

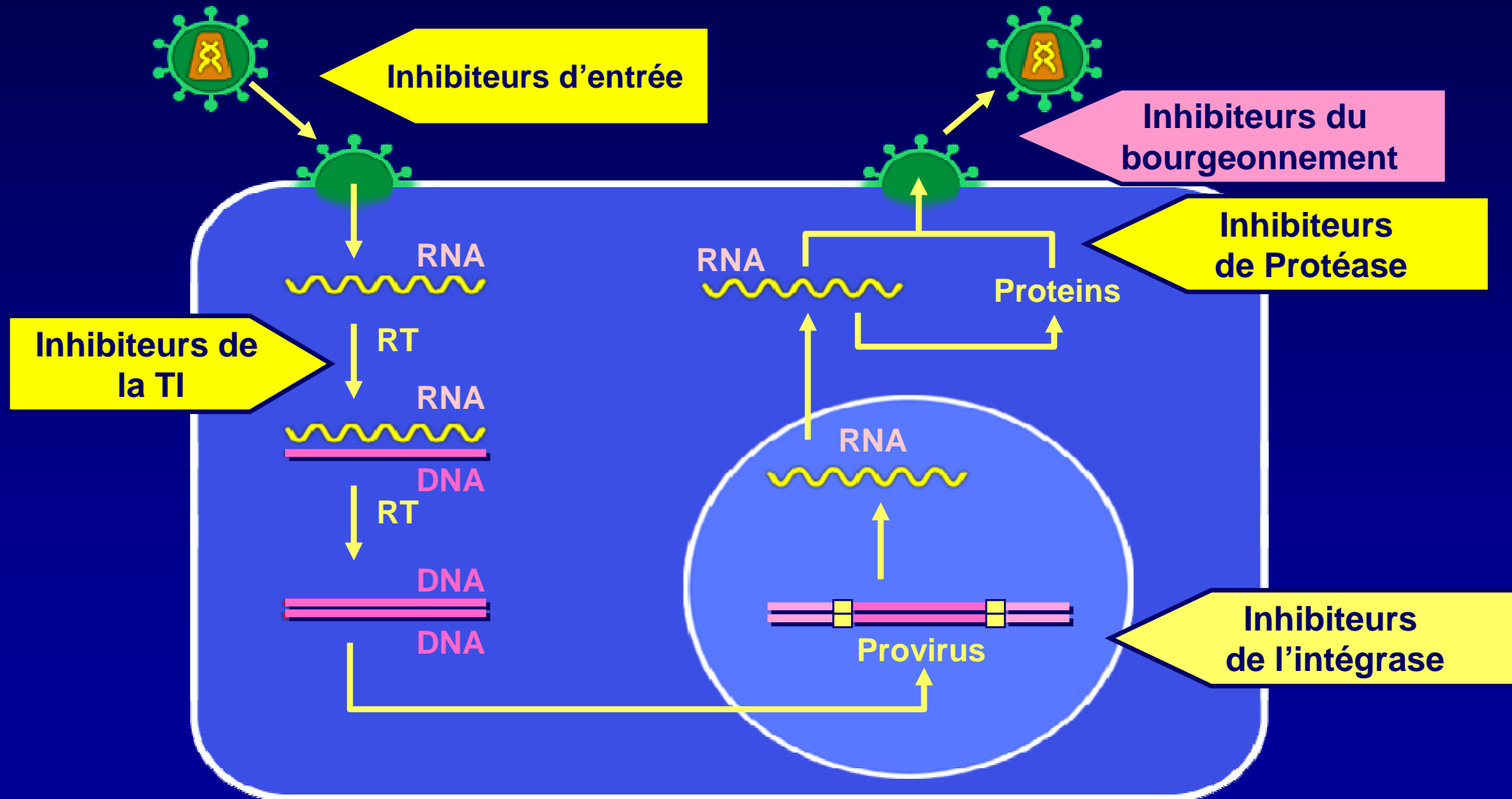
Les bases de la résistance du VIH aux antirétroviraux

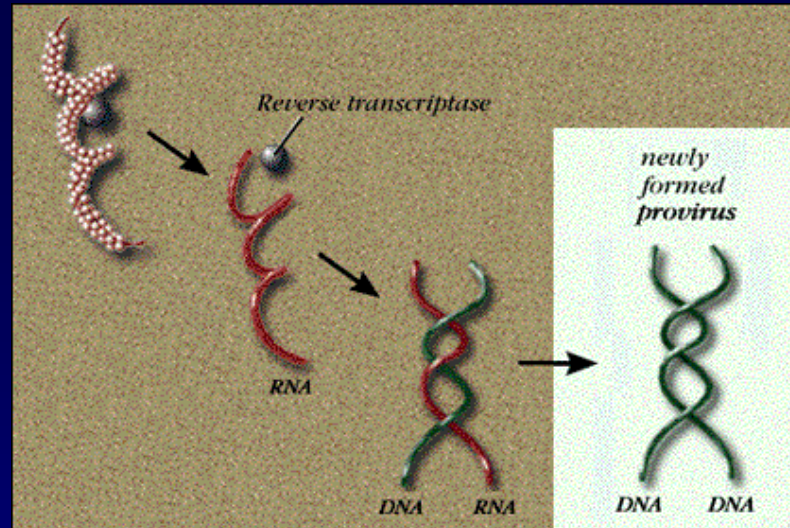
Dr Bernard Masquelier

Laboratoire de Virologie, CHU de Bordeaux

et EA2968 Université Victor Segalen Bordeaux 2

Cibles des antirétroviraux



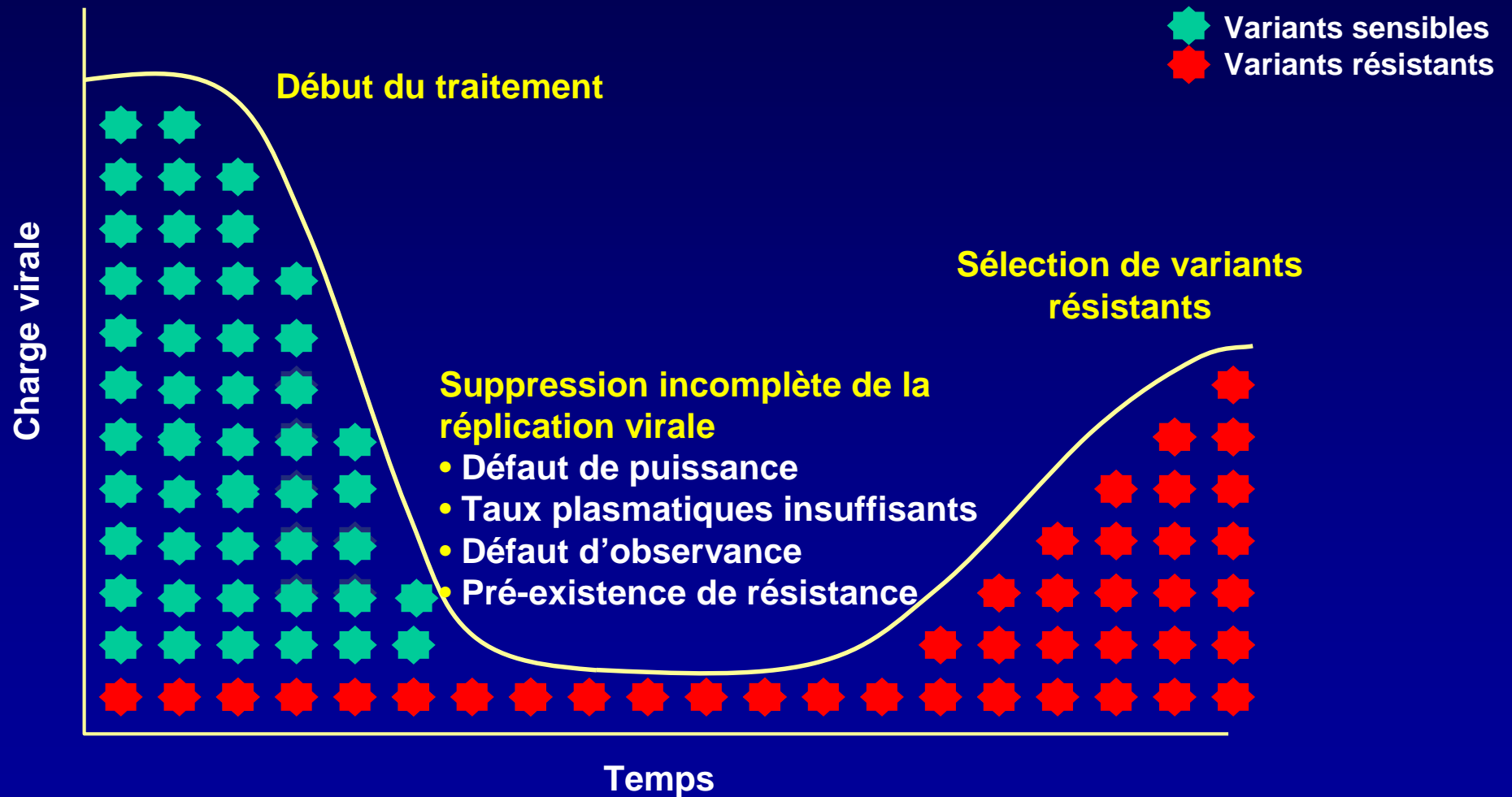


- ✓ Taux d'erreur de la TI : 1/10.000 nucléotides
- ✓ Production virale : 10^9 - 10^{10} particules par jour
- ✓ Taux de recombinaison : 5 à 10 évènements par cycle
- ✓ Evolution constante de la quasispèce
- ✓ Toutes les mutations pré-existent avant traitement
- ✓ Demie-vie d'un virus plasmatique = 0.3 jours
- ✓ Demie-vie des cellules infectées = 2.2 jours

Definition de la Résistance aux Antiviraux

- La résistance est due à la présence de mutations sur le génome viral qui réduisent la sensibilité du virus par rapport à celle observée chez un virus sauvage
 - Modifications au niveau de la cible moléculaire de l'ARV (Ex : RT, protéase, Intégrase)
 - Modifications au niveau d'autres protéines virales qui interfèrent indirectement avec l'activité de la molécule antirétrovirale (ex : gène gag/ Résistance aux IP)

Pression de sélection antirétrovirale



ANTIRETROVIRAUX

Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la TI

- zidovudine (ZDV, AZT)
- didanosine (ddI)
- zalcitabine (ddC)
- stavudine (d4T)
- lamivudine (3TC)
- abacavir (ABC)
- emtricitabine (FTC)
- tenofovir (TFV)

Inhibiteurs d'entrée

- **Inhibiteur de fusion :**
enfuvirtide (T20)
- **Inhibiteur de CCR5 :**
- Maraviroc (MVC)
- Vicriviroc

Inhibiteurs non nucléosidiques de la TI

- nevirapine (NVP)
- efavirenz (EFV)
- Etravirine (ETR)

Inhibiteurs de protéase

- saquinavir (SQV)
- ritonavir (RTV)
- indinavir (IDV)
- nelfinavir (NFV)
- fosamprenavir (fAPV)
- lopinavir (LPV)
- atazanavir (ATV)
- tipranavir (TPV)
- darunavir (DRV)

Inhibiteurs d'Intégrase

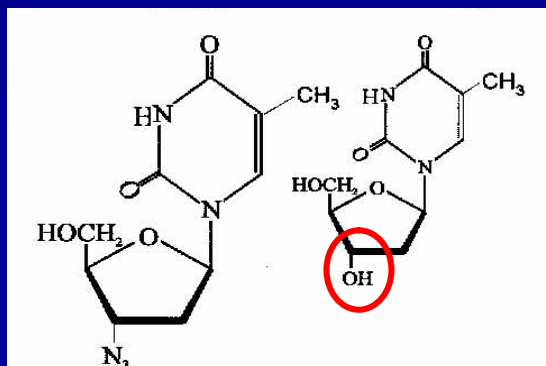
- Raltegravir (RAL)
- Elvitegravir

Structure et mode d'action des INTIs

- Les INTIs sont des pro-médicaments, à la différence des INNTIs et IPs
- Les INTIs agissent après avoir été transformés dans la cellule en composés triphosphorylés par des kinases cellulaires
- Les INTIs ressemblent aux dNTPs naturels
 - Compétition pour liaison avec la RT et incorporation dans l'ADN viral
 - Absence de groupement 3'-hydroxyl nécessaire à la polymérisation
 - Terminaison de l'élongation du brin d'ADN viral

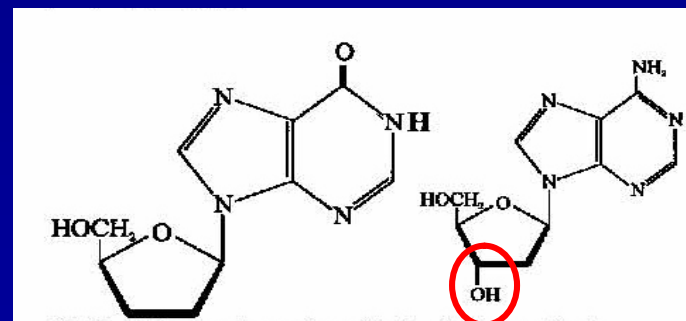
AZT

dTTP



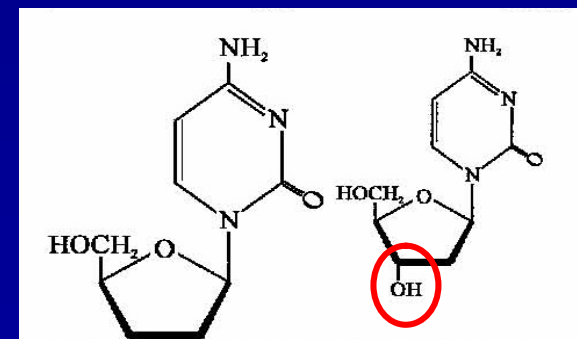
ddl

dATP

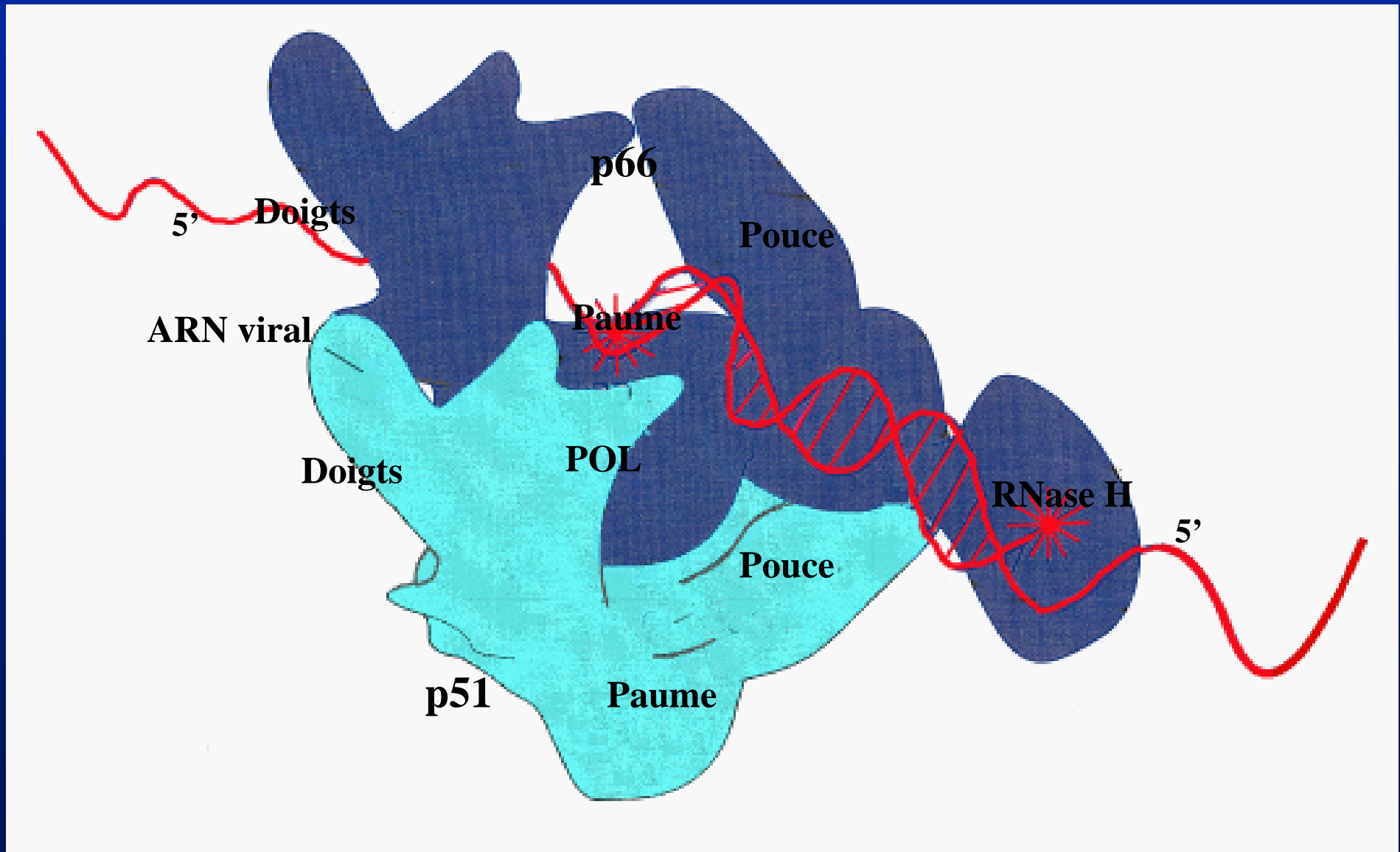


ddC

dCTP



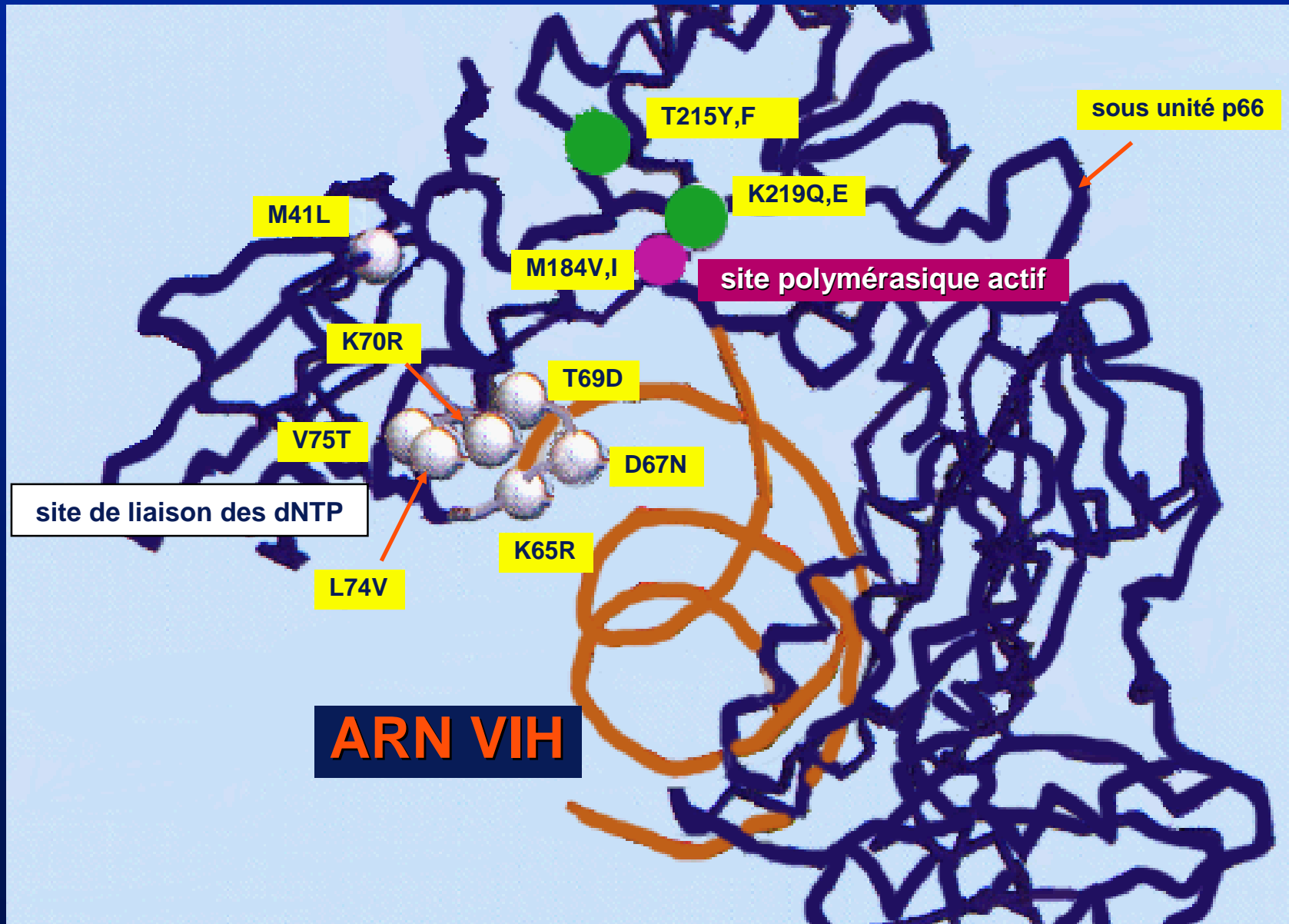
Structure de la transcriptase inverse



d'après Jacobo-Molina et al. et Kohlstaedt et al.

Transcriptase inverse

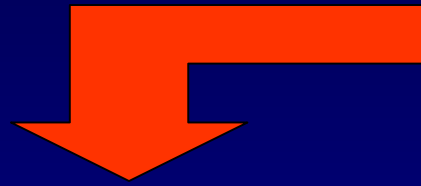
les sous unités p66 (bleu) le site catalytique (rose) et le site de liaison des dNTP (blanc).



Mécanismes de la résistance aux INTI

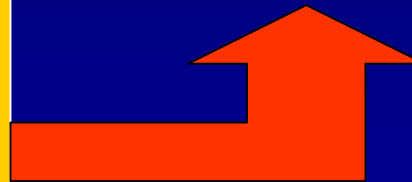
Deux mécanismes de résistance

Diminution
de l'incorporation de l'INTI
ou « Discrimination »
K65R, M184V, L74V



Résistance aux INTI

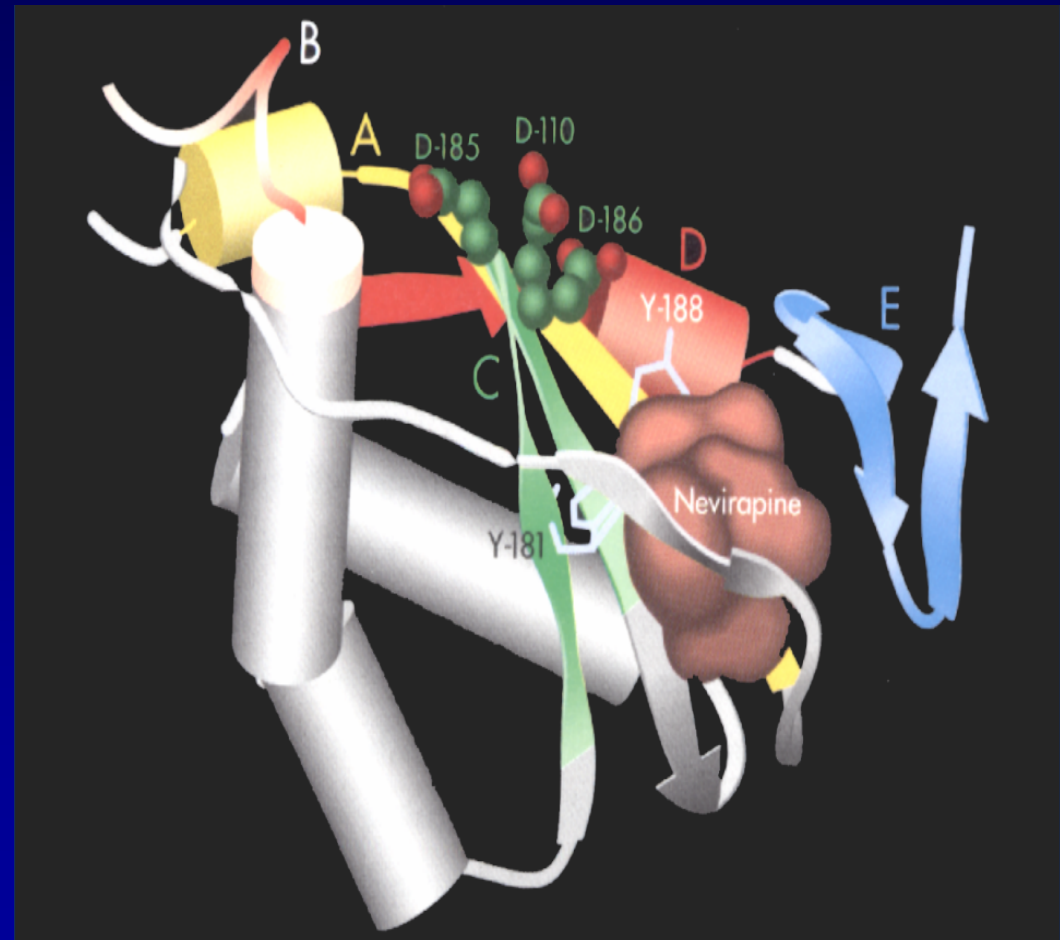
Augmentation
de l'excision de l'INTI
TAMs



La résistance est la résultante de ces deux mécanismes

Résistance aux Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la TI (INNTIs)

- **Mode d'action**
fixation au niveau d'une poche étroite hydrophobe de la RT située près du site actif
- **Pas d'étape d'activation**
- **2 régions de la RT (AA 100 - 108 et AA 181 - 190)**
- **1 seule mutation entraîne une modification de conformation de la poche (= perte d'affinité) et une résistance croisée EFV/NVP**
- **faible barrière génétique : sélection très rapide**
- **ETV : nécessité de plusieurs mutations ?**



Mutations sélectionnées par les INNTI

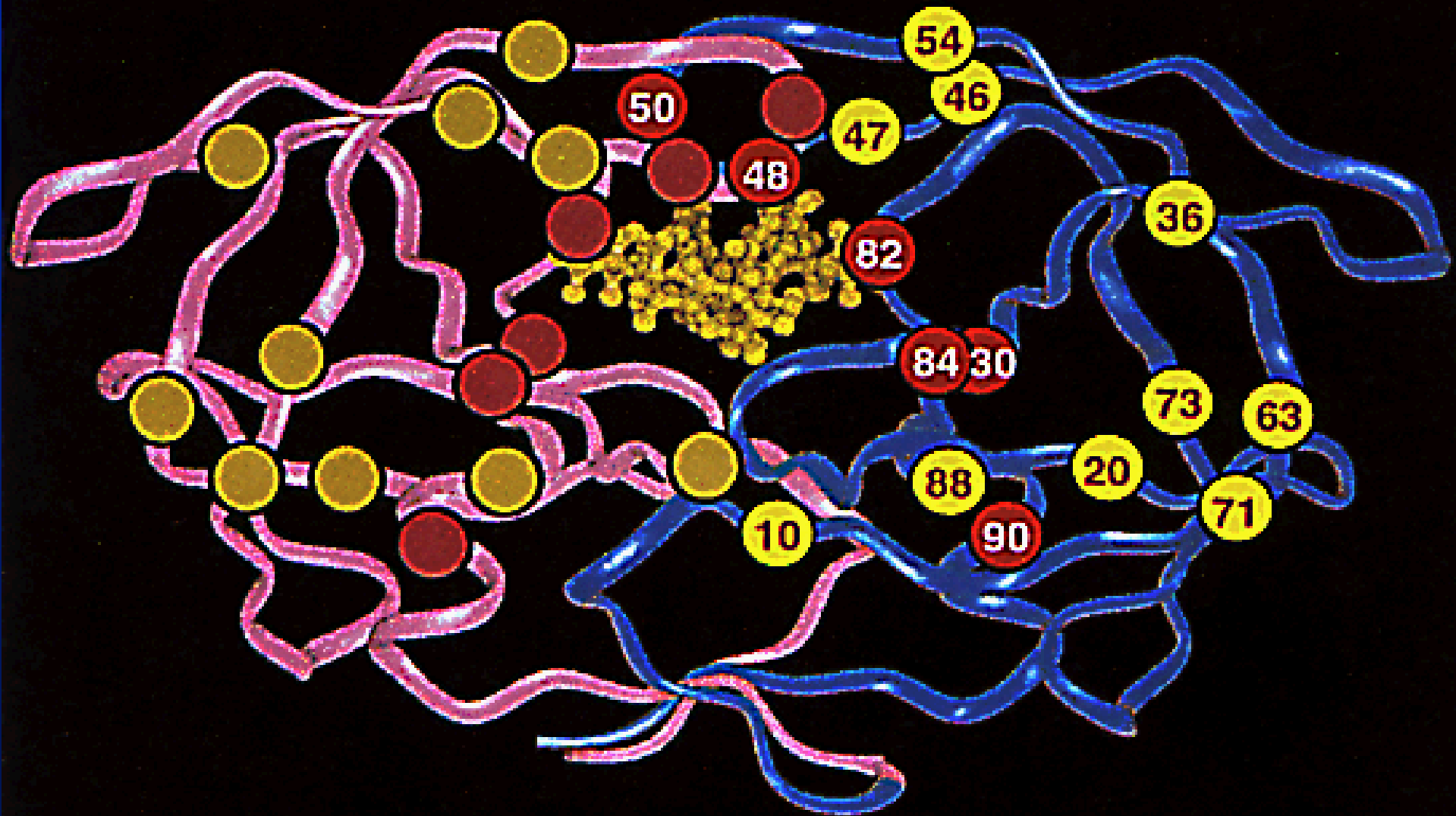
EFV	L	K	V	V	Y	Y	G	P
	100	103	106	108	181	188	190	225
	I	N	M	I	C	L	S	H
					I	A		
NVP	L	K	V	V	Y	Y	G	
	100	103	106	108	181	188	190	
	I	N	A	I	C	C	A	
			M	I	I	L	H	
ETR	V	A	L	K	V	V	Y	G
	90	98	100	101	106	179	181	190
	I	G	I	E	I	D	C	S
			P		F	I	A	
					T	V		

- *Les mutations de résistance aux NNRTI sont localisées dans une région très étroite de la transcriptase inverse*
- *Une seule de ces mutations induit un changement conformationnel très important de l'enzyme qui entraîne une résistance croisée pour EFV et NVP*
- *Un + grand nombre de mutations est nécessaire pour la R à l'ETR*

Mutations de R aux IP

- Mutations majeures (primaires) : empêchent la fixation de l'IP au niveau du site actif.
- +/- spécifiques de chaque IP (ex : NFV: D30N)
- Mutations mineures (secondaires) : augmentent le niveau de résistance et compensent la perte de capacité répliquative liée aux mutations primaires. Peuvent être polymorphiques (prévalence varie en fonction des sous-types VIH).
- Autre possibilité : mutations au niveau du gène gag (sites de clivage).

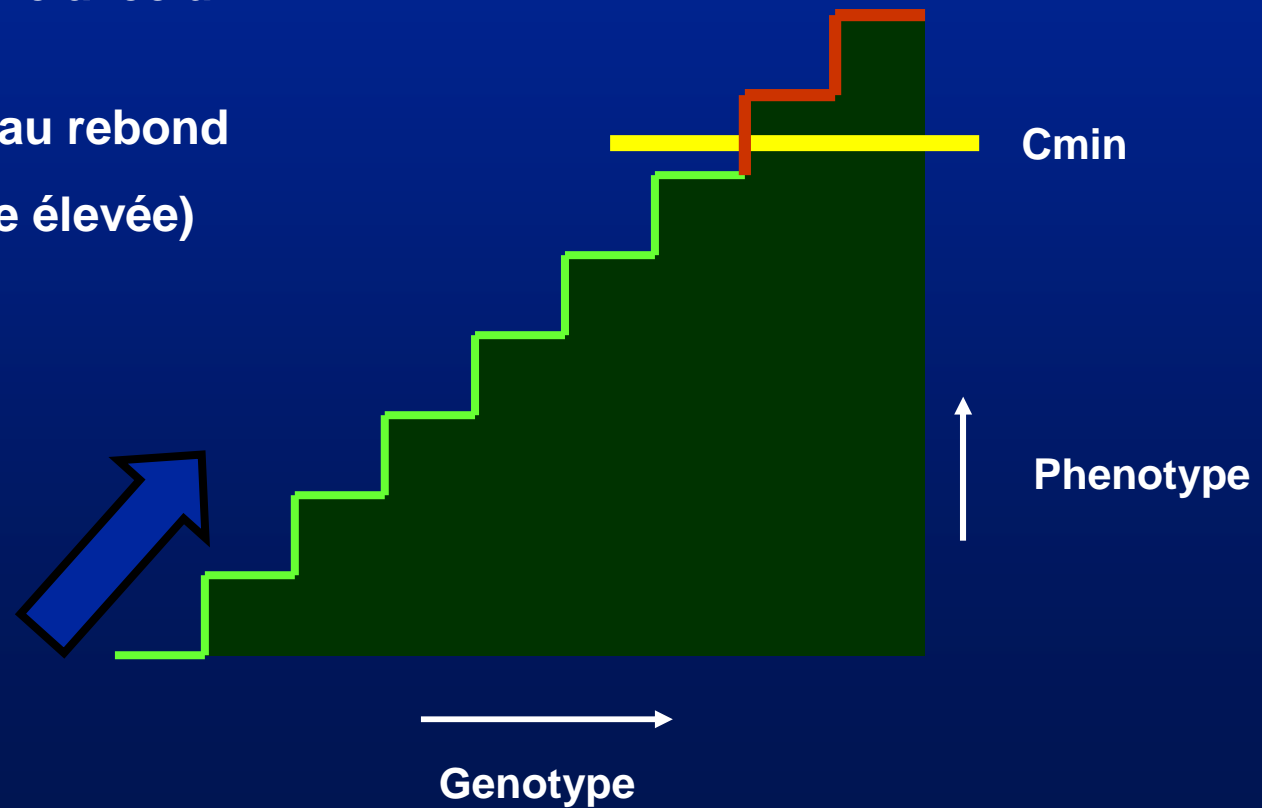
PROTEASE ET MUTATIONS



Modèle de la barrière génétique pour un IP boosté

Ttt de première ligne avec un IP boosté :

Pas de résistance au rebond
(Barrière génétique élevée)

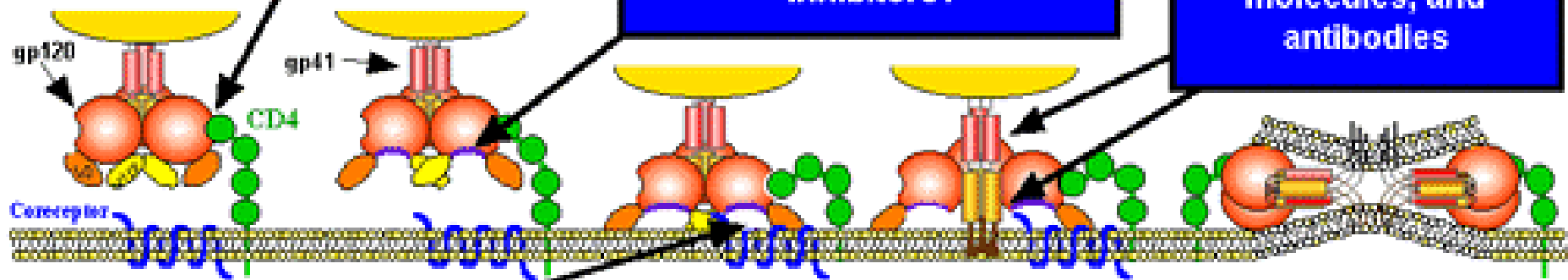


(D'après D Kempf)

CD4 Binding Site in gp120: Highly conserved, target of neut. antibodies

Coreceptor Binding Site - Highly Conserved. Target for Antibodies? Small Molecule Inhibitors?

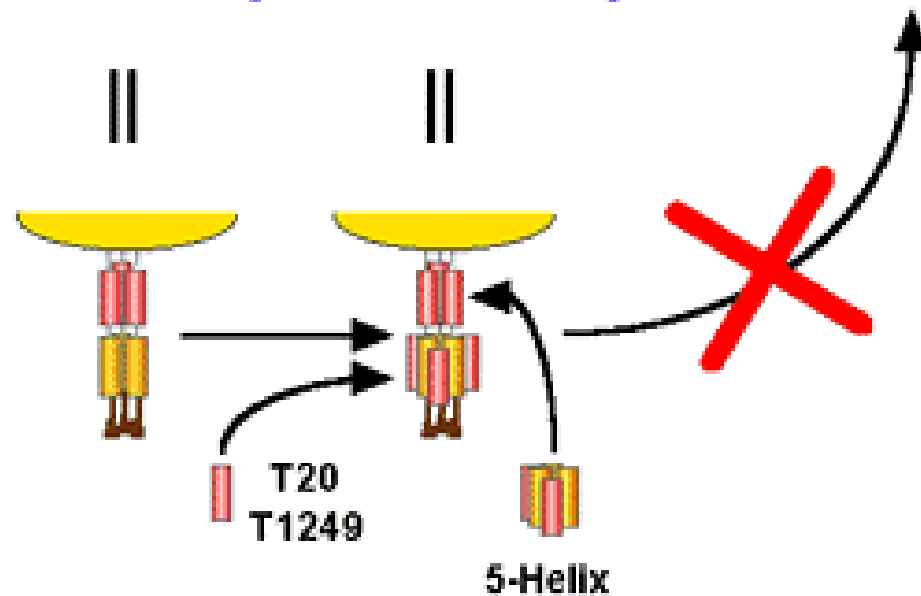
Helical Domains - Targets for T20, small molecules, and antibodies



Coreceptor Binding - Target for small molecule inhibitors:

CXCR4:
ALX40-4C
T22
AMD3100

CCR5
Schering C
TAK779

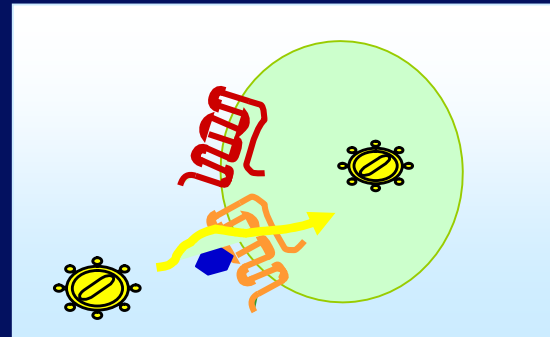








Mécanismes d'échappement aux antagonistes du CCR5

Avec maintien du tropisme CCR5

“Résistance”

(la souche reste R5 mais s'adapte à la présence de l'antagoniste)



-  CXCR4
-  CCR5
-  VIH tropisme X4
-  VIH tropisme R5
-  VIH tropisme dual
-  Antagoniste CCR5

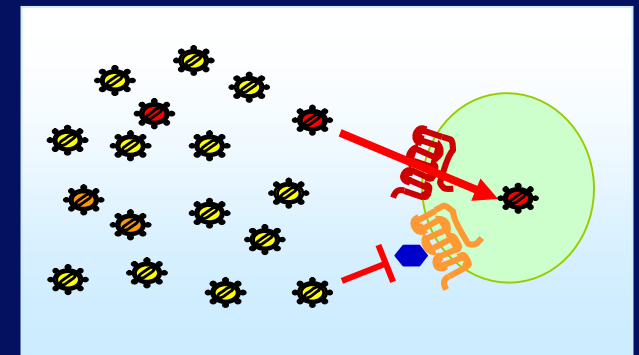
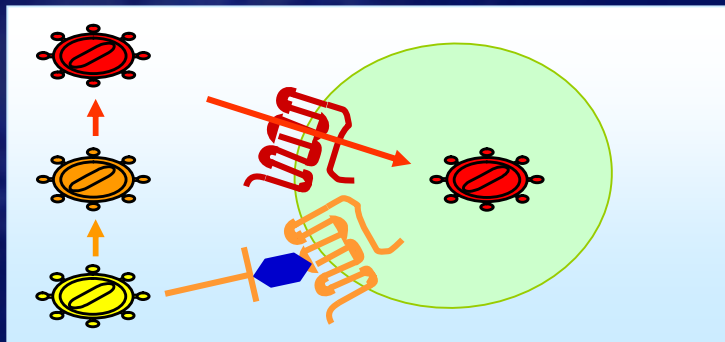
Avec changement de tropisme

“Switch”

ou

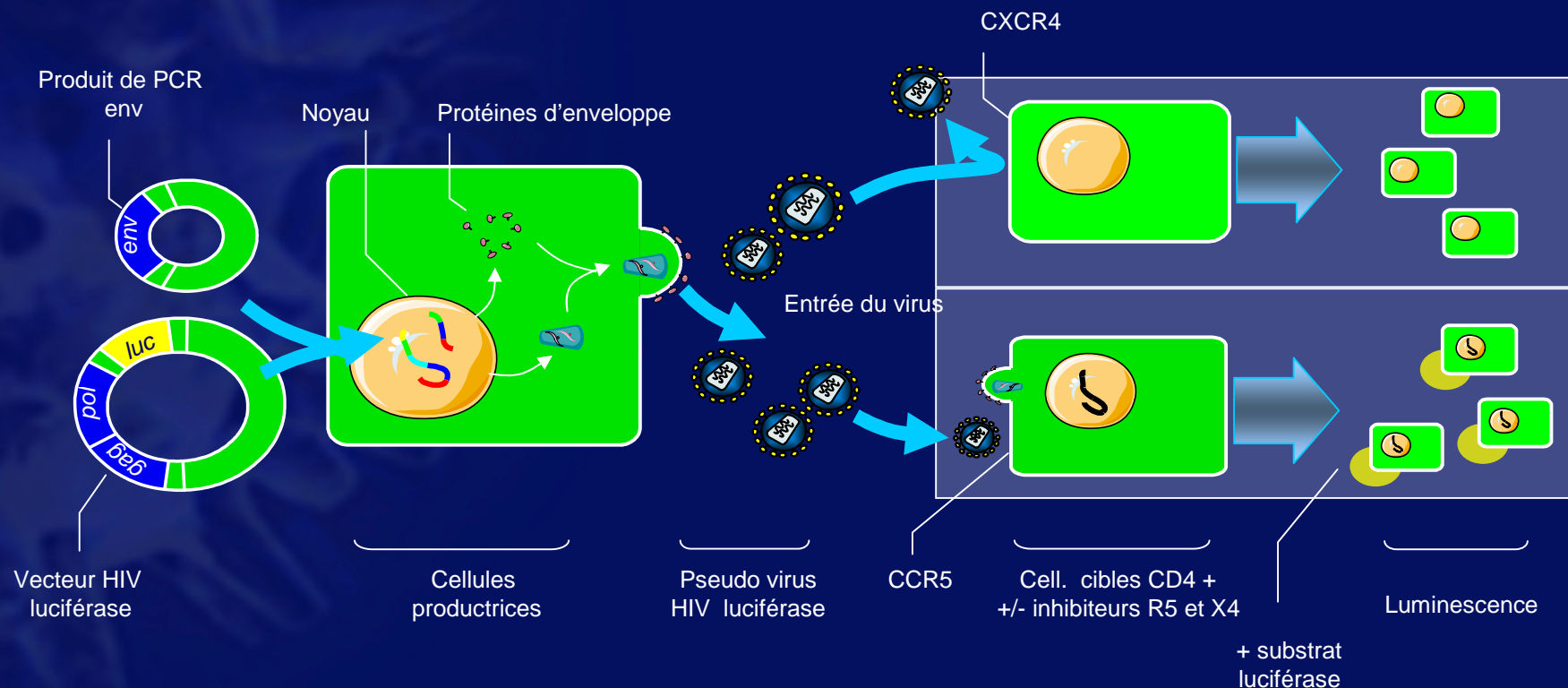
“Emergence”

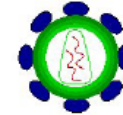
La souche infectante devient R4 soit par évolution de la souche R5 initiale « Switch » soit par émergence d'une population minoritaire X4 préexistante



Test Trofile[®] optimisé

- Détection du tropisme X4 à partir de 0,3 % de la population globale (vs 5 % avec version initiale)
- Détection plus précoce des virus X4 dans des suivis longitudinaux





Coreceptor usage prediction from genotype (version 2.0)

I. General information

Patient:	Study Id:
Birth date:	Viral load:
Sample received:	Sample collected:
Sample ID: Exemple	Predicted subtype: B
Sample type:	Report date:
Physician:	Reported by:

II. Additional clinical parameters used for the predictions:

No clinical parameters given

III. Aligned V3 region

	TOT	ACA	AGA	CCC	AAC	AAC	AAT	ACA	AGA	AAA	AGT	ATA	GGT	ATA	GGG	CCA	GGG	CAA	GCA	TTC	TAT	TAT	GCA	ACA	GGG	GAC	ATA	ATA	GGA	GAT	ATA	AGA	GAA	GCA	GCA	CAT	TGT
Consensus B:	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	O	A	H	C		
Query:	C	T	R	P	N	N	N	T	R	R	S	I	H	I	G	P	G	K	S	F	Y	T	T	-	N	V	I	G	D	I	R	O	A	H	C		
	TOT	ACA	AGA	CCC	AAC	AAC	AAT	ACA	AGA	AGG	AGT	ATA	CAT	ATA	GGG	CCA	GGG	AAA	TCA	TTC	TAT	TAT	ACA	ACA	-	AAC	GTA	ATA	GGA	GAT	ATA	AGA	GAA	GCA	GCA	CAT	TGT

IV. Coreceptor prediction

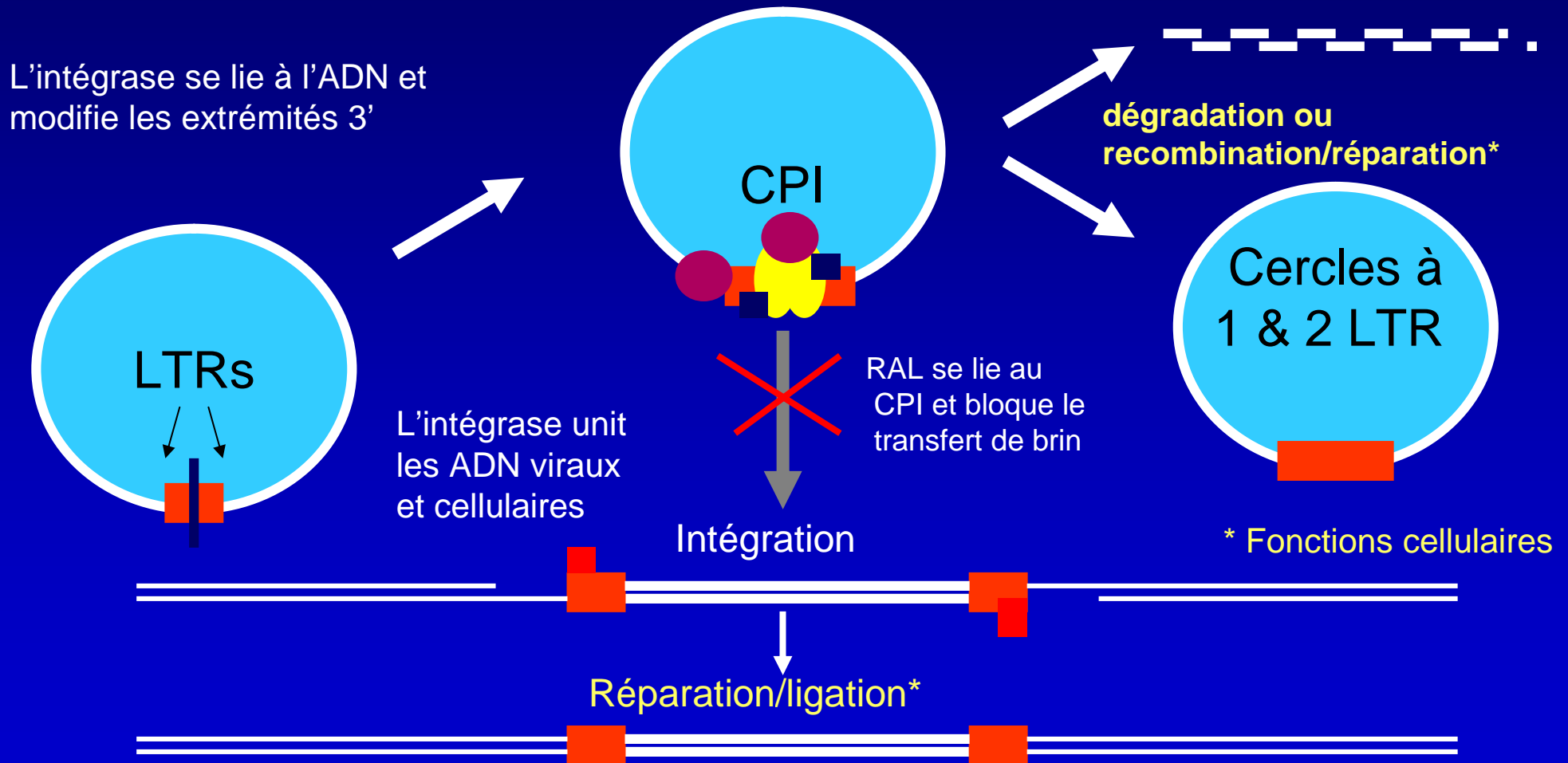
Model	Prediction	FPR	Remarks
Clonal	Only the CCR5-coreceptor can be used. CCR5-antagonists like Maraviroc (Crisentri/Seizentry) could work.	34%	

Comments:

(signature)

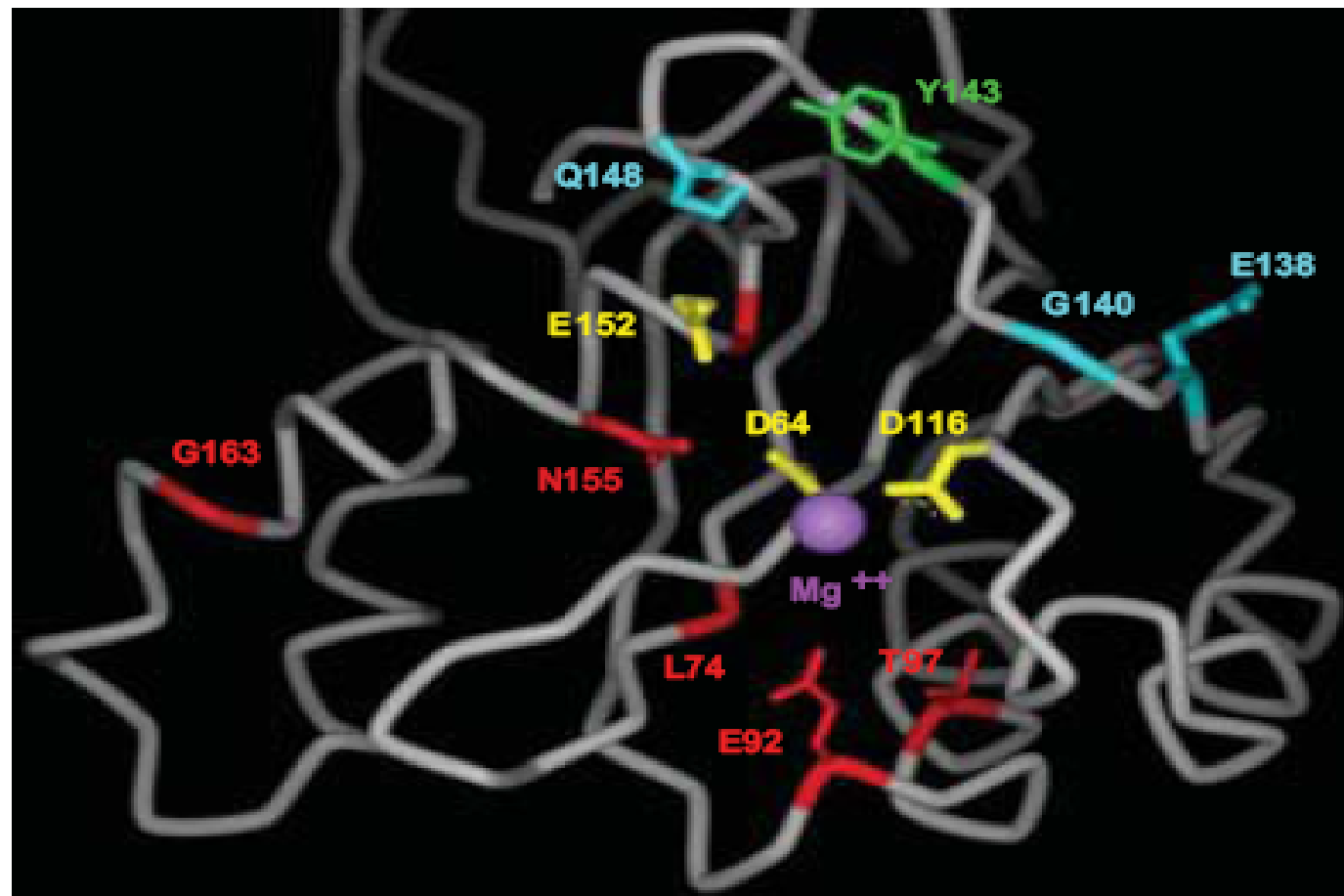
Inhibiteurs d'intégrase

Mécanisme d'action du raltegravir (RAL)



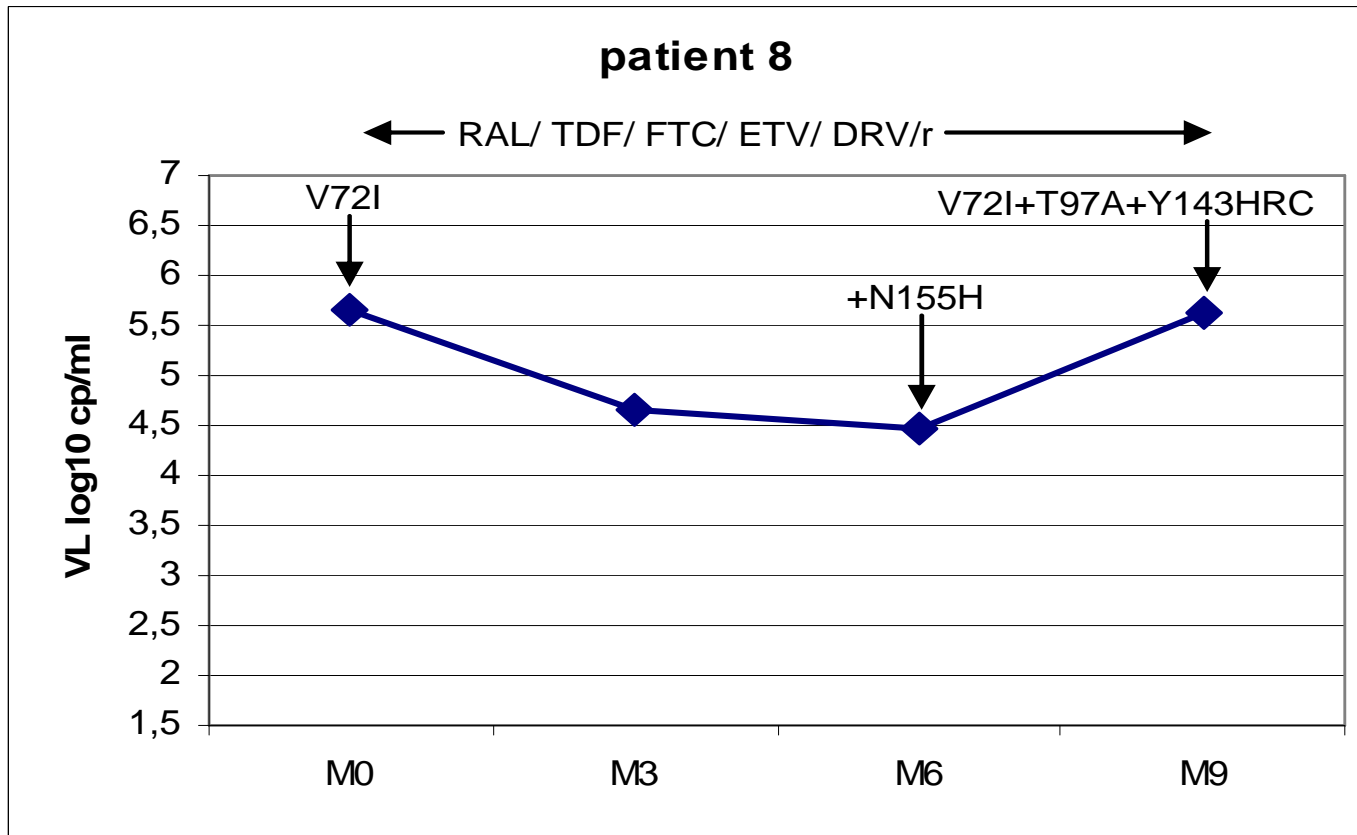
CPI = Complexe de pré-intégration

Localisation moléculaire des mutations de résistance au RAL



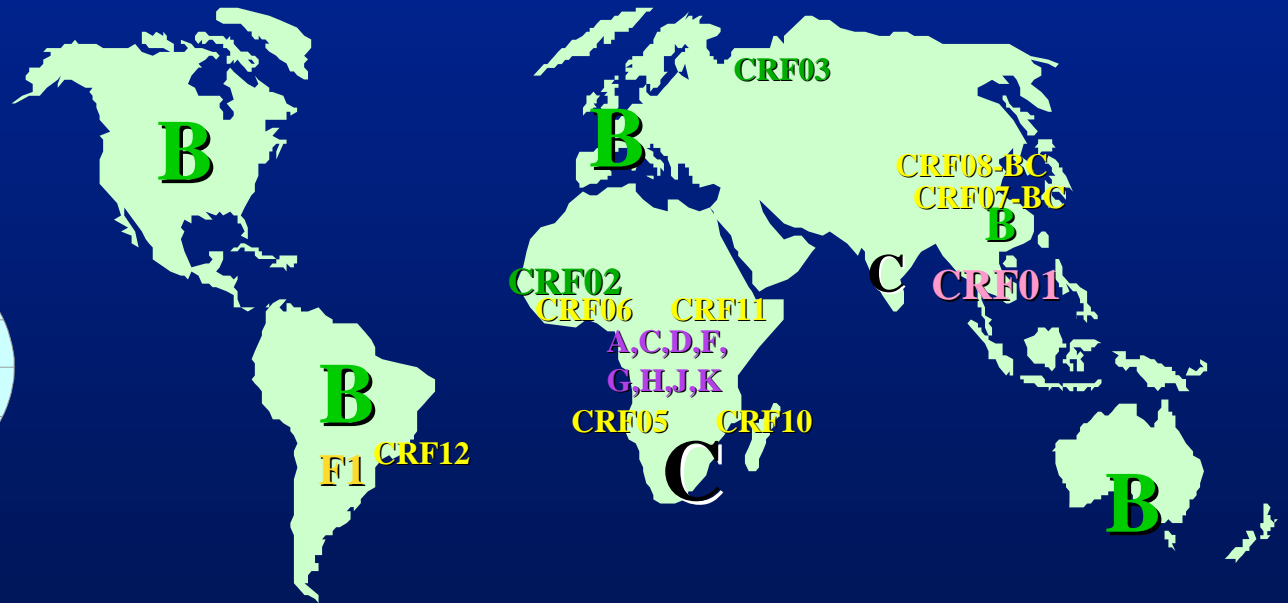
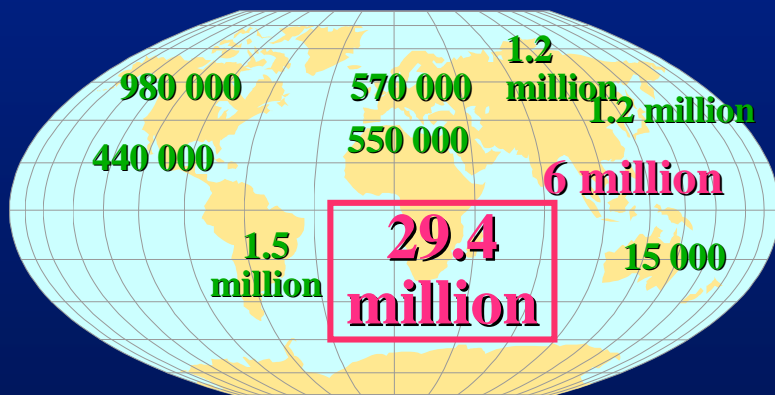
■ Catalytic Residues ■ N155H path ■ Q148K/R/H path ■ Y143C/R path

Exemple de sélection de mutations sous raltegravir



Da Silva et al. JAC 2010

Résistance et variabilité VIH



(D'après M. Peeters, Rome, 2004)

Influence de la diversité sur la résistance

- Résistance naturelle (*intrinsèque*) de certains groupes ou types de virus
- Résistance groupe O et VIH-2 aux NNRTI : existence de substitutions codant pour la R aux NNRTI : Y181C (groupe O), 181I/V, 188L, 190A (VIH-2)
 - ➡ Non-fixation de l'inhibiteur (*Descamps et al, J Virol 2002; Witrouw et al, AIDS 1999*)
- Résistance « naturelle » du VIH-2 à certains IP (*Colson et al, J Clin Microb 2004, Parkin et al. Antivir Ther 2004*).
Prédominance de la substitution 46I qui est une mutation majeure pour la R à l'indinavir ; présence V32I/ I47V entraînant une résistance de bas niveau à l'amprénavir

➤ Conséquences de la diversité sur la sélection des mutations de résistance sous traitement

- Les voies génétiques de résistance peuvent varier en fonction des sous-types
- résistance aux NNRTI et sous-type C :
- Mutation **V106M** : mise en évidence par sélection *in vitro* en présence d'EFV à partir d'isolats sous-type C provenant de patients Ethiopiens (Loemba et al AAC 2002)
- Etude de la séquence nucléotidique (polymorphismes silencieux) :

C wt: 106 GTG (V)

B wt: 106 GTA (V)



C mut: 106 ATG (M)

Pas de sélection 106M

(1 base différente)

(Deux changements nécessaires)

- Mutation K65R et sous-type C *in vitro*

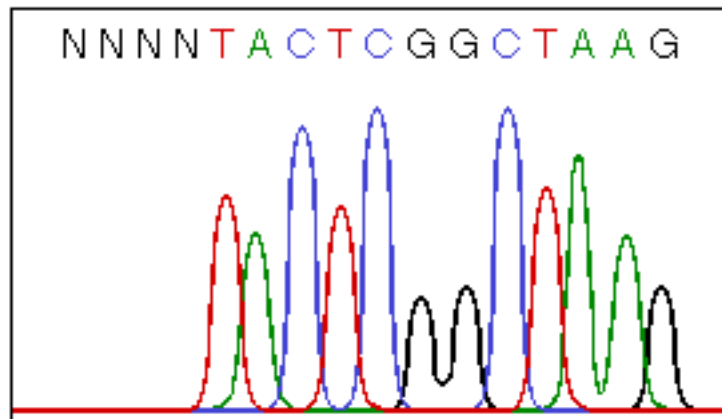
Comment mesurer la résistance ? (1)

- Les tests génotypiques :
- Actuellement essentiellement le séquençage des gènes d'intérêt : TI, Protéase, Intégrase, gp41, gp120
- - RT-PCR, suivie ou non de nested PCR pour chaque gène
 - Réaction de séquence (methode de Sanger)
 - Lecture automatisée des séquences
 - Alignement sur séquence de référence et détection des mutations de résistance.

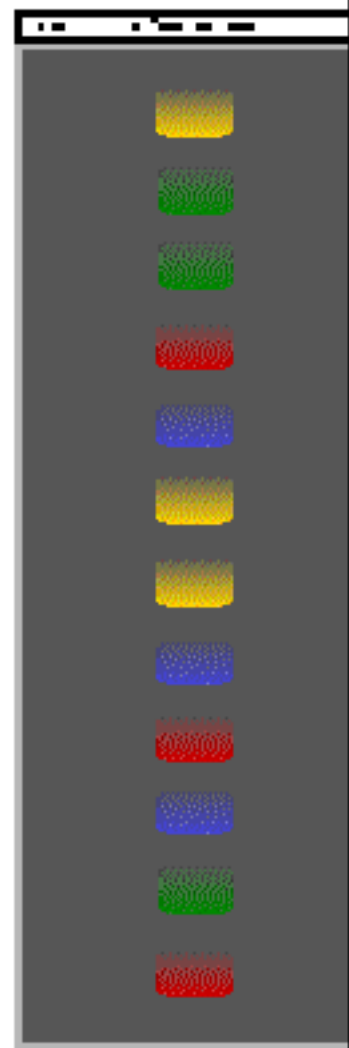
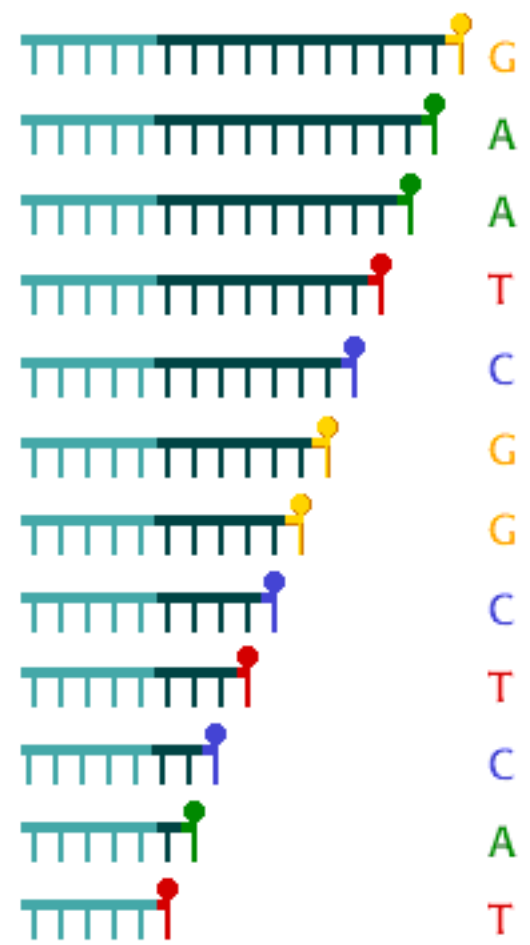
Cycle Sequencing

QUIT

The simulated gel image is read from bottom to top, starting with the smallest fragment.



GO TO START



Comment mesurer la résistance ? (2)

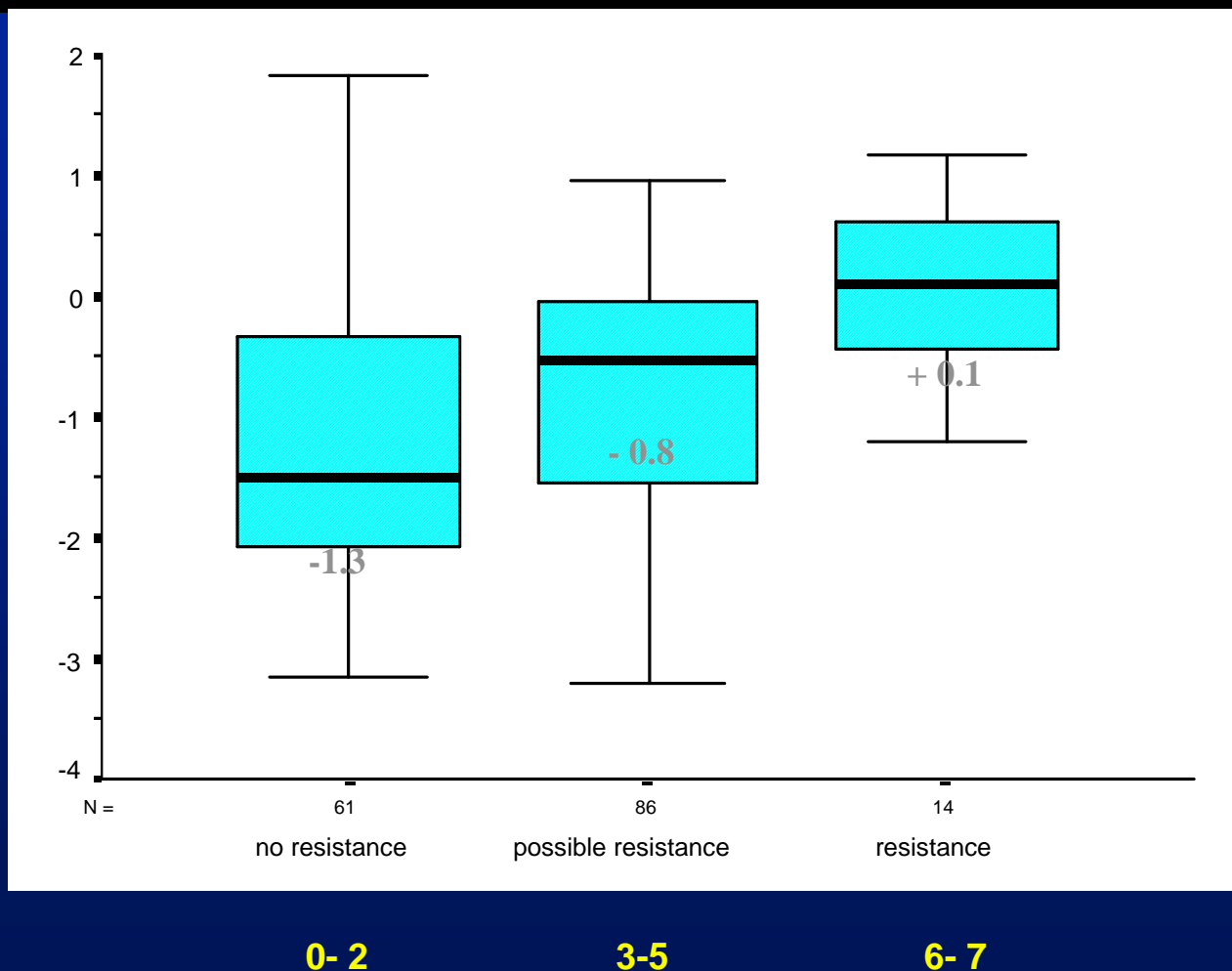
- Les tests génotypiques :
- Résultat rapide, coût relativement modéré
- Nécessité d'un algorithme d'interprétation
- *groupe ANRS AC11 Résistance* : hivfrenchresistance.org
- *Stanford HIV Database, Rega Institute*
- *Virtual Phenotype*

Mise au point :

- A partir de corrélations phénotype/génotype
- A partir d'études de réponse virologique en fonction du génotype

Score de mutations et réponse virologique

Delta CV (M3)



Score : nombre de mutations parmi : M41L +E44D +D67N +T69D/N/S +L74V +L210W +T215Y/F



CHU – Hôpitaux de Bordeaux
Laboratoire de Virologie

Patient ID	FRB00001995	Sample ID	SQI7585		
Patient Name		Sample Date	06.11.2008		
		Specimen	Plasma	Clade	B

Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTI)

Drug	Mutations list	Range	Color	Interpretation
Epivir® / Emtriva® Lamivudine / Emtricitabine (3TC_FTC)		1	Green	S - Susceptible
Ziagen® Abacavir (ABC)		1	Green	S - Susceptible
Zerit® Stavudine (D4T)		1	Green	S - Susceptible
Videx® Didanosine (DDI)		1	Green	S - Susceptible
Viread® Tenofovir DF (TDF)		1	Green	S - Susceptible
Retrovir® Zidovudine (ZDV)		1	Green	S - Susceptible

Non-Nucleoside Reverse transcriptase Inhibitors (NNRTI)

Drug	Mutations list	Range	Color	Interpretation
Sustiva®, Stocrin® Efavirenz (EFV)		1	Green	S - Susceptible
Etravirine Etravirine TMC125 (ETV)		1	Green	S - Susceptible
Viramune® Nevirapine (NVP) *		1	Green	S - Susceptible

Protease Inhibitors (PI)

Drug	Mutations list	Range	Color	Interpretation
Reyataz® / Norvir® 300/100 Atazanavir / Ritonavir (ATV_RTV)	10I, 10V, 46L, 60E	3	Red	R - Resistance
Prezista® / Norvir® 800/100 Darunavir TMC114 / Ritonavir (DRV_RTV)	11I, 32I, 47V	2	Yellow	I - Possible resistance
Crixivan® Indinavir (IDV)	46L, 82A	3	Red	R - Resistance
A component of Kaletra® Lopinavir (LPVr)	10I, 10V, 20R, 46L, 63P, 82A	2	Yellow	I - Possible resistance
Viracept® Nelfinavir (NFV)	10I, 36I, 46L, 82A	2	Yellow	I - Possible resistance
Invirase® / Norvir® 1000/100 Saquinavir / Ritonavir (SQV_RTV)	10I, 10V, 20R, 62V, 82A	3	Red	R - Resistance
Aptivus® / Norvir® 500/200 Tipranavir / Ritonavir (TPV_RTV) **		1	Green	S - Susceptible
Telzir® / Norvir® 700/100 Fosamprenavir / Ritonavir (fosAPV_RTV)	10I, 10V, 32I, 36I, 47V, 62V, 82A	3	Red	R - Resistance

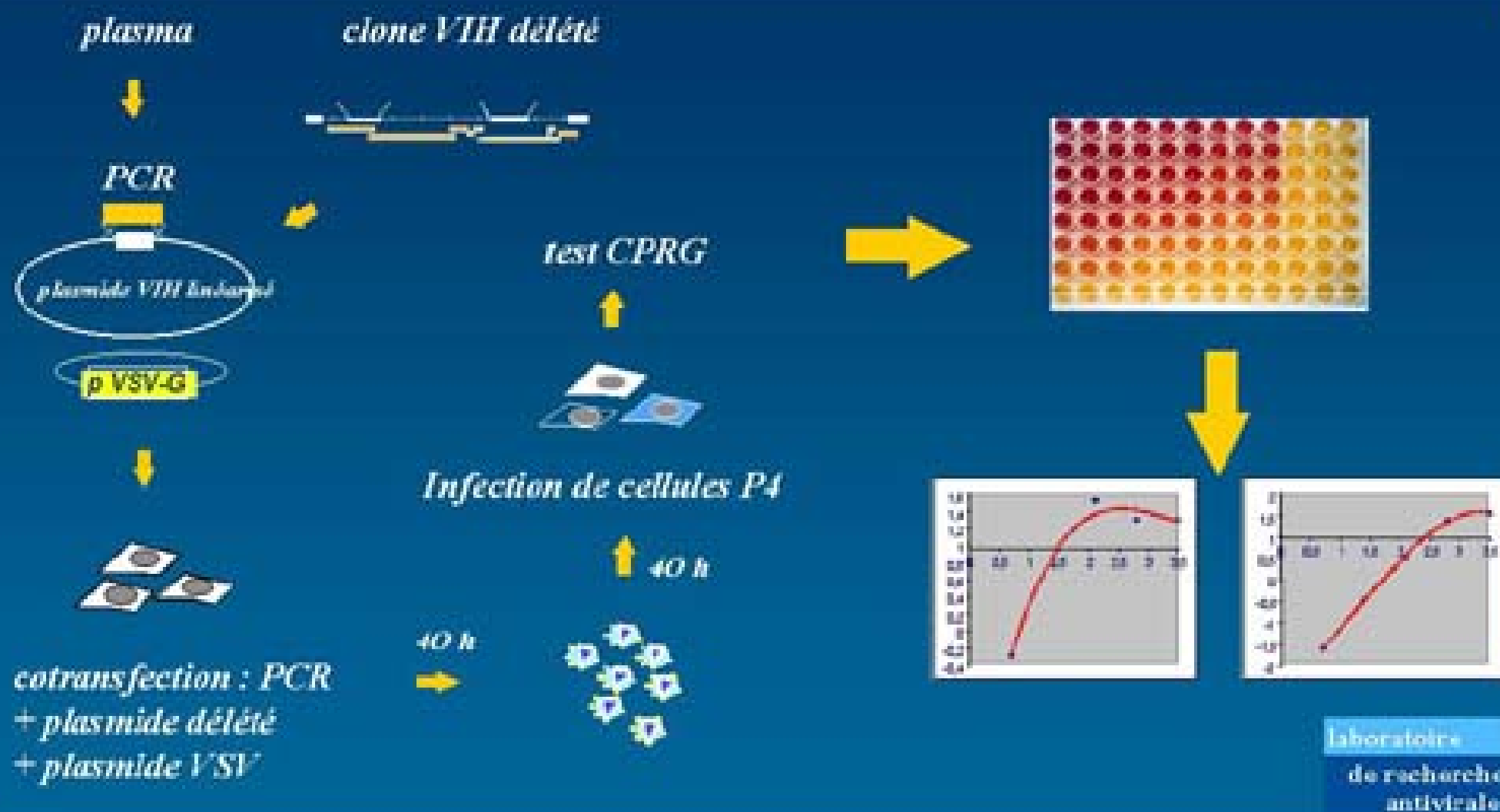
(*) In presence of mutation 98S in RT for HIV-1 subtype C, Nevirapine (NVP) interpretation should be considered as resistant

(**) Insufficient data for HIV-1 subtype non-B
ASI Drug Resistance Algorithm ANRS 2008.17/sg/b

Comment mesurer la résistance ? (3)

- *Les tests phénotypiques* : mesurent *in vitro* (en culture cellulaire) les concentrations de la drogue inhibant 50% ou 90% de la réplication virale (CI50, CI90).
- Tests utilisant des virus recombinants (RVA : recombinant Virus Assay) incluant par ex. la RT et/ou la protéase du virus du patient.
- Nécessitent des structures automatisées ; coût important.
- Pas d'avantage sur le génotype en pratique clinique.
- Intérêt pour l'étude de nouvelles drogues et dans le cadre de protocoles.

Recombinant Virus Assay (RVA)



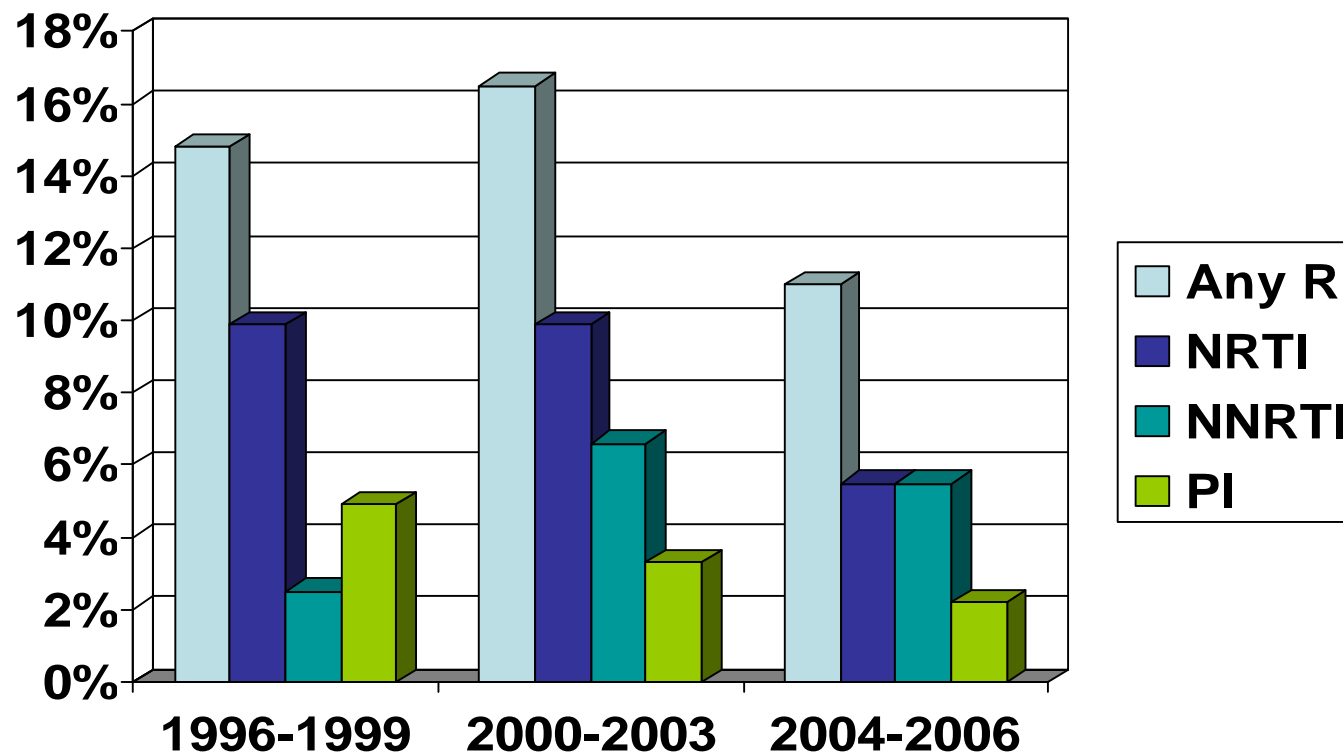
Laboratoire
de recherche
antivirale

Indications des tests de résistance (1)

1. Tout *échec thérapeutique* : patient en échec virologique (charge virale >50 copies/ml confirmée), pour optimiser un traitement de substitution.
2. En cas de *primo-infection à VIH* : environ 10% des patients sont infectés en France par un variant VIH résistant à au moins une drogue.
Nécessité du génotype pour la surveillance épidémiologique et l'adaptation éventuelle du traitement.
3. Lors du *diagnostic d'infection à VIH : bilan initial* génotype de résistance sur le premier plasma disponible, ou avant de débiter le 1^{er} traitement.

Transmission de la résistance aux ARV, Cohorte Aquitaine, 1996-2006

Prévalence globale 14.1 % (n =263 patients)



Indications des tests de résistance (2)

3. Cas particuliers:

- *Femme enceinte VIH(+)* à charge virale détectable: utilité pour optimiser le traitement, dans le cadre de la prophylaxie de la TME.
- *Accident avec exposition au VIH* : tenir compte du génotype de R du patient source; la priorité restant l'instauration rapide d'une prophylaxie.

Tests de résistance et prise en charge thérapeutique

Séquençage



Analyse electro-phorégramme +++

Algorithme



- Résistance
- Résistance possible
- Absence de résistance

Prise en charge



- Tolérance/Adhérence
- Histoire thérapeutique
- Génotypes antérieurs
- Dosage ARV

Multidisciplinarité