

LES ANTIRETROVIRAUX MECANISMES DE RESISTANCE

Dr. Asma JLIZI

***Laboratoire de référence VIH/SIDA TUNISIE
Laboratoire de Microbiologie , Hôpital Charles Nicolle, Tunis,***

Définition de la Résistance

La résistance virale est définie comme la capacité d'un virus à se multiplier en présence d'un traitement antirétroviral.

Elle est la conséquence de la présence d'une ou de l'accumulation de mutations spécifiques sur les gènes du VIH qui codent pour la RT, la PR et d'autres enzymes ou protéines du virus ciblées par les traitements.

Ces mutations entraînent une modification structurelle ou fonctionnelle de ces protéines.

Les ARV ne sont pas directement responsables de la résistance, ils contribuent surtout à la sélection de mutants résistants.

Réplication intense du virus (10^9 nouvelles particules par jour)

ET

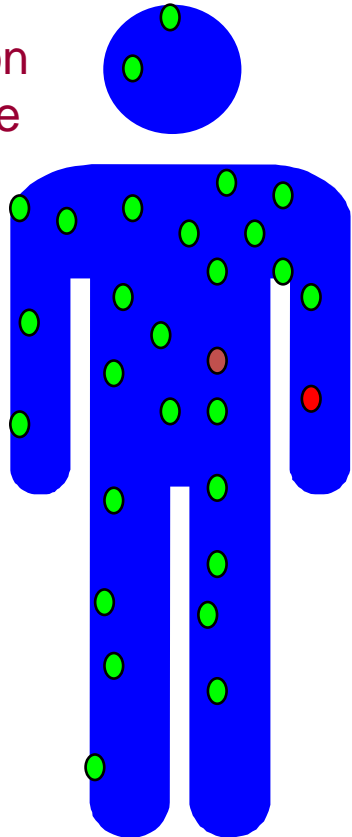
Le manque de fidélité de la transcriptase inverse → Taux des mutations engendrées ($3.4 \cdot 10^{-5}$ / pb et par cycle de réplication)



Variants ou quasi-espèces présentant les mutations touchant les différents codons du génome viral

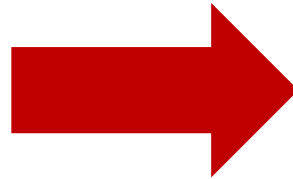
Evolution des quasi-espèces

Infection
primaire



Populations virales
homogènes

Temps

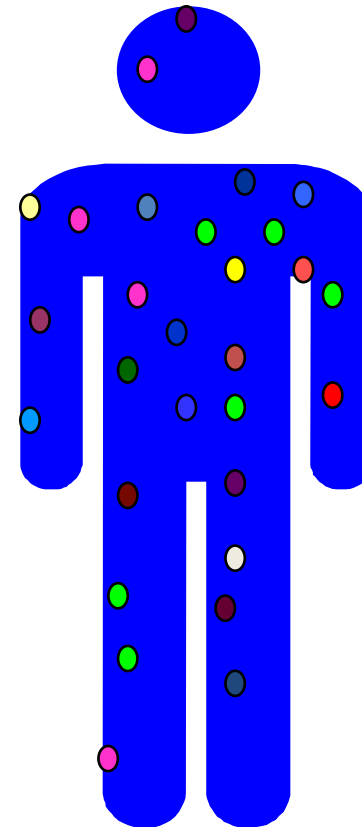


Réplication virale

Pression immune

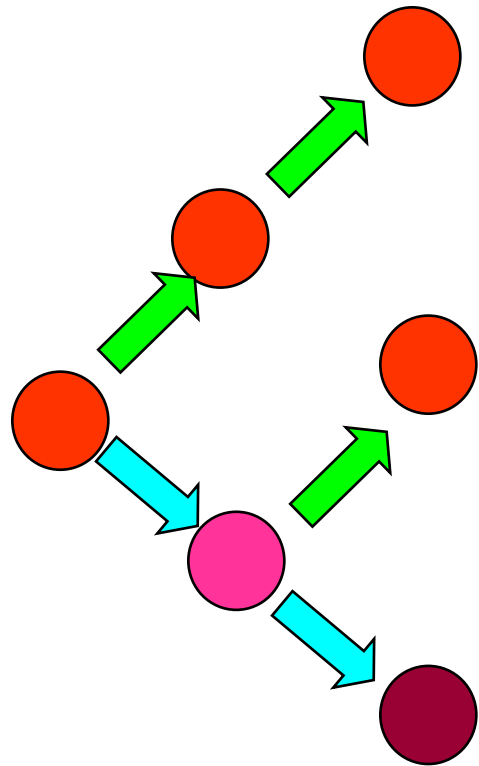
Sélection virale

Infection
établie



Populations virales
hétérogènes

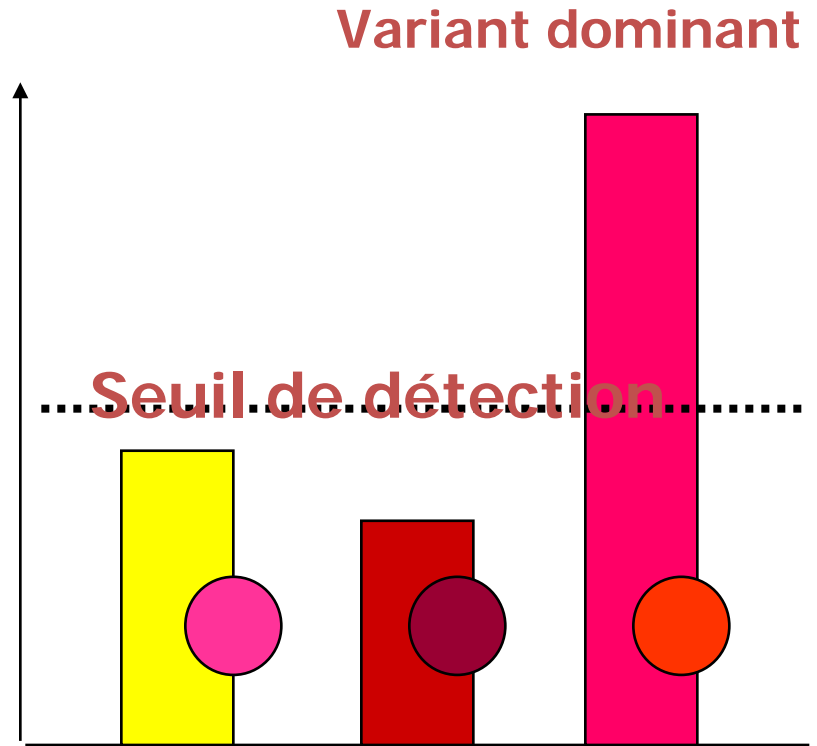
Mutations et variants dominants



Virus sauvage

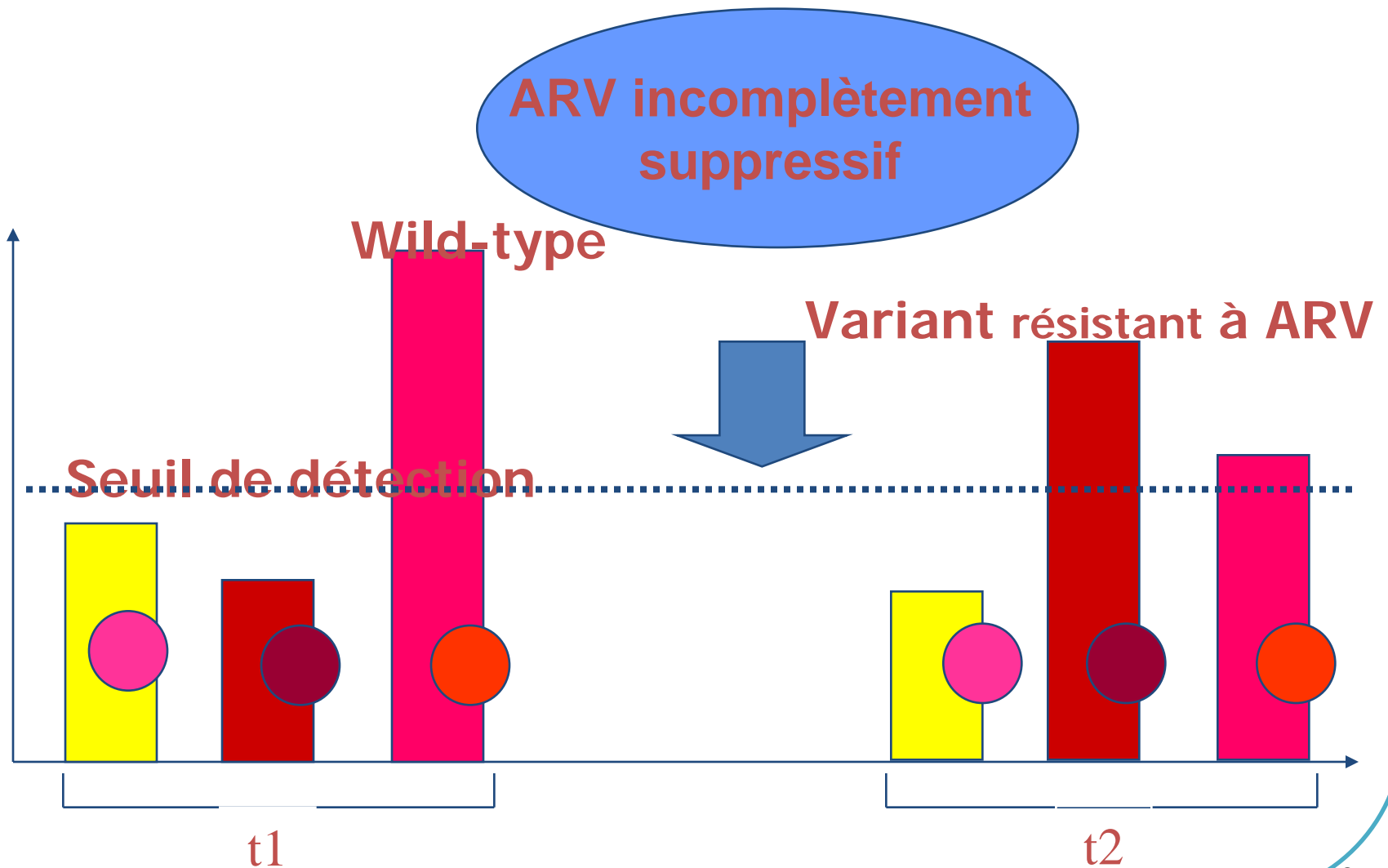


Virus mutés

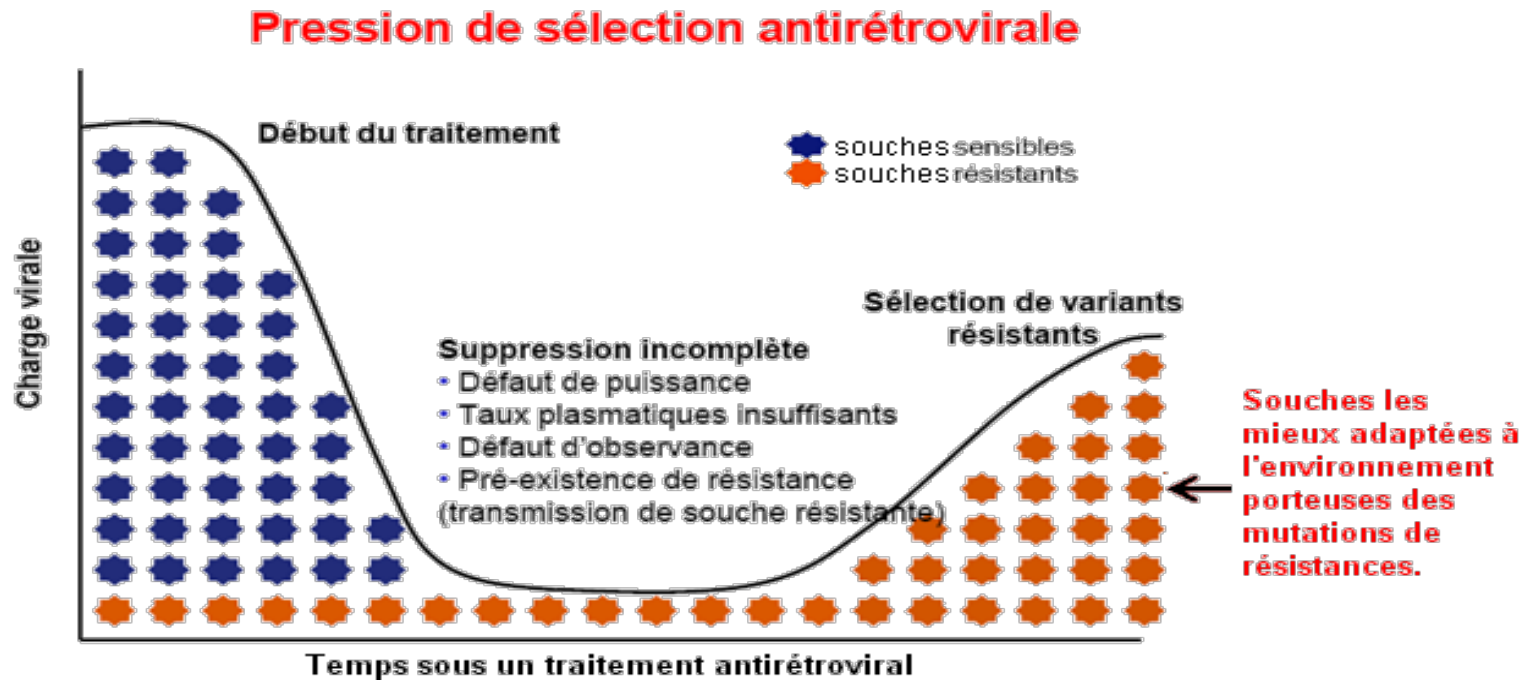


Coexistence de plusieurs variants

Pression de sélection



Échappement thérapeutique



- Élimination des souches virales sensibles
- Sélection des souches résistantes (Présentant des mutations de résistance au niveau du gène de la protéase et/ou de la transcriptase inverse) offrant un avantage répliatif en présence de ces inhibiteurs.

Conduite à tenir devant un échec thérapeutique

Échec thérapeutique

- Clinique
- Immunologique
- Virologique

Tolérance++

Interactions

Médicamenteuses+

Pharmacodynamie

Observance+++

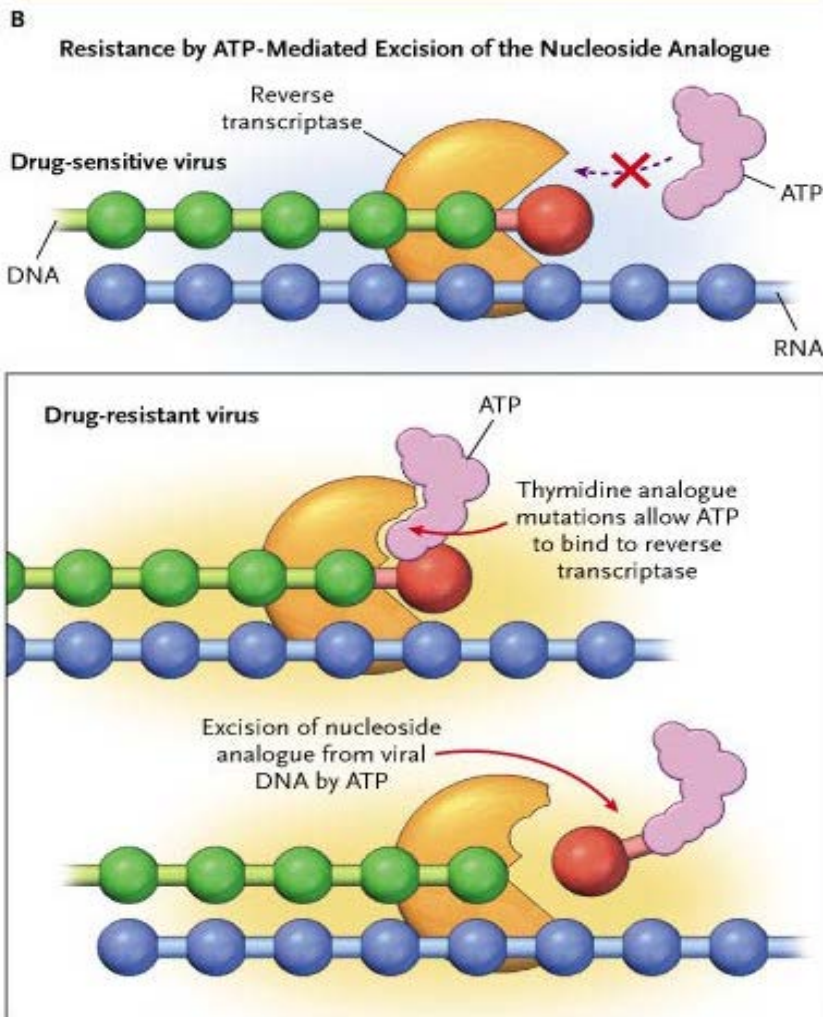
Rechercher les mutations
de résistance

Intervention

Correction
ou
Switch
thérapeutique

MECANISMES DE LA RESISTANCE

L'excision de l'analogue nucléosidique déjà incorporé



TAMs (Thymidine Analog Mutations)
M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F
et K219Q/E.

**Les analogues de la thymidine,
AZT et d4T**

**Ces TAM, en fonction du
nombre de mutations, peuvent
être responsables de
résistances croisées aux
autres INTI (AZT, d4T, ABC...
TDF), sauf à la lamivudine 3TC.**

MECANISMES DE LA RESISTANCE

L'excision de l'analogue nucléosidique déjà incorporé

Mutation	Sélectionnée par	Commentaires
<u>TAMs</u> = M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, K219Q/E	AZT, d4T	<ul style="list-style-type: none">• Résistance tous les IN sauf la 3TC• Résistance croisée variable selon le nombre TAMs et de l'INTI• K70R et K219Q/E moins d'impact sur ces résistances croisées

Associations particulières de mutations

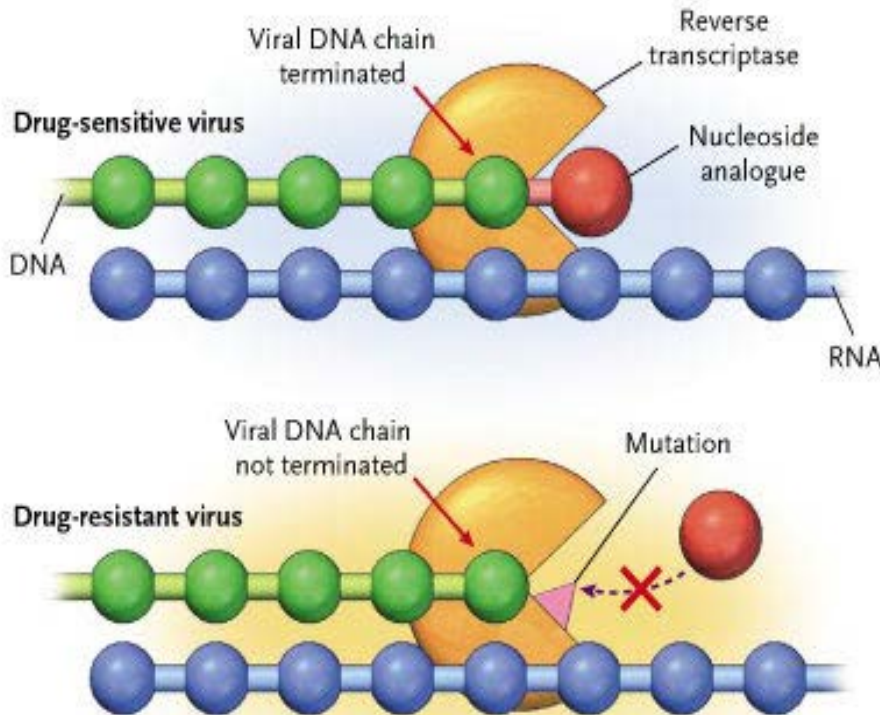
M184V + TAMs :

- ↗ la résistance à l'ABC
- **pas d'impact sur TDF**, ni sur **ddl**

MECANISMES DE LA RESISTANCE

Diminution de l'incorporation de l'analogue

A
Resistance by Interference with the Incorporation of a Nucleoside Analogue



•résistance à 3TC /M184V

Mutations au niveau du site d'incorporation des INRT

M184V, K65R, L74V, Q151M

→↓ incorporation

→Cross reactions : AZT, d4T, ABC...

→ TDF –


→Q151M et Insertions → résistance de classe

MECANISMES DE LA RESISTANCE

Diminution de l'incorporation de l'analogue

Mutation	Sélectionnée par	Commentaires
M184V	3TC, FTC	<ul style="list-style-type: none"> • Augmente la résistance à ABC en présence de TAMs • Pas d'impact sur TDF ni ddl • Réduction de la capacité répliquative du VIH in vitro
Q151M (A62V, V75I, F77L, F116Y)		<ul style="list-style-type: none"> • Haut niveau de résistance sauf pour TDF et 3TC
L74V	ddl, ABC	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Impact sur l'efficacité de ddl et ABC ▪ Association fréquente avec la M184V
K65R	TDF principalement	<ul style="list-style-type: none"> • Impact nul sur les thymidiniques • AZT = INTI de choix en présence de K65R • Impact certain sur TDF et probable sur les autres INTI mais de niveau variable. • Fréquence ↗ mais reste entre 3 et 5% • Susceptible de se développer sous ABC et/ou ddl + TDF en l'absence de TAMs • Moins susceptible de se développer si TAMs • Utilisation de TDF+ABC à réserver aux patients en échec présentant des TAMs • Réduction de la capacité répliquative in vitro
K70E	TDF principalement	

Algorithmes : changement de traitement

1ère ligne	Mutations sélectionnées	2ème ligne
AZT+3TC	i) M184V ^a ii) TAMs ^b	i) ABC ii) ddI iii) TDF ^d (selon le nombre de TAMs)
ABC+3TC	i) M184V ii) L74V iii) K65R iv) Y115F	i) AZTou d4T ii) TDF sauf si présence L74V
	 ordre de fréquence	
TDF+FTC	i) M184V ^c ii) K65R (rare)	i) AZTou d4T ^d

^a la présence de la M184V retarderait l'apparition des TAMs

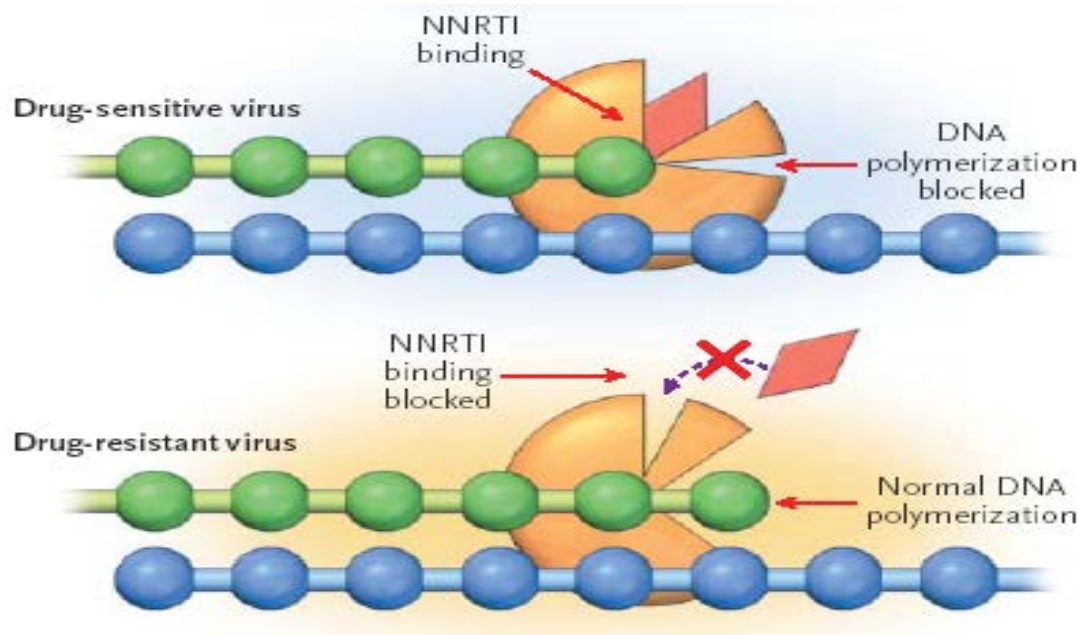
^b le nombre de TAMs augmente progressivement et possibilité de résistance croisée à la classe

^c M184V sélectionnée moins rapidement et moins fréquemment sous FTC que sous 3TC

^d la présence de TAMs empêche l'arrivée de la K65R et vice-versa

MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX INNRT

Les mutations de résistance aux NNRTI empêchent la fixation des NNRTI sur le site allostérique.



- Une seule mutation (**K103N**) va entraîner une résistance de haut niveau à l'INNRT et à l'ensemble des autres molécules de cette classe.
- Ce sont des molécules dont la « barrière génétique » est basse puisqu'une seule mutation leur confère une résistance élevée

MECANISMES DE LA RESISTANCE

MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX INNRT

Etravirine : INNTI de deuxième génération est actif sur certains profils de mutations de résistance aux INNTI actuels.

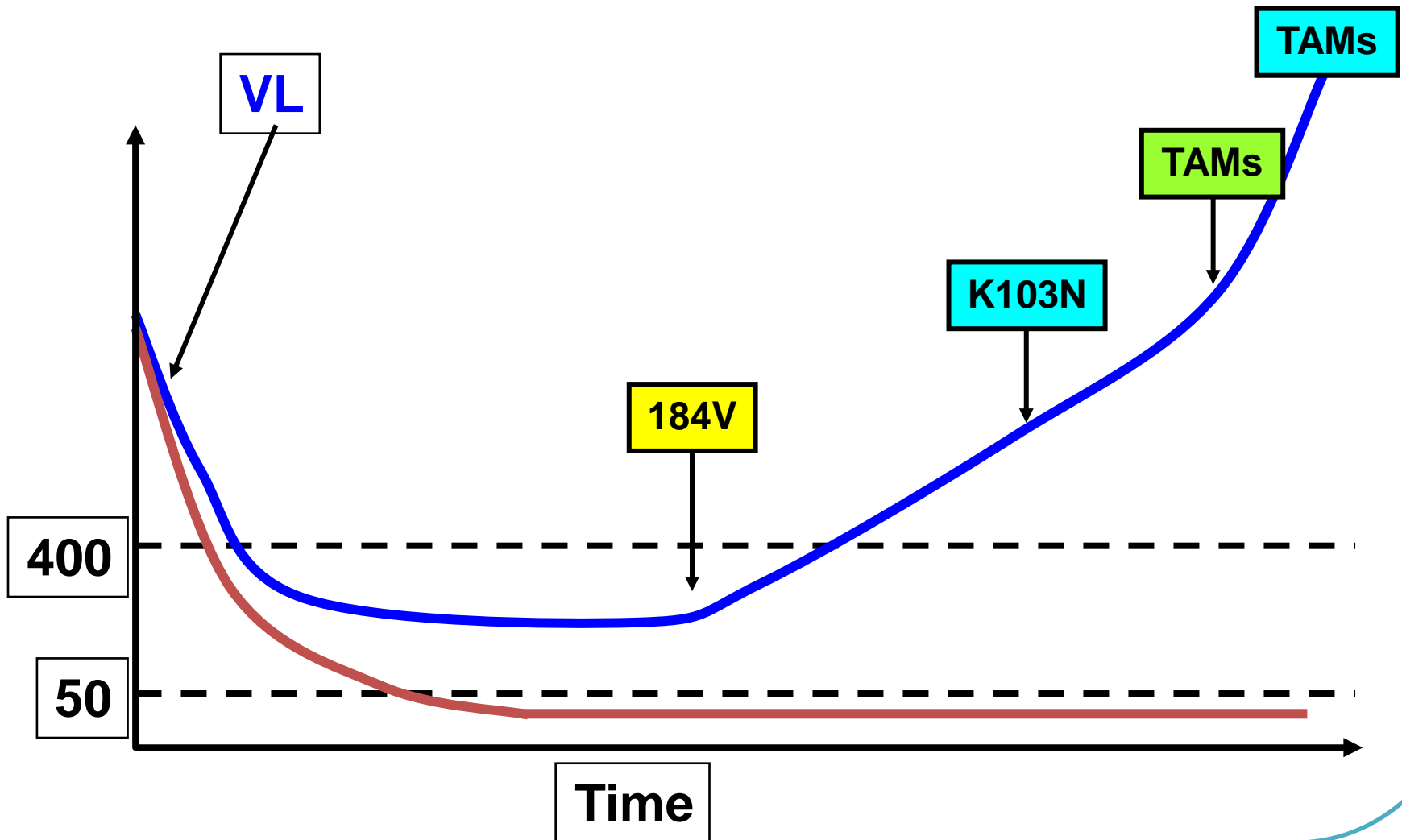
→ L'accumulation de mutations de résistance aux INNTI diminue fortement l'efficacité de l'étravirine

→ Donc fortement recommandé de **ne pas laisser une réplication résiduelle sous efavirenz ou névirapine = accumulation de mutations à la classe et ↘ efficacité ultérieure des 2èmes générations.**

Efavirenz	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		
Nevirapine	L	K	V	V	Y	Y	G	
	100	103	106	108	181	188	190	
	I	N	A	I	C	C	A	
			M		I	L		
						H		
Etravirine ¹³	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		

MECANISMES DE LA RESISTANCE

Évolution de l'apparition des mutations sous INRT+INNRT



MECANISMES DE LA RESISTANCE

Peut-on prédire la résistance lors d'un échec de 1ère ligne avec NNRTI?

Regimes	Détection	ARV affecté
ZDV+3TC+NNRTI	Précoce Tardive	3TC, NVP,EFV + ZDV, d4T, ABC>DDI, TDF
d4T+3TC+NNRTI	Précoce Tardive	3TC,NVP,EFV + ZDV, d4T, ABC>DDI
ABC+3TC+NNRTI	Précoce Intermédiaire Tardive	3TC, NVP,EFV + ABC,DDI + TDF , d4T
TDF+3TC+NNRTI	Précoce	3TC, NVP,EFV +TDF, ABC, DDI, d4T

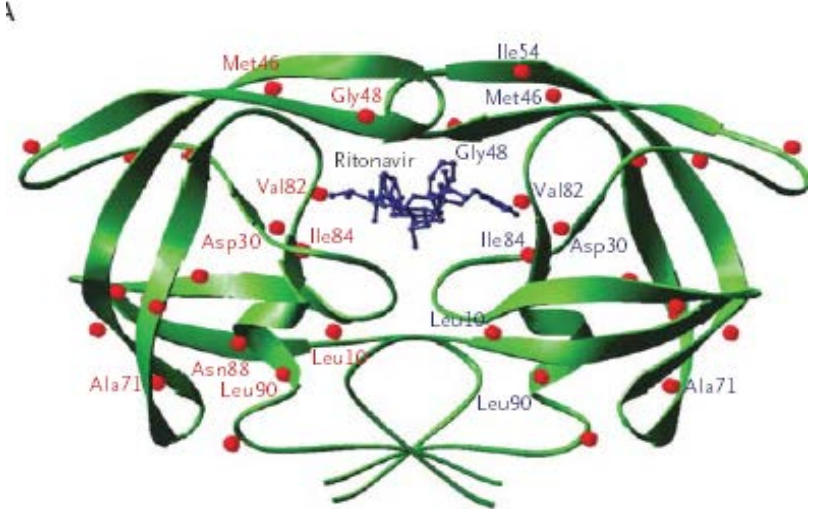
MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX IP

La résistance aux IP est liée à des mutations situées au niveau du site actif de cet enzyme et à distance.

Typiquement, la résistance aux IP est un phénomène graduel avec accumulation progressive de mutations.

On distingue:

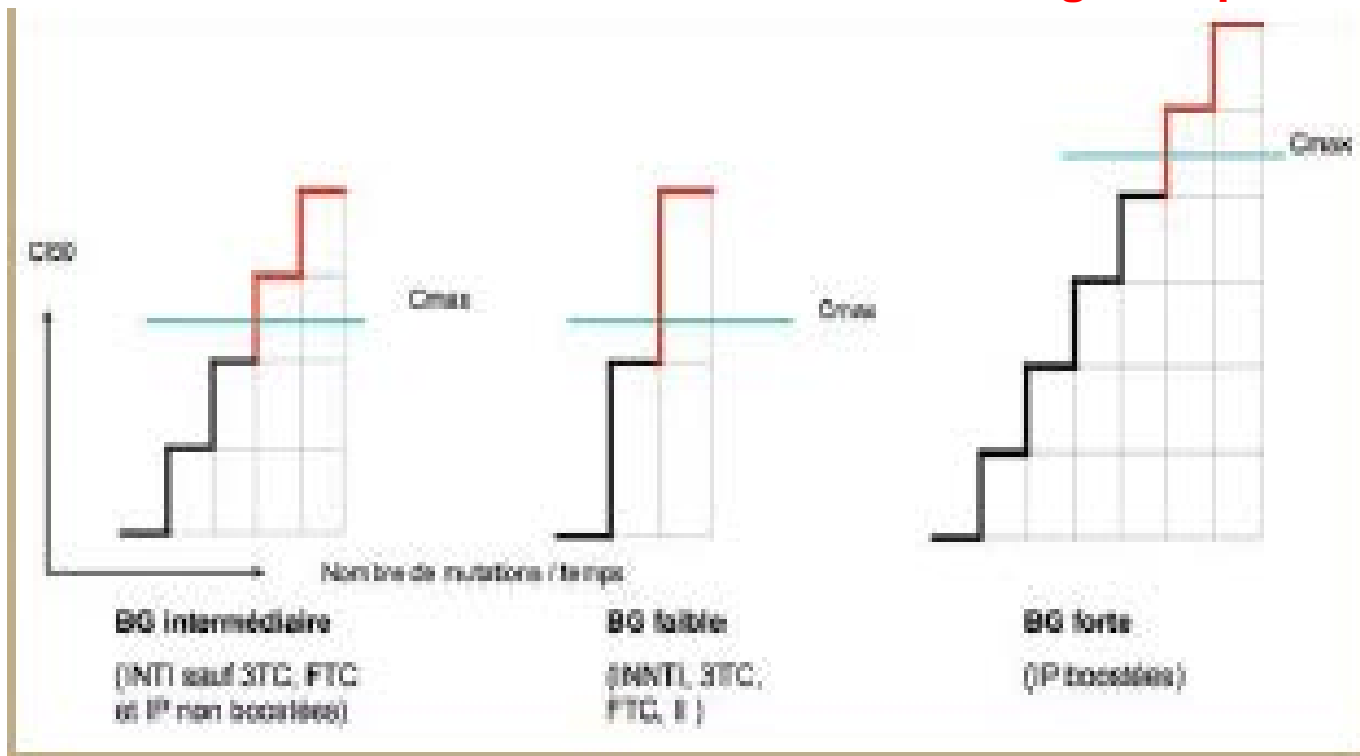
- les mutations primaires sélectionnées les premières lors d'un échappement, très souvent situées au niveau du site actif de l'enzyme;
- les mutations secondaires qui viendront s'accumuler pour renforcer la résistance.



MECANISMES DE LA RESISTANCE

MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX IP

- Grande différence avec **les IP boostées, dont la barrière génétique est élevée.**

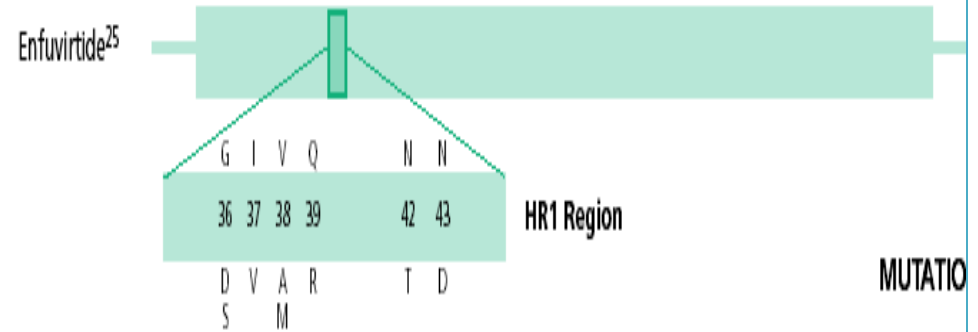


- Donc **dans le 1er traitement d'un patient par un IP : utiliser un IP boosté**

MECANISMES DE LA RESISTANCE

MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX T20

- Mutations en position 36 à45 du domaine HR1 de la gp41
- Mutations d'apparition rapid

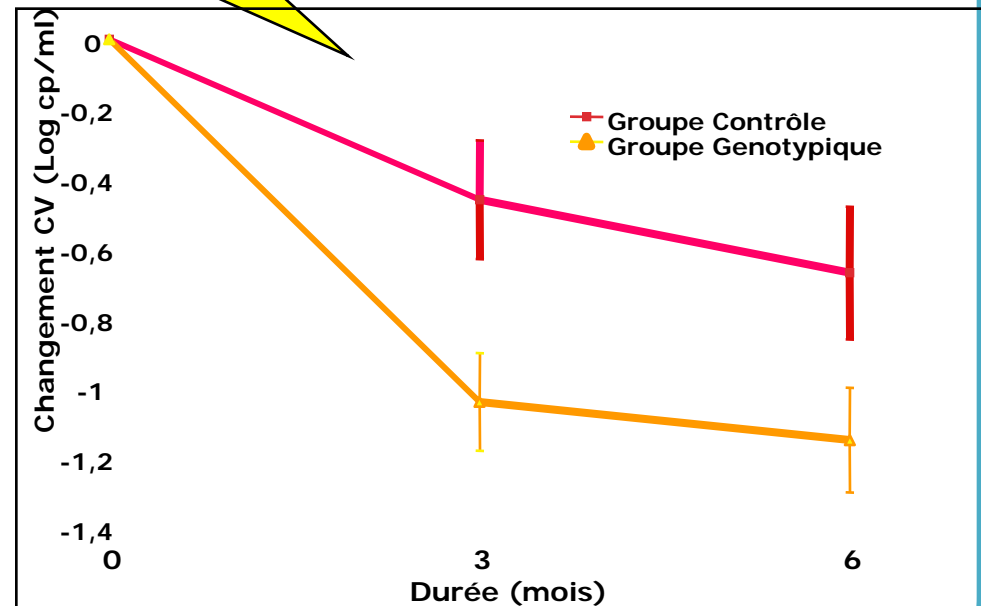


MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUTRE

- Pas de mutation croisée connue à ce jour avec les anti CCR5
- Mutants aux anti CCR5 pourraient changer d'utilisation de co-récepteur et passer vers le CXCR4 = mécanisme possible de mutation aux anti-CCR5

POURQUOI ETUDIER LA RESISTANCE AUX ARV

1. Pour aider au choix du meilleur traitement possible
2. Pour expliquer et traiter les échecs thérapeutiques
3. Pour évaluer la prévalence des mutations de résistance au sein de la population (patients naïfs notamment)



Adapté de Durant et al. Lancet 2000

- **Examen clinique et évaluation biologique**
 - **Suivre la charge virale et du taux de CD4 durant la trithérapie**
 - Perte de poids, présence d'infection opportuniste
- **Tests phénotypiques**
 - Mesurent la capacité du virus à se multiplier en présence de différentes concentrations d'un médicament antirétroviral spécifique.
- **Tests génotypiques**
 - Séquence génétique du virus: révèle les différences entre le virus du patient et le virus sauvage; analyse les mutations présentes sur les gènes de transcriptase reverse (RT) et Protéase

Projet Global Fund (2009)

**« APPUI AU PARTENARIAT ET AU RENFORCEMENT DE
LA RIPOSTE À LA MENACE D'EXTENSION DU
VIH/SIDA EN TUNISIE »**

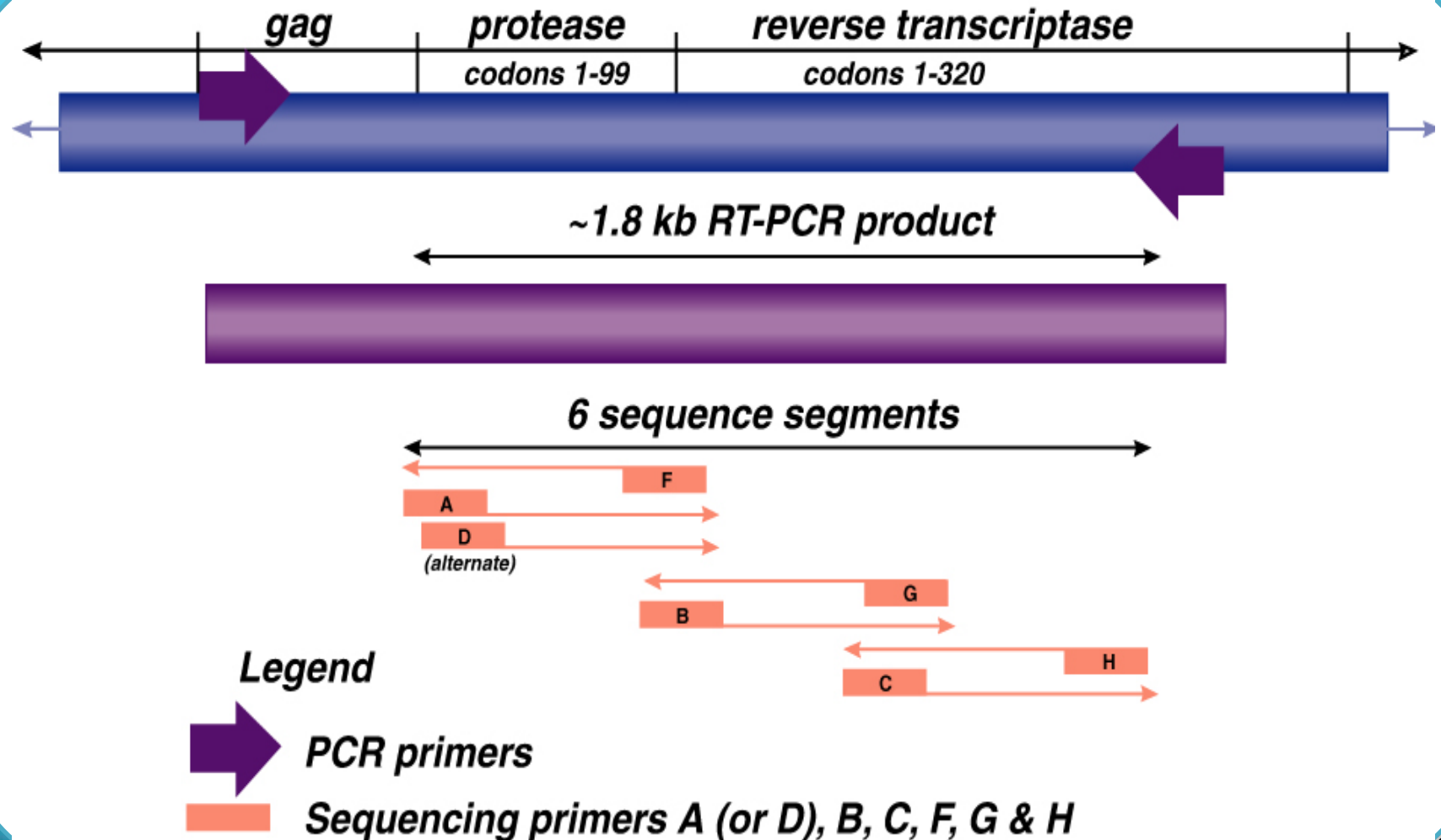


ONUSIDA
PROGRAMA CONJUNTO DE LAS NACIONES UNIDAS SOBRE EL VIH/SIDA

ACNUR UNODC
UNICEF OIT
PMA UNESCO
PNUD OMS
UNFPA BANCO MUNDIAL

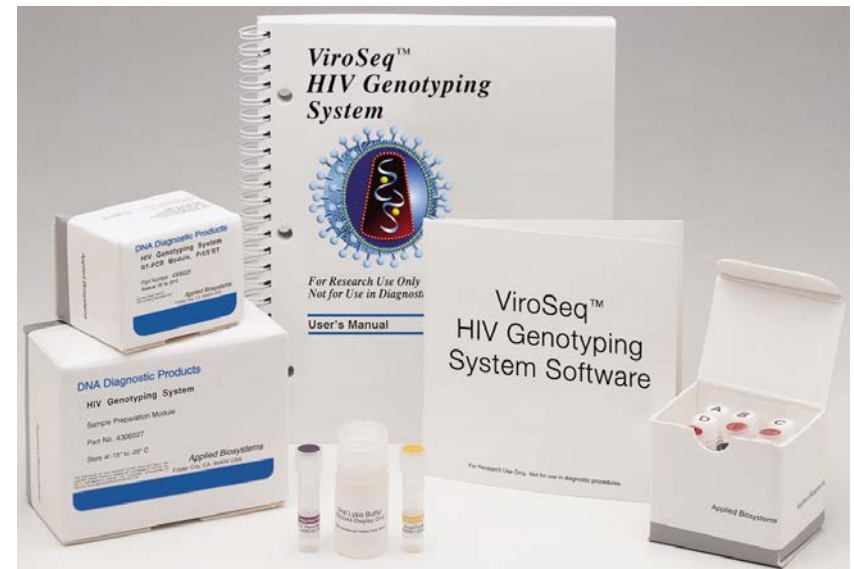
**Mise au point du test génotypique de résistance
du VIH utilisant le kit commercialisé VIROSEQ**

Principe

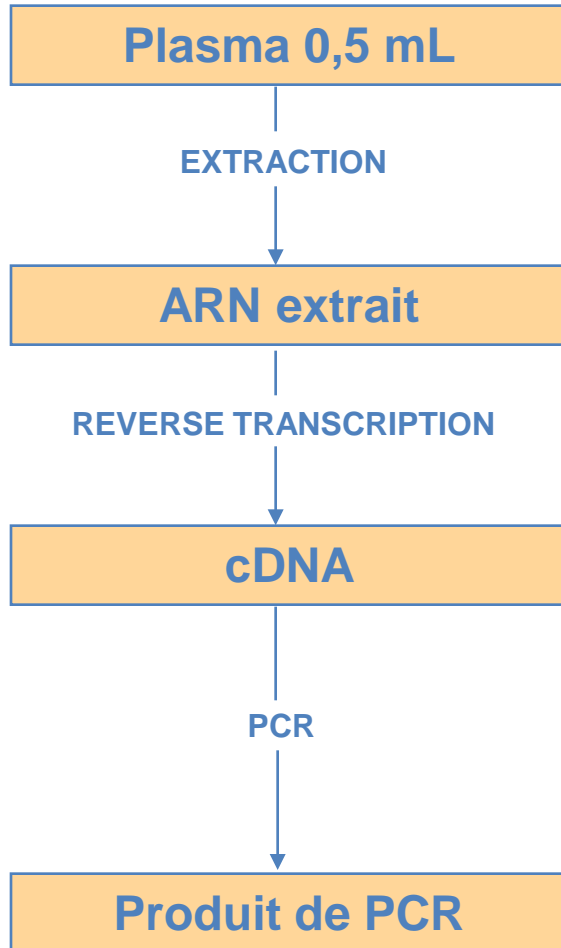


Systeme complet

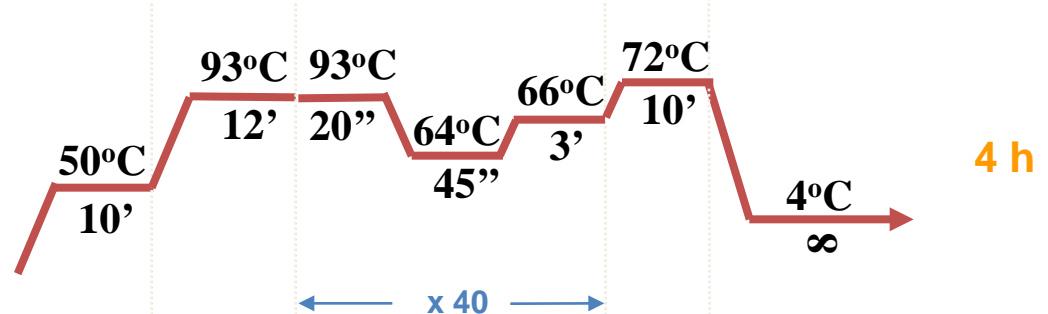
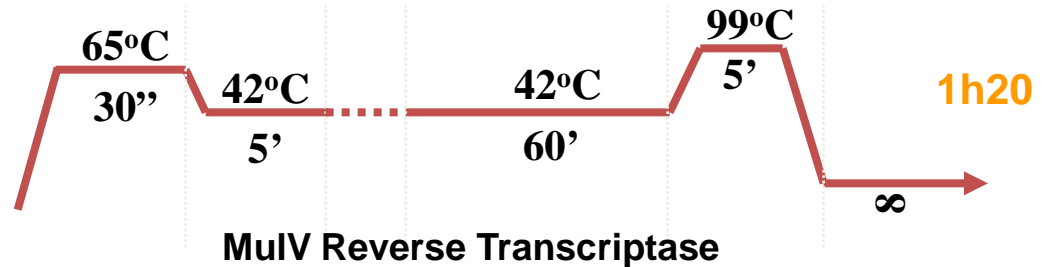
- Module de Préparation de l'échantillon
- Module de RT-PCR
- Module de Séquençage
- Module de Contrôle ARN
- Tubes réactionnels MicroAmp
- Colonnes de purification Microcon
- Logiciel ViroSeq™ HIV-1



Méthodologie



Lyse et Extraction par précipitations :
Guanidine Thiocyanate – Isopropanol - Ethanol



Méthodologie

Produit de PCR

PURIFICATION

Matrice de Séquençage

REACTION DE SEQUENCE

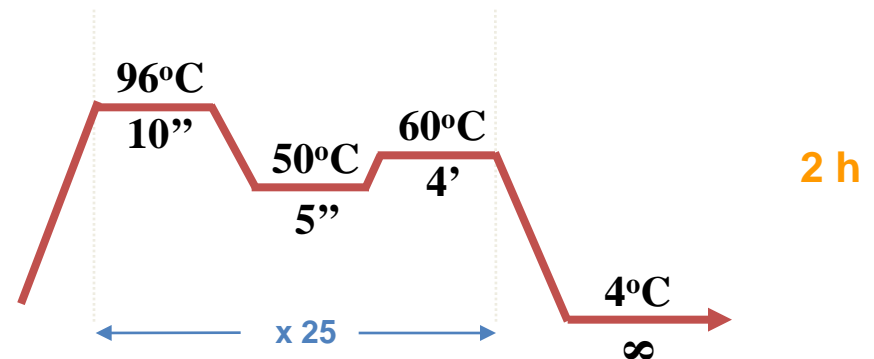
Produit de Séquence

PURIFICATION

Séquence prête à être analysée



Utilisation de colonnes YM 100
Microconcentrators[®]



Purification Ethanol/Acetate de sodium ou autre :
Sephadex G50 ; colonnes, etc...

Migration des Séquence sur ABI 3130



Technologie d'électrophorèse capillaire

Injection électrocinétique des fragments d'ADN marqués et détection par une cellule équipée d'une caméra CCD

Software

View*Edit: Projects:Completed

Revert

Trim

Navigation Options

Auto jump on edits

Reverse jump

113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131

D A Y F S V P L D E D F R K Y T A F T

D A Y F S V P L D KE E F R K Y T A F T

GATGCATATTTTTCAGTTCCCTTAGATGAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTTACC

GATGCATATTTTTCAGTTCCCTTAGATGAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTTACC

g. DJI *****_B01_03.at

g. DJI *****_E01_09.at

Edited, Novel variant

Close View*Edit

Comparaison
consensus/référence
(HXB-2)

Edition des positions
d'intérêt

Accès à toutes les
positions
nucléotidiques

Auto-jump

Rapport

Patient ID	5461	Testing Laboratory	
Patient Name Last		Lab Director	
Patient Name First MI		Department ID	
Accession Number	----	Mailstop	
Patient Gender	Not Available	Street Address1	
Patient Birthdate & Age		Street Address2	
Report Generated By	admin	City	
Report Date & Time	CEST , 07:24:57 ,2009 24	State/Province	
Ordering Physician	----	Postal Code	
Institution	----	Country	
Date Drawn	----	Telephone/Fax	
Assay Operator	----	E-mail	
Field1	----	Web Site	
Field2	----		

Drug Class	Drug	Evidence of Resistance
NRTI	EPIVIR® (lamivudine, 3TC)	Resistance*
	EMTRIVA® (emtricitabine, FTC)	Resistance*
	RETROVIR® (zidovudine, AZT)	Resistance*
	VIDEX® (didanosine, ddl)	Possible Resistance*
	ZERIT® (stavudine, d4T)	Resistance*
	ZIAGEN® (abacavir, ABC)	Resistance*
	VIREAD® (tenofovir, TDF)	Possible Resistance*
NNRTI	RESCRIPTOR® (delavirdine, DLV)	None
	SUSTIVA® (efavirenz, EFV)	None
	VIRAMUNE® (nevirapine, NVP)	None
	INTELENCE™ (etravirine, ETR)	None
PI ⁺	AGENERASE® (amprenavir, APV)	Resistance*
	LEXIVA® (fosamprenavir, FOS)	Resistance*
	CRIXIVAN® (indinavir, IDV)	Resistance*
	FORTOVASE® / INVIRASE® (saquinavir, SQV)	Resistance*
	KALETRA® (lopinavir + ritonavir, LPV)	Resistance*
	PREZISTA® (darunavir, DRV)	Possible Resistance
	VIRACEPT® (nelfinavir, NFV)	Resistance*
	REYATAZ® (atazanavir, ATV)	Resistance*
	APTIVUS® (tipranavir, TPV)	Resistance*

- **Les mécanismes et la cinétique d'acquisition des mutations de résistance diffèrent selon la classe des antirétroviraux.**
- **La prévention de la sélection de mutants résistants nécessite de maintenir une charge virale sous traitement en dessous du seuil de détection.**
- **L'adhérence du patient au traitement est le facteur le plus important pour prévenir l'émergence de la résistance du VIH**

- **Les tests de résistance sont un élément important pour l'aide à la décision thérapeutique.**
- **Les tests de résistance offrent des informations utiles quant à la sélection des antirétroviraux de deuxième intention**
- **Le choix des ARV dans un traitement de relais nécessite une concertation multidisciplinaire associant cliniciens, virologues et pharmacologues.**

Merci Pour Votre Attention



LES MOLÉCULES ANTIRÉTROVIRALES

<u>Generic Name</u>	<u>Abbreviation</u>	<u>Trade Name(s)</u>
<u>Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs)*</u>		
Abacavir	ABC	Ziagen
Didanosine	ddI	Videx
Emtricitabine	FTC	Emtriva
Lamivudine	3TC	Epivir
Stavudine	d4T	Zerit
Tenofovir	TDF	Viread
Zidovudine	AZT, ZDV	Retrovir
<u>Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs)</u>		
Delavirdine	DLV	Rescriptor
Efavirenz	EFV	Sustiva/Stocrin
Nevirapine	NVP	Viramune
Etravirine	ETV (TMC-125)	Intelence
<u>Protease Inhibitors (PIs)</u>		
Atazanavir	ATV	Reyataz
Darunavir	DRV (TMC114)	Prezista
Fos-amprenavir	Fos APV, or FPV	Lexiva
Indinavir	IDV	Crixivan
Lopinavir/ritonavir	LPV/r	Kaletra/Aluvia
Nelfinavir	NFV	Viracept
Ritonavir	RTV or r	Norvir
Saquinavir	SQV	Invirase
Tipranavir	TPV	Aptivus
<u>Entry Inhibitors</u>		
Enfuvirtide	T-20	Fuzeon
Maraviroc	MVC	Selzentry
<u>Integrase Inhibitors (IIs)</u>		
Raltegravir	RAL	Isentress