

CHIMIOTHÉRAPIES ANTI-INFLUENZA

ANTI-INFLUENZA CHEMOTHERAPIES

Par Nadia NAFFAKH, Marie-Anne RAMEIX-WELTI, Sylvie Van der WERF⁽¹⁾
(communication présentée le 4 octobre 2007)

RÉSUMÉ

L'actuelle épizootie de grippe A (H5N1) souligne la nécessité de traitements antiviraux pour faire face à une éventuelle pandémie grippale. Les traitements anti-influenza ont aussi pour objectif de réduire les symptômes et complications survenant lors des épidémies saisonnières. Deux classes d'antiviraux, les inhibiteurs du canal à protons M2 (amantadine, rimantadine), et les inhibiteurs de neuraminidase (zanamivir, oseltamivir), ont une efficacité prophylactique et thérapeutique. L'émergence de virus résistants est particulièrement fréquente lors du traitement avec les inhibiteurs de M2, et limite leur utilisation. Le développement d'une résistance à l'oseltamivir a été décrit chez plusieurs patients infectés avec le virus H5N1. Une surveillance étroite de la résistance aux anti-viraux s'impose, ainsi que le développement de nouveaux composés, pouvant cibler éventuellement d'autres protéines virales telles que l'hémagglutinine ou la polymérase, et pouvant être utilisés en polychimiothérapies.

Mots-clés : virus influenza, anti-viraux, inhibiteurs de neuraminidase, résistance aux anti-viraux.

SUMMARY

The recent outbreaks of avian influenza A (H5N1) virus have called attention to the need for antiviral treatments to use in the event of pandemic influenza. The goal of antiviral treatments is also to reduce symptoms and complications associated with seasonal epidemics. Two classes of antiviral drugs, M2 proton channel inhibitors (amantadine, rimantadine) and neuraminidase inhibitors (zanamivir, oseltamivir), are effective for the chemoprophylaxis and treatment of influenza. Antiviral resistance is especially frequent with treatment with M2 inhibitors, and limits their clinical use. Resistance to oseltamivir during treatment has been described recently in several Vietnamese patients infected with H5N1. A close monitoring of antiviral resistance is needed, as is further research into the development of new agents, potentially targeting other viral proteins such as hemagglutinin or polymerase, and which could be used in combination chemotherapies.

Key words : influenza virus, antivirals, neuraminidase inhibitors, antiviral resistance.

(1) Unité de Génétique Moléculaire des Virus Respiratoires, URA CNRS 3015, EA302 Université Paris 7, Institut Pasteur, Paris.

La chimiothérapie anti-grippale jouera un rôle clé dans le contrôle d'une pandémie de grippe si elle se déclare. La circulation continue de virus aviaires A (H5N1) hautement pathogènes et le nombre croissant de cas humains d'infection à virus H5N1 observés depuis fin 2003 ont poussé de nombreux pays, dont la France, à constituer des stocks d'antiviraux dans le cadre de « Plans Pandémie » de prévention. La chimiothérapie joue également un rôle clé dans la réponse aux épidémies saisonnières. Elle peut être utilisée en préventif ou en curatif pour réduire les symptômes et les complications pouvant survenir lors de l'infection par un virus grippal de type B ou de sous-type A (H3N2) ou A (H1N1), les deux sous-types circulant actuellement dans la population humaine (revue dans Hayden & Pavia, 2006).

Un petit nombre d'antiviraux sont disponibles : l'amantadine (Symmetrel®, Mantadix®), la rimantadine (Flumadine®, Roflual®), le zanamivir (Relenza®) et l'oseltamivir (Tamiflu®) (revue dans Ong & Hayde, 2007). L'activité de l'amantadine et de la rimantadine a été identifiée dans les années 1960-70, dans le cadre d'un criblage systématique de molécules. Elles ont pour cible spécifique la protéine M2 des virus grippaux de type A et agissent lors de la phase précoce de la multiplication virale (figures 1 et 2). En inhibant quasi irréversiblement l'activité de canal à protons de la protéine M2, elles empêchent l'acidification de l'intérieur de la particule virale consécutive à l'internalisation du virus dans les endosomes, ce qui a pour effet

de bloquer la décapsidation et d'empêcher la libération des ribonucléoprotéines et leur translocation dans le noyau, siège de la réplication virale. Le zanamivir et l'oseltamivir ont été développés dans les années 1990, par des procédures de modélisation moléculaire ayant pour cible spécifique la neuraminidase (NA) (Kim *et al.* 1999; Von Itzstein *et al.* 1993) (figures 1 et 2). Leur structure est celle d'analogues du substrat de la NA, l'acide N-acétyl-neuraminique. Ces molécules interagissent avec le site catalytique et inhibent puissamment l'activité sialidase de la NA, ce qui aboutit à une diminution de la capacité des virions néoformés à se détacher de la cellule, puis à diffuser à travers le mucus des voies respiratoires riche en sialoglycoconjugués, et favorise l'agrégation des particules virales les unes aux autres du fait de la non-désialylation de leurs glycoprotéines de surface.

L'amantadine et la rimantadine ont fait la preuve de leur efficacité thérapeutique chez l'enfant, l'adulte et les personnes âgées, vis-à-vis de différents sous-types de virus A, mais non vis-à-vis des virus de type B. Administrés dans les 24-48 heures après le début des symptômes à des doses de 50-200 mg/j, ces composés permettent de réduire la sévérité et la durée des symptômes tels que la fièvre ou les signes respiratoires, et de retrouver plus rapidement une activité normale. Sur le plan virologique, le titre et la durée de l'excrétion virale sont significativement réduits chez les sujets traités. Plusieurs études ont mis en évidence le bénéfice d'un traitement par le zanamivir ou par l'oseltamivir

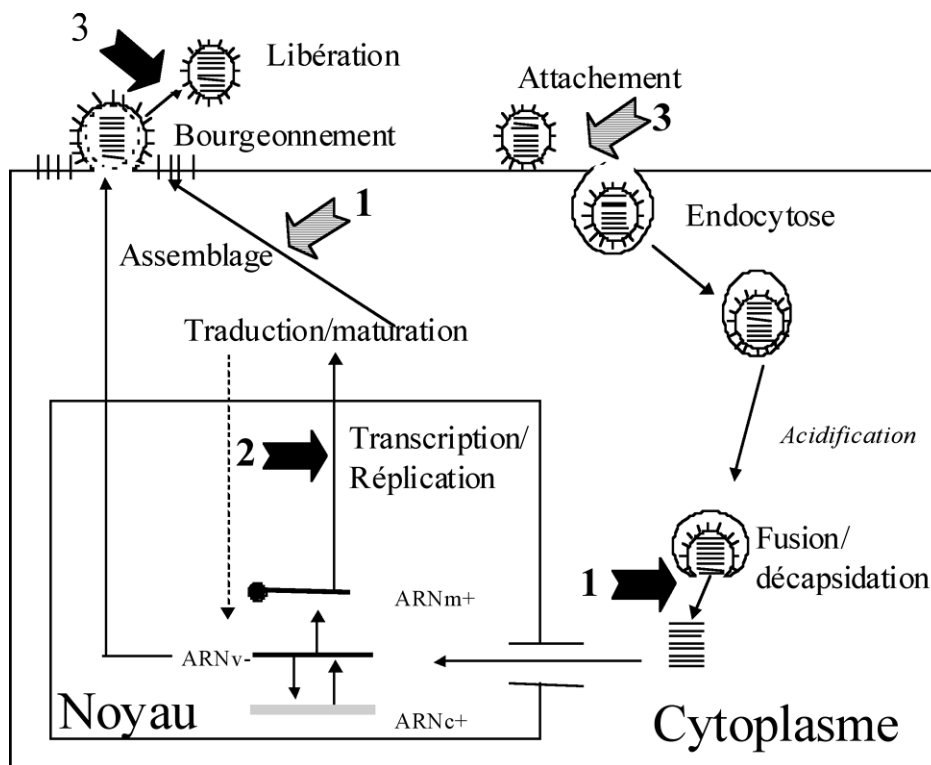


Figure 1 : Cycle de multiplication des virus grippaux des types A et B et niveaux d'action des antiviraux spécifiques. 1) pour l'amantadine et la rimantadine, 2) pour la ribavirine, 3) pour les inhibiteurs de la neuraminidase. Les flèches noires indiquent les cibles principales, les flèches grises indiquent les cibles secondaires. Reproduit d'après J. C. Manuguerra et S. van der Werf (2002), avec l'aimable autorisation des éditions John Libbey Eurotext.

lors de l'infection naturelle par les virus grippaux de type A ou B chez l'homme, lorsqu'ils sont administrés dans les 48 premières heures de l'infection. Le traitement par inhalation de 10 mg/j de zanamivir ou par administration orale sous forme de prodrogue de 150 mg/j d'oseltamivir permet de réduire le temps moyen de disparition des symptômes de 1 à 4 jours chez les patients atteints d'une grippe confirmée en laboratoire, cette réduction étant la plus importante chez les personnes à risques. Ces dernières souffrent moins de complications et ont moins recours aux antibiotiques lorsqu'elles ont été traitées au zanamivir ou à l'oseltamivir que lorsqu'elles ont reçu un placebo. Zanamivir et oseltamivir apparaissent à ce jour très bien tolérés, alors qu'amantadine et rimantadine provoquent des effets secondaires indésirables, notamment de nature neurologique pour l'amantadine. De par son mode d'administration orale, l'oseltamivir est plus avantageux que le zanamivir sur le plan pratique, et a une biodisponibilité plus large. Nous avons décrit, chez un patient immunodéprimé sous traitement au zanamivir, la persistance d'un virus grippal pourtant sensible au zanamivir, et l'élimination du virus après traitement à l'oseltamivir. La guérison complète du patient après le second traitement suggère que, chez les personnes immuno-déprimées, l'administration orale d'oseltamivir serait préférable (Medeiros *et al.* 2007).

La grande variabilité du génome des virus grippaux, liée au taux d'erreur élevé de l'ARN polymérase virale au cours de la répllication, favorise la sélection rapide de virus résistants à une molé-

cule inhibitrice (Hayden 2006). Ce phénomène pose un problème majeur dans l'utilisation de l'amantadine et de la rimantadine, vis-à-vis desquelles des virus résistants apparaissent rapidement en 2 à 5 jours chez environ 30 % des patients traités. La résistance est complètement croisée vis-à-vis des deux inhibiteurs. Elle est liée à l'apparition de mutations localisées au niveau de cinq résidus de la région transmembranaire de la protéine M2. Les virus résistants isolés chez l'homme apparaissent génétiquement stables, possèdent un pouvoir pathogène comparable à celui des virus sensibles et sont transmis de façon également efficace. De fait en 2005-2006, la proportion de virus H3N2, naturellement résistants aux inhibiteurs de M2 parmi les virus circulants, dépassait les 90 % dans certains pays d'Asie du Sud-Est et aux Amériques (Bright *et al.* 2005), et atteignait les 40 % dans les pays européens, alors que la proportion de virus H1N1 naturellement résistants atteignait globalement 15,5 % (Deyde *et al.* 2007), ce qui limite désormais l'utilisation de ces composés en clinique. La fréquence d'apparition de virus résistants vis-à-vis du zanamivir ou de l'oseltamivir chez les patients traités est beaucoup plus faible que vis-à-vis des inhibiteurs de la protéine M2 chez les adultes (de l'ordre de 1 %). Elle est plus élevée chez les enfants (de l'ordre de 5-6 %, voire davantage) et chez les sujets immunodéprimés. Des mutations de la NA, touchant des acides aminés du site enzymatique, confèrent une résistance qui peut être soit spécifique du zanamivir ou de l'oseltamivir, soit croisée. Des mutations de la HA, réduisant l'affinité de la protéine pour son récepteur cellulaire,

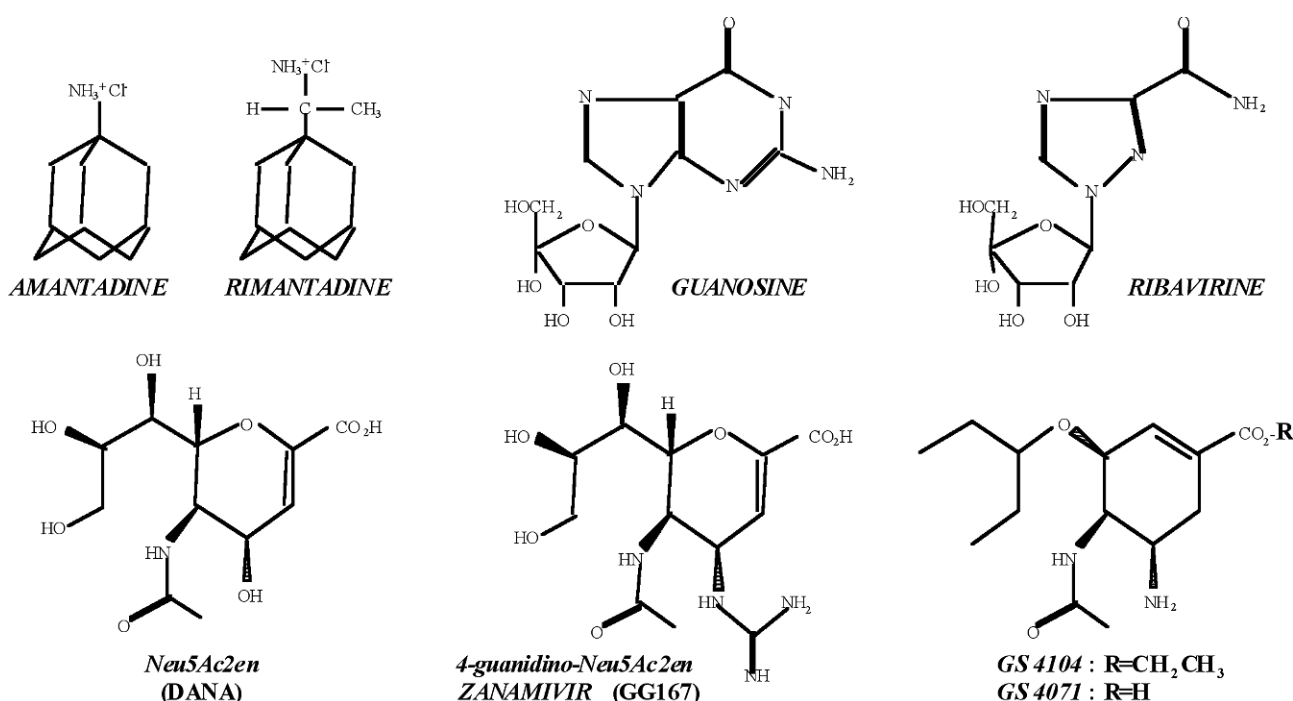


Figure 2 : Structures chimiques des molécules antivirales développées pour lutter contre les virus grippaux. La ribavirine est un analogue de synthèse de la guanosine qui inhibe l'IMP déshydrogénase, une enzyme clé de la voie de biosynthèse des purines. Les sigles GS4071 et GS4101 désignent respectivement l'oseltamivir (la prodrogue métabolisée par des estérases du foie) et l'oseltamivir carboxylate (la forme active de l'antiviral). Reproduit d'après J. C. Manuguerra et S. van der Werf (2002), avec l'aimable autorisation des éditions John Libbey Eurotext.

peuvent rendre le virus moins dépendant de son activité sialidase et se traduire par une résistance croisée vis-à-vis de tous les inhibiteurs de la NA : ce second mécanisme de résistance n'a été observé qu'*in vitro*. Les virus résistants porteurs de certaines mutations dans la NA (comme les mutations de résistance à l'oseltamivir Arg292Lys dans la N2, His274Tyr dans la N1) présentent une infectivité, une virulence et une transmissibilité diminuées par rapport à celles des virus parentaux dans des modèles animaux (Herlocher *et al.* 2004; Yen *et al.* 2005a). Mais d'autres mutations de résistance (comme la mutation de résistance à l'oseltamivir Glu119Val dans la N2) atténuent peu le virus (Yen *et al.* 2005a). Compte tenu de ces données et de l'augmentation des prescriptions d'oseltamivir, un réseau international de surveillance de la résistance aux anti-neuraminidase a été mis en place au début des années 2000. Des variations de la sensibilité naturelle à l'oseltamivir des virus circulants ont été observées en lien avec l'évolution génétique des virus sans toutefois d'acquisition de résistance (Monto *et al.* 2006).

En ce qui concerne les virus A (H5N1), certains sont naturellement résistants aux adamantanes (amantadine et rimantadine) mais tous sont naturellement sensibles aux anti-neuraminidases (De Clercq & Neyts, 2007). En caractérisant douze virus H5N1 isolés chez l'homme ou chez la volaille durant la période 1997-2005, nous avons mis en évidence que même en l'absence de pression de sélection liée au traitement antiviral, la neuraminidase des virus H5N1 peut être l'objet de variations génétiques aboutissant à une différence significative de la sensibilité aux anti-NA (Rameix-Welti *et al.* 2006). Pour ces virus ayant un potentiel pandémique, il est donc particulièrement nécessaire d'évaluer de façon continue l'effet de la dérive génétique sur la sensibilité aux anti-NA, y compris en l'absence de traitement. Chez la souris et le furet, la protection contre l'infection par un virus H5N1 hautement pathogène n'est observée que si la durée et la posologie du traitement à l'oseltamivir sont augmentées par rapport ceux qui s'appliquent aux virus H3N2 et H1N1 circulants (Yen *et al.* 2005b). Il n'est pas certain que ces modèles animaux soient prédictifs de la réponse au traitement chez l'homme. Cependant, l'extrême virulence des virus H5N1 chez l'homme et la physiopathologie particulière de l'infection (dissémination virale extrapulmonaire, hyper-cytokinémie) nécessiteront probablement la mise au point d'un protocole thérapeutique adapté (Lye *et al.* 2007). L'oseltamivir a été utilisé en Asie du Sud-Est pour traiter des patients infectés par un virus H5N1. Il est cependant difficile de dresser un bilan de l'effet du traitement sur la mortalité, car des paramètres critiques tels que le temps écoulé entre l'apparition des premiers symptômes et l'administration d'oseltamivir, ou la co-administration d'un autre traitement, sont très variables d'un patient à l'autre. L'émergence de virus résistants à l'oseltamivir (restés sensibles au zanamivir) a été détectée chez certains patients (De Jong *et al.* 2005; Le *et al.* 2005). Il apparaît donc plus que jamais nécessaire de développer de nouvelles stratégies antivirales pour

pouvoir, avant de disposer d'un vaccin pour lutter contre un sous-type viral nouveau ou réintroduit chez l'homme, limiter les effets de la pandémie.

Pour faire face à l'émergence de résistances dans les traitements anti-infectieux, la stratégie de choix est le recours à la polychimiothérapie. L'association de molécules ayant des cibles différentes ou provoquant des mutations différentes permet de réduire les probabilités de l'apparition d'un mutant polyrésistant. Dans le cas de la grippe, compte tenu du nombre limité de molécules actives disponibles à ce jour, relativement peu de combinaisons ont été testées. Des isolats cliniques humains A (H1N1) et A (H3N2) ont été testés en culture cellulaire contre des combinaisons de quatre antiviraux ayant des mécanismes d'action différents : la rimantadine, la ribavirine, l'interféron et le zanamivir/l'oseltamivir (**figure 2**). L'effet de la plupart des combinaisons de deux composés s'est avéré additif et, en présence d'amantadine plus oseltamivir, l'apparition de mutants résistants à chacun des composés utilisés isolément semble limitée (Ilyushina *et al.* 2006). Afin d'élargir l'arsenal thérapeutique disponible contre les virus grippaux, de nouvelles cibles sont à l'étude. Des inhibiteurs de l'hémagglutine (Jones *et al.* 2006) et de la polymérase virale (Sidwell *et al.* 2007) ont d'ores et déjà démontré leur activité dans des modèles animaux. Une étude récente indique que l'injection d'anticorps monoclonaux neutralisants, sécrétés par des lymphocytes B dérivés de patients ayant guéri d'une infection à virus H5N1, a une efficacité thérapeutique et prophylactique dans le modèle murin de l'infection (Simmons *et al.* 2007). Ces résultats encouragent à explorer le potentiel de ce type de sérothérapie chez l'homme. Citons enfin la stratégie qui consiste à prendre pour cible un constituant cellulaire avec lequel le virus grippal interagit au cours du cycle répliatif, et qui en théorie, minimise la probabilité d'une résistance. Une étude récente, ayant pris pour cible les acides sialiques récepteurs, démontre qu'en présence d'une sialidase recombinante fusionnée à un peptide d'ancrage à la surface cellulaire, ajoutée au milieu de culture des cellules *in vitro* ou administrée par aérosol à des souris, la multiplication virale est très significativement réduite (Malakhov *et al.* 2006).

Les prochaines années verront les plus prometteuses de ces approches faire l'objet d'essais cliniques. Pour chacune d'entre elles, la fréquence d'apparition de résistances ainsi que le degré de transmissibilité et la capacité de diffusion des virus résistants devront être évalués soigneusement. Stimulées par la récente prise en considération du risque pandémique par les pouvoirs publics, ces études vont peut-être bouleverser la lutte contre les épidémies de grippe annuelles. S'il demeure indispensable de rappeler que les personnes à risques doivent prévenir la grippe plutôt que la guérir en se faisant vacciner, disposer d'antiviraux efficaces et plus nombreux devrait permettre d'envisager l'application large d'un traitement étiologique de la grippe.

BIBLIOGRAPHIE

- Bright, R.A., Medina, M.J., Xu, X., Perez-Oronoz, G., Wallis, T.R., Davis, X.M., Povinelli, L., Cox, N.J., Klimov, A.I. 2005. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005 : a cause for concern. *Lancet* 366: 1175 – 1181.
- De Clercq, E. & Neyts J. 2007. Avian influenza A (H5N1) infection : targets and strategies for chemotherapeutic intervention. *Trends Pharmacol Sci.* 28: 280 – 285.
- De Jong, M., Tran, T., Truong, H., Vo, M., Smith, G., Nguyen, V. 2005. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *New England Journal of Medicine* 353: 2667 – 2672.
- Deyde, V., Xiyang, X., Bright, R., Shaw, M., Smith, C., Zhang, Y., Shu, Y., Gubareva L., Cox N.J., Klimov, A. 2007. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A (H3N2) and A (H1N1) isolated worldwide. *Journal of Infectious Diseases* 196: 249 – 257.
- Hayden, F.G. 2006. Antiviral resistance in influenza viruses-implications for management and pandemic response. *N Engl J Med.* 354: 785 – 788.
- Hayden, F.G. & Pavia, A.T. 2006. Antiviral management of seasonal and pandemic influenza. *J Infect Dis.* 194 Suppl 2: S119 – 26.
- Herlocher, M.L., Truscon, R., Elias, S., Yen, H.L., Roberts, N.A., Ohmit, S.E.S., Monto, A.S. 2004. Influenza viruses resistant to the antiviral drug oseltamivir: transmission studies in ferrets. *J Infect Dis.* 190: 1627 – 1630.
- Ilyushina, N.A., Bovin, N.V., Webster, R.G., Govorkova, E.A. 2006. Combination chemotherapy, a potential strategy for reducing the emergence of drug-resistant influenza A variants. *Antiviral Res.* 70: 121 – 131.
- Jones, J.-C., Turpin, E.A., Bultmann, H., Brandt, C.R., Schultz-Cherry, S. 2006. Inhibition of influenza virus infection by a novel antiviral peptide that targets viral attachment to cells. *J Virol.* 80: 11960 – 11967.
- Kim, C.U., Chen, X., Mendel, D.B. 1999. Neuraminidase inhibitors as anti-influenza virus agents. *Antivir Chem Chemother.* 10: 141 – 154.
- Le, Q.M., Kiso, M., Someya, K., Sakai, Y.T., Nguyen, T.H., Nguyen, K.H., Pham, N.D., Ngyen, H.H., Yamada, Y., Muramoto, T. *et al.* 2005. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* 437: 1108.
- Lye, D.C., Ang, B.S., Leo, Y.S. 2007. Review of human infections with avian influenza H5N1 and proposed local clinical management guideline. *Ann Acad Med Singapore* 36: 285 – 292.
- Malakhov, M.P., Aschenbrenner, L.M., Smee, D.F., Wandersee, M.K., Sidwell, R.W., Gubareva, L.V., Mishin, V.P., Hayden, F.G., Kim, D. H, Ing, A. *et al.* 2006. Sialidase fusion protein as a novel broad-spectrum inhibitor of influenza virus infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 1470 – 1479.
- Manuguerra, J.-C. & van der Werf, S. 2002. Les inhibiteurs de neuraminidase : une nouvelle classe d'antiviraux contre la grippe. *Virologie* 6: S129 – S138.
- Medeiros, R., Rameix-Welti, M.A., Lorin, V., Ribaud, P., Manuguerra, J. C., Socie, G., Scieux, C., Naffakh N., Van der Werf, S. 2007. Failure of zanamivir therapy for pneumonia in a bone-marrow transplant recipient infected by a zanamivir-sensitive influenza A (H1N1) virus. *Antivir Ther.* 12: 571 – 576.
- Monto, A.S., McKimm-Breschkin, J.-L., Macken, C., Hampson, A.W., Hay, A., Klimov, A., Tashiro, M., Webster, R. G, Aymard, M., Hayden, F.G., Zambon M. 2006. Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 2395 – 2402.
- Ong, A.K. & Hayden F.G. 2007. John F. Enders lecture 2006 : antivirals for influenza. *J Infect Dis.* 196: 181 – 190.
- Rameix-Welti, M.A., Agou, F., Buchy, P., Mardy, S., Aubin, J.T., Veron, M., Van der Werf, S., Naffakh, N. 2006. Natural variation can significantly alter sensitivity of Influenza A (H5N1) viruses to oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 3809 – 3815.
- Sidwell, R.W., Barnard, D.L., Day, C.W., Smee, D. F, Bailey, K.W., Wong, M.H., Morrey, J.-D., Furuta, Y. 2007. Efficacy of orally administered T-705 on lethal avian influenza A (H5N1) virus infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 51: 845 – 851.
- Simmons, C.P., Bernasconi, N.L., Suguitan, A.L., Mills, K., Ward, J.-M., Chau, N.V., Hien, T.T., Sallusto, F., Ha do, Q., Farrar, J. *et al.* 2007. Prophylactic and therapeutic efficacy of human monoclonal antibodies against H5N1 influenza. *PLoS Med.* 4: e178.
- Von Itzstein, M., Wu, W.Y., Kok, G.B., Pegg, M.S., Dyason, J.-C., Jin, B., Van Phan, T., Smythe, M.L., White, H.F., Oliver, S.W. *et al.* 1993. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* 363: 418 – 423.
- Yen, H.L., Herlocher, L.M., Hoffmann, E., Matrosovich, M.N., Monto, A. S, Webster, R.G., Govorkova, E.A. 2005a. Neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses may differ substantially in fitness and transmissibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 4075 – 4084.
- Yen, H.L., Monto, A.S., Webster, R.G., Govorkova, E.A. 2005b. Virulence may determine the necessary duration and dosage of oseltamivir treatment for highly pathogenic A/Vietnam/1203/04 influenza virus in mice. *J Infect Dis.* 192: 665 – 672.

