événements précoces de la transcription virale tels que l'acquisition de la coiffe et l'élongation des ARN messagers viraux. La ribavirine est utilisée dans le traitement des infections liées à des virus à ARN :

- Virus de l'hépatite C (VHC).
- Virus respiratoire syncytial (VRS).
- Virus des fièvres hémorragiques (fièvre de lassa, fièvre hémorragique avec syndrome rénal FHSR).

La ribavirine est **toxique pour les globules rouges** : (Anémie hémolytique) elle est contre-indiquée au cours de la grossesse.

On l'utilise dans le **traitement de l'hépatite chronique C**, en association avec l'**interféron** .

### ► les analogues des nucléotides :

Sont des molécules monophosphatées qui nécessitent deux phosphorylations successives par des kinases cellulaires. Ceci fait, leur mécanisme d'action est similaire à celui des analogues nucléosidiques. Ces molécules sont actives sur le VIH, sur le VHB (adéfovir, ténofovir) ou sur le CMV (cidofovir).

### ► Adéfovir (analogue de l'adénosine) :

C'est un inhibiteur compétitif de la rétrotranscriptase agissant aussi en stoppant l'élongation de la chaîne nucléotidique, actif sur les herpès virus.

Bien qu'étudié initialement pour la lutte contre le VIH, sa néphrotoxicité est un handicap pour cette utilisation (traitement à long terme). Il est cependant approuvé officiellement pour le traitement de l'hépatite B chronique.

### ► Ténofovir (analogue de l'adénosine) :

Le Ténofovir, analogue nucléotidique utilisé (sous forme de pro drogue) comme inhibiteur de la rétro transcriptase du VIH (moins toxique sur les mitochondries que d'autres analogues nucléosidiques, est également actif contre l'hépatite B.

### ► Cidofovir (analogue de la cytosine) :

Contrairement aux dérivés de l'acyclovir, son action serait beaucoup plus prolongée (jusqu'à 7 jours au lieu de quelques heures). Son absorption peut être améliorée par estérification du groupement phosphonate, augmentant l'activité contre les *Orthopoxvirus* et *Herpesvirus*, mais sa néphrotoxicité nécessite des précautions lors de traitements.

## B. Les inhibiteurs non nucléosidiques :

Ces molécules agissent de manière non compétitive sur la rétro transcriptase (ou transcriptase inverse : TI) des *Retroviridae*, notamment du VIH.

Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) sont des molécules qui se lient directement à des acides aminés hydrophobes proches du site catalytique de la rétro transcriptase, sans transformation préalable.

- Nevirapine.
- Efavirenz.
- Delavirdine.

Leur activité est importante ó uniquement sur le HIV-1 ó mais à cause de l'apparition rapide d'une résistance (croisée avec toutes les autres molécules), ces produits *ne sont utilisés qu'en association* avec des inhibiteurs nucléosidiques et/ou des antiprotéases.

Ce sont des inhibiteurs puissants, actifs à des concentrations extrêmement faibles (quelques nanomoles) et une faible toxicité cellulaire. Ils sont quasi exclusivement métabolisés dans le foie.

### C. les Analogues de pyrophosphate :

- **Foscarnet : acide phosphonoformique**

Le foscarnet est un analogue de pyrophosphate, inhibant l'ADN polymérase du CMV, sans être métabolisé dans la cellule; il forme un complexe avec l'ADN polymérase au site de fixation du pyrophosphate empêchant ainsi la séparation entre pyrophosphate et nucléoside triphosphate et inhibant l'extension.

Indication : Utilisé en perfusions, dans les infections à **CMV**, et à **HSV** et **VZV** devenus résistants à l'acyclovir chez les patients immunodéprimés.

Effets secondaires : toxicité rénale, hypocalcémie.

### 4. Les inhibiteurs de la maturation :

- **Les inhibiteurs de la protéase:**

La protéase du HIV a pour rôle de cliver des précurseurs protéiques pour générer des protéines actives ; sans ce clivage les particules virales produites ne sont pas infectieuses.

Les inhibiteurs de la protéase (les **IP**) sont des peptidomimétiques de synthèse qui se logent dans le site actif de l'enzyme (protéase du VIH), et bloque son activité.

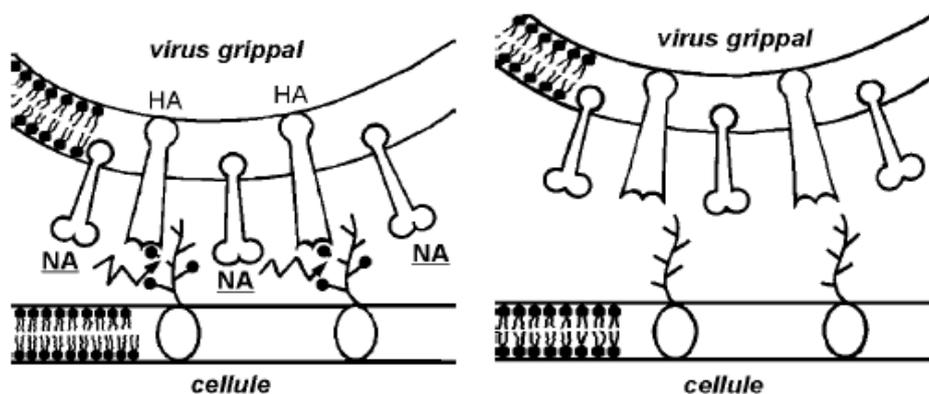
- Saquinavir
- Indinavir
- Nelfinavir
- Ritonavir
- Lopinavir

Les inhibiteurs de protéase sont métabolisés par le système enzymatique du cytochrome P<sub>450</sub> (une famille d'enzymes surtout présentes dans le foie).

### 5. Inhibiteurs de la libération.

- **Zanamavir et Oseltamivir (Tamiflu):**

Pour se fixer à la cellule, les virus grippaux s'accrochent par les spicules de hémagglutinine **HA** aux extrémités des molécules **d'acide sialique** sur la membrane cellulaire.



Lorsque les nouveaux virions bourgeonnent, ils vont rester collés à la cellule par le même mécanisme.

**La neuraminidase** rompt cette liaison :

Elle détache et désagrège les nouveaux virions, elle facilite la diffusion des virions en fluidifiant le mucus des voies respiratoires.

Le site actif de la neuraminidase, comprend une dizaine d'acides aminés qu'on retrouve **quel que soit le variant du virus A ou B.**

## 6. Les interférons :

Découvert en 1975 par Isaacs et Lindenmann au cours d'expérimentations sur le virus grippal, l'interféron est une protéine d'information cellulaire, induite par une infection virale, et qui va conférer aux cellules un état de résistance non seulement au virus inducteur mais également aux autres virus. On décrit trois types d'interférons.

### ► Propriétés biologiques :

- *Activité antivirale* : un interféron produit par un type cellulaire va être actif contre des virus différents.
- *Spécificité d'espèce* : l'interféron produit par des cellules d'une espèce donnée ne protège pas les cellules d'une autre espèce ; par conséquent il sera impossible d'utiliser de l'interféron produit par des cellules animales pour un traitement chez l'homme ; seul l'interféron humain devra, dans ce cas, être considéré.

### ► Propriétés physicochimiques et antigéniques :

Il a été montré qu'il existait en fait deux interférons, le premier (type I) étant antiviral et le second (type II) étant immunitaire; de plus, à l'intérieur de type I, on distinguait l'interféron produit par des Leucocytes de celui produit par les fibroblastes.

Cette nomenclature a évolué et comprend actuellement trois types d'interférons :

L'interféron  $\alpha$  : (IFN de type I leucocytaire).

L'interféron  $\beta$  : (IFN de type I fibroblastique).

L'interféron  $\gamma$  : (IFN de type II).

### ► Mécanisme d'action :

Nous prendrons pour exemple le mécanisme de fonctionnement de l'IFN  $\alpha$ .

Le gène de l'IFN  $\alpha$  est réprimé dans la cellule normale. Au cours d'une infection virale, des composants viraux (acide nucléique viral, protéine virale) vont déréguler le gène IFN  $\alpha$  par un mécanisme très complexe ; le gène est transcrit en ARNm IFN  $\alpha$  qui est traduit en IFN  $\alpha$  et la cellule infectée devient productrice d'IFN  $\alpha$ .

L'IFN  $\alpha$  passe dans les espaces intercellulaires et va agir sur les non encore infectées (rôle de cytokine). Pour cela l'interféron se fixe à un récepteur présent à la surface des cellules : il existe un récepteur commun aux interférons  $\alpha$  et  $\beta$  et un récepteur propre à l'interféron gamma ( $\gamma$ ).

La fixation au récepteur active une protéine-kinase membranaire qui phosphoryle des protéines cytoplasmiques. Ces dernières migrent alors vers le noyau et active la transcription de plusieurs gènes. Les protéines obtenues sont les **protéines antivirales**.

Les interférons empêchent aussi bien la réplication des virus à ADN que celle des virus à ARN. Les **protéines antivirales** doivent donc perturber une étape du cycle de multiplication commune aux virus à ADN et aux virus à ARN : cette étape est la **traduction des ARN messagers viraux**.

► **Propriétés immunologiques et antimorales :**

A côté de l'effet antiviral, l'interféron possède d'autres propriétés :

- Il augmente l'activité cytotoxique des lymphocytes T cytotoxiques ainsi que les des cellules NK et des macrophages ;
- Il ralentit la vitesse de croissance des cellules normales et tumorales ;
- Un effet antitumoral qui est associé à l'action de cytokines (telles que les tumor necrosis factor, TNF).

► **Utilisation thérapeutique :**

- Infections virales : traitement des hépatites virales B et C.
- Oncologie : leucémie à tricholeucytes, le papillome laryngé, le sarcome de kaposi.

## **IV. Méthodes d'étude de la sensibilité aux antiviraux :**

### **1. Méthodes phénotypiques :**

Il s'agit de la mesure in vitro de l'activité inhibitrice d'un antiviral. Ces tests permettent de déterminer si un virus est sensible ou résistant à un antiviral, en cultivant in vitro le virus en présence de concentrations croissantes de l'antiviral testé. Ils permettent de définir la concentration de l'antiviral inhibant 50% et 90% de la réplication virale in vitro : ce sont les concentrations inhibitrices  $CI_{50}$  et  $CI_{90}$ .

► **Tests phénotypiques classiques**

Ces techniques nécessitent l'isolement préalable du virus du patient. Ce virus est ensuite cultivé, à différents dilutions, en présence d'une gamme de concentrations croissantes de l'antiviral à tester. L'inhibition de la réplication virale est évaluée après 5 à 10 jours de culture sur la diminution, dans les surnageants des cultures, de la production d'antigène viral ou de l'activité enzymatique. Les CI sont alors calculées à l'aide de logiciels informatiques.

► **Tests recombinants : Recombinant Virus Assay « RVA »**

C'est la technique la plus utilisée pour le VIH, elle repose sur la production de virus recombinant à partir de l'ARN plasmidique. Elle consiste, après extraction de l'ARN viral du plasma, à amplifier par RT-PCR le gène de la RT et /ou de la protéase puis à co-transfecter ou cloner ce fragment amplifié dans des cellules eucaryotes réceptrices avec un plasmide (pHXB2) contenant le génome du VIH délété des gènes testés. On obtient un virus recombinant qui sera cultivé en présence d'ARV et dont on

déterminera les CI<sub>50</sub> et CI<sub>90</sub>. Cette technique a beaucoup d'avantages, elle permet d'éviter l'isolement du virus en culture de cellules qui demande beaucoup de temps et permet aussi d'effectuer des tests phénotypiques sur des virus difficiles à isoler du plasma.

## 2. Méthodes génotypiques :

### ► Génotype de résistance :

Les tests génotypiques sont destinés à mettre en évidence les mutations qui ont été reconnues comme étant associées à la résistance du VIH-1 aux différents antirétroviraux. Il s'agit de la détermination de la séquence nucléotidique d'une région du génome viral impliquée dans la résistance.

La méthode de référence est l'analyse par séquençage des gènes à l'aide de séquenceurs automatiques. Les tests qui analysent les mutations présentes sur le gène *rt* (réverse transcriptase) ou le gène *prot* (protéase) sont les plus utilisés.

Les tests génotypiques offrent l'avantage de leur plus grande disponibilité (laboratoire de virologie et société de service) et de la relative rapidité d'obtention des résultats (inférieur à 7 jours).

Il existe des algorithmes d'interprétation des tests génotypiques de résistance, nécessitant des mises à jour répétées. Parmi ces algorithmes, on distingue celui du groupe résistance de l'ANRS AC11, celui de Stanford University. Les résultats des tests génotypiques sont habituellement gérés par des logiciels développés en incluant les règles d'interprétation. Pour chaque ARV, le résultat est exprimé avec la mention « résistance » ou « résistance possible » ou « absence de résistance ».

## **V- Surveillance virologique du traitement antiviral : Mesure in vivo de la décroissance de la charge virale :**

L'efficacité virologique d'un traitement est évaluée in vivo par la décroissance de la charge virale sous traitement par rapport à la charge virale initiale.

L'augmentation des charges virales sous traitement bien conduit doit faire suspecter une émergence de souches de virus résistantes qui échappent au traitement. L'émergence de souches résistantes est liée à des mutations ponctuelles du génome viral qui peuvent être recherchée par des techniques génotypiques.

## **VI- limites de la chimiothérapie antivirales :**

### ► cytotoxicité :

- Oblige parfois à diminuer les doses même à arrêter le traitement.

-Elevée chez l'immunodéprimé.-

### ► L'émergence de mutants résistants:

-Par l'utilisation prolongée des antiviraux et à des doses sub optimales.

-Propriétés virales : haute hétérogénéité et multiplication à haut titre dans les cellules.

-Etat immunitaire du patient.

► **La latence :**

Les antiviraux sont virostatiques n'agissant que sur les virus au cours de la multiplication, donc limités à la phase aiguë de l'infection, les virus latents y échappent.

► **Spectre d'activité très étroit :**

Il n'existe pas encore de molécule anti virale efficace à large spectre.

## **Conclusion :**

É Plus la **variabilité virale** est importante plus le risque de sélectionner une souche résistante préexistante est grand.

É Plus la molécule est **efficace** plus le risque de résistance diminue.

É **L'observance** au traitement s'avère être un paramètre clé dans la prévention de la résistance (tolérance, rythme des prises sont des critères clés).

É La **combinaison** d'antiviraux peut se révéler indispensable pour des virus ayant un niveau de réplication et un taux de mutations élevés. Cette nécessité se révélera indispensable pour des traitements de longue durée.

É L'utilisation irraisonnée de molécules antivirales conduit inexorablement vers la sélection de virus résistants pouvant se révéler encore plus néfastes que la souche initiale.