

Les inhibiteurs de protéase mode d'action, résistances

François Clavel

Département des rétrovirus, Institut Pasteur (Paris)

Il ne fait aucun doute aujourd'hui que les inhibiteurs de protéase vont tenir une place de tout premier plan dans l'arsenal thérapeutique de l'infection par le VIH. Ce n'est pourtant qu'assez récemment que la construction de ces inhibiteurs a pu être entreprise.

La protéase, dont on savait qu'elle est indispensable à la réplication du virus, a été la première des protéines du VIH dont la structure moléculaire a pu être déduite d'études cristallographiques, ce qui tient à la fois à sa petite taille et à ses caractéristiques biochimiques favorables. Une fois connue la structure exacte du site actif de la protéase, on a construit pièce par pièce, suivant les techniques du modelage moléculaire, des molécules relativement complexes «moulées» sur ce site. Ces molécules ont alors la propriété d'aller occuper le site actif de la protéase avec une haute affinité et donc de bloquer l'activité de l'enzyme à des concentrations remarquablement basses. Il ne faut pas oublier non plus que le développement rapide des inhibiteurs de protéase VIH doit beaucoup à une recherche relativement ancienne sur l'inhibition de protéases comme la rénine ou la trypsine, impliquées dans d'autres désordres pathologiques.

Rôle de la protéase rétrovirale dans l'infectivité virale

La protéase d'un rétrovirus est absolument nécessaire à l'assemblage de particules virales infectieuses.

Schématiquement, l'assemblage de ces particules se produit en deux temps : dans un premier temps, les éléments de la particule sont assemblés sous la forme de précurseurs polyprotéiques associés à la surface de la cellule qui produit le virus, ce qui conduit au bourgeonnement et à la libération d'une particule que l'on qualifie alors d'immature. Dans un deuxième temps, après la libération de la particule, les protéines virales internes sont découpées par la protéase puis réassemblées pour former le nucléoïde ou «core» de la particule, qui comporte tous les éléments moteurs de la réplication virale : capsid, nucléocapsid, transcriptase inverse et intégrase, disposés de manière très précise par rapport à l'ARN viral. En microscopie électronique, la morphologie des particules immatures est très caractéristique : le matériau dense aux électrons reste assemblé en anneau sous la membrane du virus, tandis que, dans les particules matures et infectieuses, il se condense au centre de la particule, formant le nucléoïde conique typique du VIH. L'assemblage en deux temps des particules virales est comparable à l'assemblage d'une maquette : les pièces de celle-ci, livrées dans un kit où elles sont attachées bout à bout, doivent être découpées avant d'être réassemblées. Ici le découpage est effectué par la protéase, puis l'assemblage se produit spontanément, car chacune des protéines découpées porte un signal d'assemblage spécifique. L'ordre du découpage est important : certaines pièces de la maquette doivent être libérées avant d'autres, faute de quoi l'assemblage serait faussé et les particules non infectieuses. On sait en effet que des défauts relativement minimes dans l'assemblage peuvent conduire à une incapacité répliquative totale de la particule. Cette particularité pourrait expliquer en grande partie l'efficacité antivirale remarquable des inhibiteurs de protéase : même si l'inhibition du découpage et du réassemblage des protéines virales par la protéase est incomplète, l'infectivité de la particule virale peut être totalement abolie.

Rôle des inhibiteurs de protéase dans le

blocage de l'infection virale

Contrairement aux inhibiteurs de la transcriptase inverse qui agissent dans les cellules dès le début de l'infection, les inhibiteurs de protéase ne peuvent agir que sur des cellules déjà productivement infectées, dans lesquelles ils vont bloquer la maturation et l'infectivité des particules. Mais par là même, ils vont enrayer la propagation de l'infection vers d'autres cellules. Comme les cellules productrices de virus n'ont qu'une durée de vie très courte, cela se traduira secondairement par une baisse de la production de virus dans l'organisme, visible sous la forme d'une forte baisse de la virémie plasmatique. C'est d'ailleurs avec des inhibiteurs de protéase qu'ont pu être affinées les données cinétiques et dynamiques de l'infection *in vivo*, tout simplement parce que leur activité antivirale étant plus prononcée que celle des inhibiteurs de la transcriptase inverse, il a été possible de dégager plus facilement les paramètres propres des courbes de décroissance de la virémie à la suite de l'établissement du traitement chez des patients à virémie élevée. On a entendu dire ici et là que seuls les inhibiteurs de protéase seraient capables de bloquer la propagation du virus par contact direct entre cellules infectées et cellules infectables (ce qui est presque certainement le seul moyen de propagation de l'infection *in vivo*), tandis que les inhibiteurs de la transcriptase inverse en seraient incapables. Il n'en est rien : la transmission de l'infection d'une cellule à une autre passe toujours par la constitution d'une particule virale mature, qui doit contenir intact l'ensemble de la machinerie de réplication. La mise en place de la machinerie dépend de la protéase, et son fonctionnement dépend de la transcriptase inverse. Les deux types d'inhibiteurs sont donc égaux en ce qui concerne l'importance de leurs cibles respectives vis-à-vis de la réplication virale. C'est par les conséquences virologiques de leur action (on peut bloquer totalement l'infectivité d'une particule virale en n'inhibant que partiellement l'activité de la protéase) que les inhibiteurs de protéase présenteraient un avantage par rapport aux inhibiteurs de la transcriptase inverse, qu'ils soient nucléosidiques ou non nucléosidiques. Mais cette activité antivirale propre n'est peut-être pas le seul avantage des inhibiteurs de protéase : il semble en effet que leur efficacité à moyen terme puisse également tenir aux paramètres virologiques très particuliers de la résistance du VIH à ces inhibiteurs.

Les phénomènes de résistance : les mutations

L'émergence de variants viraux résistants peut survenir, in vivo comme in vitro, avec tous les inhibiteurs de protéase testés jusqu'ici. Les différentes mutations qui caractérisent ces variants résistants sont maintenant bien connues. Elles s'accumulent de façon graduelle avec le temps de sélection, donnant lieu à des niveaux croissants de résistance. Ainsi, la résistance au ritonavir (Norvir, Abbott) semble presque toujours débiter par une mutation en position 82 de la protéase. Plus tard, d'autres mutations viennent s'y ajouter, concernant essentiellement les résidus 20, 36, 46, 54, 71, 84 et 90. Pour le saquinavir (Invirase, Roche), le schéma est encore plus simple : une mutation en position 90 est presque toujours la première à apparaître, suivie un peu plus tard par une mutation en position 48. En ce qui concerne l'indinavir (Crixivan, Merck), on retrouve beaucoup des mutations de résistance caractéristiques du ritonavir, mais leur ordre d'introduction n'est pas encore bien établi.

Les résistances croisées

L'observation que les mêmes mutations peuvent participer à l'acquisition de la résistance à des inhibiteurs de protéase différents, a bien entendu, fait craindre qu'un fort niveau de résistance croisée rende illusoire l'utilisation d'inhibiteurs de protéase différents, en combinaison ou en relais. La question des résistances croisées n'est pas encore tout à fait résolue. Très schématiquement, on pourrait séparer trois groupes de résistances croisées parmi les inhibiteurs de protéase testés in vivo.

- Le premier groupe serait constitué du ritonavir, de l'indinavir et vraisemblablement du nelfinavir (Viracept, Agouron). Pour ces inhibiteurs, la résistance met en jeu la même série de mutations, dans des combinaisons qui diffèrent toutefois légèrement d'un inhibiteur à l'autre.
- S'en distingue nettement la résistance au saquinavir, qui fait intervenir des mutations concernant principalement les résidus 90 et 48. Cette dernière n'est pas retrouvée chez les virus résistants aux autres

- inhibiteurs, tandis que la mutation 90 y est rare.
- Un troisième groupe pourrait être constitué par le VX 478 (Vertex) qui, même s'il fait entrer en jeu certains résidus retrouvés dans le premier groupe, en comporte deux (47 et 50) qui semblent lui être propres.

Les virologues d'Abbott ont récemment exploré la résistance croisée à différents inhibiteurs de protéase sur une série d'isolats viraux obtenus au décours de l'échappement thérapeutique au ritonavir. Ces virus portent plusieurs combinaisons de mutations de résistance impliquant les résidus 82, 71, 54, 36 et 20 de la protéase. Le niveau de résistance de ces virus au ritonavir est en moyenne 20 fois supérieur à celui des virus isolés des mêmes patients avant le traitement. Leur résistance est augmentée de 4 à 8 fois vis-à-vis de l'indinavir, de 2 à 4 fois vis-à-vis du VX-478, et rarement plus de 2 fois vis-à-vis du saquinavir.

En réalité, la séparation en groupes de résistance est un peu artificielle. Le niveau de résistance à l'indinavir retrouvé chez un variant sélectionné pour la résistance au ritonavir est inférieur à la résistance au ritonavir lui-même. Mais, compte tenu du peu de différences qui existent dans les combinaisons de mutations de résistance à ces deux inhibiteurs, on estime qu'il suffira de très peu d'adaptation pour que ce virus puisse acquérir un niveau élevé de résistance à l'indinavir, si on substitue ce dernier au ritonavir à la suite d'un échec thérapeutique.

La situation est peut-être un peu plus compliquée en ce qui concerne la résistance croisée entre le saquinavir et les autres inhibiteurs de protéase. Les virus sélectionnés *in vitro* pour la résistance au saquinavir ne présentent qu'un niveau de résistance très modeste aux deux autres inhibiteurs (ritonavir et indinavir), tandis que les isolats cliniques provenant de patients traités au saquinavir, porteurs d'une ou plusieurs mutations de résistance, présentent le plus souvent un niveau accru de résistance à l'indinavir et au ritonavir. Mais, pour ces virus, on ignore si les mutations de résistance au saquinavir vont faciliter ou gêner l'acquisition ultérieure d'une pleine résistance au ritonavir ou à l'indinavir lorsque l'infection sera soumise à un traitement par l'un de ces composés.

Dans ce contexte, peut-on espérer retrouver entre groupes de

résistance aux inhibiteurs de protéase des antagonismes tels que ceux décrits entre mutations de résistance à l'AZT et au 3TC ? Ces études sont, bien évidemment, en cours, mais il est trop tôt pour répondre à la question.

Importance de la réplication virale dans l'apparition des résistances

Un seul paramètre semble aujourd'hui capable de contrôler l'émergence de variants résistants : la réplication virale. Son influence pourrait être particulièrement grande dans la résistance aux inhibiteurs de protéase. On a coutume de dire que les variants résistants à un antiviral préexistent à l'établissement du traitement, et que, quelle que soit l'importance de l'effet antiviral exercé sur la majorité des virus sensibles d'une population virale, la très faible fraction de virus résistants trouvera en quelques semaines son chemin et viendra recoloniser l'organisme infecté. Les mutations de résistance ne sont pas directement provoquées par l'inhibiteur : celui-ci se contente d'établir une sélection au sein d'une population virale hétérogène.

Mais ce schéma simplifié ne semble s'appliquer qu'aux antiviraux vis-à-vis desquels une seule mutation peut suffire à induire une résistance complète, ce qui est le cas, par exemple, du 3TC et de la névirapine. En ce qui concerne les inhibiteurs de protéase, on sait que les premières mutations introduites ne sont que faiblement actives en termes de résistance. Il en faut deux, trois, voire quatre pour induire un niveau significatif de résistance. Même si quelques rares mutants porteurs d'une ou deux mutations de résistance peuvent exister avant l'application d'un traitement par un inhibiteur de protéase, et qu'effectivement ces virus peuvent constituer la base d'une sélection plus poussée, il est douteux que ce soit aussi le cas de mutants pleinement résistants, porteurs de combinaisons de trois ou quatre mutations. Seule la réplication du virus au cours du traitement, entretenant la variation des populations virales au fil des cycles successifs de rétrotranscription, est capable d'ajouter les mutations de résistance les unes aux autres. Toute réplication virale résiduelle est donc génératrice de virus résistants. Il faut limiter au maximum cette réplication résiduelle, aussitôt qu'est appliqué le traitement. Ce postulat est vérifié dans les observations cliniques, où il apparaît nettement que le

renforcement de l'action antivirale d'un inhibiteur de protéase s'accompagne presque toujours d'un allongement proportionnel du délai d'émergence des virus résistants. C'est tout l'intérêt des combinaisons triples d'antirétroviraux : en réduisant presque complètement la réplication virale, elles bloquent l'apparition de virus résistants. Il est clair, dès lors, que les inhibiteurs de protéase ne doivent être employés que dans le cadre de ces combinaisons, faute de quoi la résistance est inévitable. Il est clair aussi que tout fléchissement thérapeutique au cours d'un tel traitement fait courir le risque de relancer la réplication virale, même à bas bruit, et de laisser leur chance à des virus partiellement résistants, susceptibles ensuite d'acquérir un niveau de résistance plus élevé. Théoriquement, donc, la prévention de la résistance impose le maintien de l'action antivirale maximale aussi longtemps que l'infection n'aura pas été éradiquée. Cette question, au même titre que celle de la date du début du traitement dans l'histoire de l'infection, est au centre de la réflexion de tous ceux cherchant à établir les meilleurs régimes thérapeutiques de l'infection par le VIH.

Rôle des mutations de résistance sur la capacité répliquative virale

Un autre paramètre virologique de la résistance aux inhibiteurs de protéase pourrait revêtir une importance toute particulière : l'impact des mutations de résistance sur la capacité répliquative du VIH. Certaines mutations de résistance aux inhibiteurs de protéase ralentissent nettement la réplication virale en réduisant l'activité de la protéase. Ces mutations doivent être associées à des mutations secondaires, qui, à défaut de jouer un rôle direct dans la résistance, viennent compenser l'effet négatif des premières. On a même récemment observé, sur des virus résistants sélectionnés en culture, des mutations compensatrices en dehors de la protéase, situées dans la protéine virale gag qui est l'une des cibles de la protéase. Malgré ces possibilités de compensation entre mutations, il apparaît que certains isolats viraux résistants ont une réplication beaucoup plus lente en culture que les isolats préthérapeutiques correspondants.

Cette notion de ralentissement de la réplication comme prix de la résistance est importante car elle montre que la tolérance du virus aux mutations de résistance dans la protéase n'est

probablement pas infinie. En l'absence de traitement, la fonction des protéines cibles des antirétroviraux n'étant pas mise en échec par l'hôte, la seule pression de sélection qui s'exerce sur ces gènes est déterminée par la capacité répliquative du virus. Cette sélection conduit donc à une adaptation optimale des protéines enzymatiques virales à leur substrat, ainsi qu'à une grande conservation de leurs motifs essentiels. Si les mutations de résistance constituent bien évidemment un avantage décisif pour le virus qui en est porteur pour sa réplication en présence de l'inhibiteur, elles constituent un désavantage répliquatif plus ou moins prononcé lorsque le virus est propagé en son absence. Il est donc normal que les modifications de la structure du site actif de la protéase se traduisent par une réduction du pouvoir répliquatif viral. Chaque mutation ou combinaison de mutation doit alors être vue comme un compromis entre résistance et réplication. C'est la vieille histoire du canon et de la cuirasse. Comme les navires de guerre ou les chevaliers du Moyen-Age, le virus doit payer du poids de son armure sa course à l'invulnérabilité.

Conclusions

Chez un patient traité, le virus ne se réplique pas en présence d'une concentration unique d'inhibiteur comme c'est le cas en culture. Il est continuellement confronté à des gradients d'inhibiteur, qui varient en fonction du temps et du compartiment de l'organisme où s'effectue la réplication. Le virus doit alors s'adapter à ces conditions variables, où va s'exprimer différemment l'impact des mutations en termes de réplication ou de résistance. En final, peut-on dès lors imaginer que l'on puisse forcer la sélection de virus atténués en maintenant un traitement en dépit de la résistance ? Jusqu'où le virus peut-il réellement s'adapter aux changements que lui impose cette résistance ? Ces questions, encore bien théoriques, n'ont reçu pour l'instant aucune réponse claire. Il en est de même d'une autre question, corollaire des précédentes : jusqu'où les mutations de résistance persistent-elles à l'arrêt d'un traitement par un inhibiteur de protéase ? Si de telles mutations sont véritablement désavantageuses pour la réplication du virus, elles devraient s'effacer dès que la pression de sélection est interrompue. Il paraît évident que la stabilité d'une mutation devrait être en rapport inverse avec son effet négatif sur la

réplication virale. Ainsi, les mutations qui affectent le plus radicalement la réplication virale, donc les plus labiles, pourraient autoriser l'utilisation des antiviraux correspondants par cures successives, puisque la disparition rapide de la mutation reconstituerait une population virale sensible. A l'inverse, les mutations les plus stables (comme cela semble être le cas pour la résistance à l'AZT) présenteraient à long terme un risque réel de propagation de virus résistants dans une population non traitée. La propagation de ces mutations stables poserait alors un véritable problème épidémiologique.