

La modulation de la signature transcriptomique de l'hôte infecté : une nouvelle stratégie thérapeutique dans les viroses graves ? Exemple de la grippe

Modulation of Transcriptomic Signature of the Infected Host: a New Therapeutic Strategy for the Management of Severe Viral Infections? Example of the Flu

J. Poissy · O. Terrier · B. Lina · J. Textoris · M. Rosa-Calatrava

Reçu le 4 janvier 2016 ; accepté le 8 mars 2016
© SRLF et Lavoisier SAS 2016

Résumé Ces dernières décennies ont été marquées par l'émergence ou la réémergence de virus responsables d'épidémies ou de pandémies plus ou moins sévères. Les stratégies préventives sont prises à défaut, et l'arsenal antiviral curatif est limité d'autant plus que les résistances virales peuvent

apparaître rapidement. Par ailleurs, le développement de nouvelles molécules nécessite un délai incompatible avec la réponse rapide nécessaire lors d'une épidémie d'envergure ou d'une pandémie. C'est la raison pour laquelle de nouvelles approches thérapeutiques sont nécessaires. Un concept novateur est le repositionnement de molécules déjà sur le marché en exploitant leur capacité à inverser la réponse transcriptomique cellulaire de l'hôte infecté. En identifiant des molécules qui visent l'hôte et non le virus, cette stratégie permet d'avoir un large spectre d'action et d'être potentiellement actif sur de nouveaux variants. La mise en place de cette stratégie nécessite de caractériser les réponses cellulaires spécifiques de l'infection virale d'intérêt, de cribler *in silico* des molécules candidates, de les tester sur modèles cellulaires et animaux, avant d'envisager des essais cliniques chez l'homme. Nous présenterons cette démarche en prenant pour exemple l'infection grippale.

J. Poissy (✉)

Université de médecine de Lille, F-59000 Lille, France
e-mail : julien_poissy@hotmail.fr

Pôle de réanimation, hôpital Salengro-CHRU de Lille,
rue Emile-Laine, F-59037 Lille cedex, France

O. Terrier · B. Lina · M. Rosa-Calatrava
Laboratoire de virologie et pathologie humaine VirPath,
université Claude-Bernard-Lyon-I (UCBL1),
hospices civils de Lyon (HCL), International Center for
Infectiology Research, Inserm (CIRI), U1111, CNRS,
UMR5308, École normale supérieure de Lyon,
faculté de médecine RTH Laennec, rue Guillaume-Paradin,
F-69372 Lyon cedex 08, France

B. Lina

Centre national de référence des virus influenza, CBPE,
hospices civils de Lyon et Virpath,
université Claude-Bernard-Lyon,
F-69622 Villeurbanne cedex, France

J. Textoris

Service d'anesthésie et de réanimation, hospices civils de Lyon,
hôpital Édouard-Herriot, 5, place d'Arsonval,
F-69437 Lyon cedex 03, France

Pathophysiology of Injury-Induced Immunosuppression (PI3),
EA mixte hospices civils de Lyon, bioMérieux,
université Claude-Bernard-Lyon-I (UCBL1),
hôpital Édouard-Herriot, 5, place d'Arsonval,
F-69437 Lyon cedex 03, France

J. Textoris et M. Rosa-Calatrava sont "equally contributing authors" sur cet article.

Mots clés Viroses · Grippe · Transcriptome ·
Repositionnement de médicaments

Abstract During the last decades, emergence and re-emergence of viruses were responsible for epidemic and pandemic infectious diseases, with variable degrees of severity. Current preventive strategies are not sufficient at all, and available therapeutic drugs are very limited. Indeed, genetic variations of viruses can impair the efficacy of antiviral compounds by the apparition of resistance. Moreover, current delay needed for de novo development of drugs does not allow a rapid response in case of important epidemic or pandemic events. In this context, new therapeutic approaches are necessary. An innovative concept is to repurpose already marketed compounds that can reverse the host cellular transcriptomic response to the infection. By targeting the host, these molecules exhibit a broad-spectrum activity and are potentially effective even against new emergent strains. This

strategy implements the characterization of specific host gene expression profiles, the in silico screening of drugs, and their validation in in vitro and in vivo models, until their evaluation in clinical trials. Here, we will present this approach, with the example of the flu.

Keywords Viral infections · Flu · Transcriptome · Drug repurposing

Introduction

Les virus ont une place prépondérante en pathologie humaine. En effet, environ 15 % des 1 400 pathogènes humains sont des virus, et 40 % de ces virus sont émergents ou réémergents [1]. L'émergence est définie par l'apparition d'une maladie liée à un agent infectieux jusque-là inconnu ou dont l'imputabilité dans la maladie n'avait pas encore été mise en évidence, ou d'un nouveau variant d'un agent connu. La réémergence est définie par la réapparition de maladie(s) qui avai(en)t disparu ou l'augmentation de son (leur) incidence. Depuis les années 1980 et à raison de deux par an en moyenne, 87 virus ont été responsables de pathologies émergentes de gravité variable [2]. Les projections prévoient l'émergence d'une quarantaine de nouveaux virus dans les dix ans qui viennent [3]. Ces virus sont principalement des virus à ARN à tropisme respiratoire et dont le réservoir est animal [2]. Les points d'orgue de ces infections virales ont été l'épidémie de SRAS en 2003 [4], l'apparition de la souche H1N1pdm09 en 2009 et le MERS coronavirus en 2012 [5], du fait de leur propagation à l'échelle mondiale, de leur mortalité importante, et atteignant spécifiquement des populations inattendues. De manière plus dramatique, l'épidémie récente d'Ebola souligne davantage la nécessité d'avoir à disposition des molécules à action antivirale et de pouvoir les utiliser rapidement. En effet, en dehors de l'infection par le VIH et des hépatites virales B et C, l'utilisation d'antiviraux reste très limitée et se heurte à la problématique générale des résistances.

Une des approches possibles pour le développement de nouveaux antiviraux à plus large spectre d'action est de cibler non pas le virus, mais la cellule de l'hôte infecté, en utilisant la signature transcriptomique cellulaire de l'infection pour sélectionner et repositionner des molécules déjà sur le marché qui vont moduler ce profil transcriptomique, supposé comme étant favorable à l'infection. Alors que cette approche est aujourd'hui développée en cancérologie, elle est d'utilisation très récente en infectiologie. Nous proposons ici de présenter les concepts sur lesquels elle repose, en illustrant notre propos par les travaux que nous avons menés, essentiellement sur les virus influenza.

Épidémiologie et enjeux des viroses respiratoires et de la grippe

Les infections respiratoires aiguës (IRA) représentent une des principales causes de consultations, d'hospitalisations et de décès dans le monde, étant notamment la première cause de mortalité chez les jeunes enfants avec près de deux millions de décès par an. Chaque année, le coût de leur prise en charge est estimé entre 1,5 et 2 milliards d'euros [6]. Les progrès en termes de diagnostic ont permis de montrer qu'une large part de ces infections est due à des virus. Ainsi, dans une étude épidémiologique récente sur les pneumonies communautaires aux États-Unis nécessitant une hospitalisation des patients, les virus représentaient deux tiers des pathogènes identifiés. Les virus influenza de type A représentaient la deuxième étiologie, après les rhinovirus [7]. Par ailleurs, ces virus pathogènes respiratoires sont un facteur prédisposant des pneumonies bactériennes chez l'adulte [8].

Les virus influenza, responsables de la grippe, occupent donc une place prépondérante parmi les agents pathogènes responsables des IRA. Ces virus enveloppés à génome ARN segmenté font partie de la famille des Orthomyxoviridae et sont divisés en trois types distincts, A, B et C, sur la base de leurs différences majeures antigéniques, leur organisation génomique, leur spécificité d'hôte et leur épidémiologie [9]. Les virus influenza A et B sont les responsables de la grippe saisonnière. À leur surface se trouvent deux glycoprotéines, l'hémagglutinine (HA) qui se fixe aux récepteurs sialylés cellulaires et la neuraminidase (NA) qui permet la libération des nouveaux virions. Il existe différents sous-types de virus influenza A selon la nature de ces glycoprotéines [9]. Chez l'homme, les virus circulant depuis plusieurs décennies sont les sous-types H1N1 et H3N2. Des transmissions interspèces occasionnelles, notamment de l'animal à l'homme, sont aussi décrites pour les virus aviaires de type H5, H7 ou H9 [10]. Ces transmissions interspèces à l'origine de pandémie résultent notamment de cassures antigéniques qui correspondent à des échanges de matériels génétiques entre sous-types viraux, conduisant à l'apparition de virus dotés de nouveaux antigènes HA et NA, vis-à-vis desquels la population humaine est immunologiquement naïve. Ce phénomène fut à l'origine de l'émergence en 2009 d'un nouveau virus grippal pandémique H1N1, d'origine porcine, aviaire et humaine [11], ou encore des épidémies de H5N1 aviaires hautement pathogènes depuis 2003 en Asie, ou des épisodes de grippe H7N7 aux Pays-Bas en 2003 et H7N9 dans le Sud-Est asiatique en 2013. Les épidémies de grippe saisonnière sont le résultat d'une dérive génétique permanente des virus influenza A et B (apparition de mutations spontanées, notamment dans les gènes qui codent pour les glycoprotéines de surface) [11] et constituent une cause majeure de morbidité et de mortalité accrue, notamment chez les individus très

jeunes, les personnes âgées, les individus immunodéprimés et ceux souffrant de maladies cardiopulmonaires chroniques.

La grippe est une infection virale saisonnière qui touche chaque hiver d'un à huit millions de personnes en France, ayant un impact important non seulement en termes de santé publique, mais également d'un point de vue économique, en occasionnant un absentéisme (deux à quatre millions de journées) et une perte de productivité importants. L'incidence des virus influenza dans la population est estimée de 5 à 10 % chez les adultes et de 20 à 30 % chez les enfants. Leur taux de mortalité globale varie de 0,1 à 1 % selon le type de souches circulantes et la couverture vaccinale annuelle. En France, la grippe est responsable en saison hivernale de 500 à 900 consultations par semaine, avec un pic de 50 à 100 nouveaux cas graves par semaine [12]. Les admissions en réanimation pour détresse respiratoire associée à une infection par influenza de type A sont estimées à 12/100 000 personnes.an chez l'adulte [13]. Outre les personnes âgées avec des comorbidités, les jeunes enfants et les femmes enceintes sont des populations particulièrement à risque. Streng et al. ont ainsi récemment rapporté dans une cohorte de cas de grippe grave hospitalisés en réanimation pédiatrique 11 % de séquelles pulmonaires et 11 % de décès [14]. Par ailleurs, dans une série épidémiologique américaine ayant analysé 915 décès survenus durant la saison hivernale 2009–2010 au cours d'une grossesse, il a été démontré que l'infection par influenza de type A était la cause certaine du décès dans 8,2 % des cas et suspectée dans 3,7 % [15].

Limites de la vaccination et des traitements antiviraux

La vaccination constitue la mesure préventive la plus efficace contre la grippe. Cependant, le délai incompressible de six à neuf mois entre le choix par l'OMS des sous-types entrant dans la composition vaccinale et la délivrance des lots de vaccins ainsi que le manque d'adhésion de plus en plus important de la population, y compris chez les personnels de santé (en France, 53 % des personnes à risque n'étaient pas vaccinées en 2014) limitent grandement son efficacité [16,17]. Cela n'est pas sans conséquence à l'échelle de la population, puisqu'un faible taux de couverture vaccinale est associé à un risque augmenté d'admission en réanimation et de ventilation mécanique [18]. L'émergence de nouveaux variants viraux par dérive antigénique (comme observé en 2015 pour la souche H3N2) limite également les bénéfices de la vaccination annuelle et expose à une incidence plus élevée de cas graves [19,20]. En complément de la vaccination, la prévention et/ou le traitement des infections par le virus influenza reposent sur des mesures symptomatiques et le recours à des antiviraux. Deux classes d'antiviraux sont utilisées en clinique : les amantadates, inhibiteurs du canal ionique viral M2 et les inhibiteurs de neuraminidase [21].

L'inhibition de M2 contrecarre l'entrée cellulaire des virus et la libération de leur génome. Le bénéfice de leur utilisation dans les pathologies sévères reste à confirmer, et leur utilisation est très limitée du fait de l'émergence de résistance chez les patients traités, notamment des virus H3N2 qui malgré ces mutations gardent toutes leurs propriétés de virulence et de transmissibilité [22–24]. Les inhibiteurs de neuraminidase comme le zanamivir (administration intranasale) et l'oseltamivir (administration orale) interfèrent dans la libération des virions des cellules infectées et dans la capacité des virus influenza à entrer dans les cellules cibles et à se disséminer via les sécrétions respiratoires. S'ils sont administrés assez tôt, ces antiviraux réduisent la durée de l'infection, les titres viraux et l'incidence des complications respiratoires bactériennes nécessitant un traitement antibiotique [25–29]. De plus, même si l'oseltamivir est administré plus de 48 heures après le début des symptômes, la mortalité peut être réduite chez les patients âgés [30]. L'oseltamivir est la molécule la plus adaptée au traitement des patients de réanimation. Pourtant, il existe peu de données sur son efficacité et sa tolérance chez les patients hospitalisés en réanimation pour grippe grave. Sur la base de données expérimentales, le CDC recommande d'utiliser de fortes posologies (dose et durée de traitement doublées), ce qui est pour le moment le schéma majoritairement adopté pour les formes graves. Des travaux récents, rétrospectifs pour la plupart, suggèrent qu'une dose normale de 75 mg deux fois par jour pendant cinq jours pourrait être suffisante, avec un ajustement à la fonction rénale [31]. Au final, le schéma d'administration, la dose journalière et la durée de traitement sont toujours discutés. Une autre limite du traitement antiviral avec ces molécules est l'émergence de résistances. Celles-ci ont été observées pour le zanamivir et l'oseltamivir, y compris chez des patients traités [32–34]. C'est notamment le cas des souches H1N1 responsables de l'épidémie de 2007–2008 [35] ou de la pandémie de 2009. Au Vietnam, 100 % des souches saisonnières A (H1N1) étaient résistantes à l'oseltamivir, mais seulement 1,4 % des souches A(H1N1)pmd09. Cette résistance n'était pas identifiée au sein des souches H5N1 ou H3N2 [36]. Bien que la majorité des souches restent sensibles, les souches résistantes à l'oseltamivir conservent leur virulence, leur capacité répliquative et leur potentiel de transmission interhumaine, avec plusieurs épidémies rapportées [37].

Ainsi, dans ce contexte de limitations et de contraintes importantes de la vaccination et de l'émergence récurrente de souches mutées et résistantes aux antiviraux usuels disponibles, avec la difficulté d'administration de ces antiviraux et les incertitudes sur les schémas posologiques dans le cas des infections graves, il apparaît nécessaire de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques, plus efficaces, mieux adaptées et en particulier déployables rapidement pour répondre à la problématique de l'émergence de nouveaux virus et des résistances.

Une stratégie innovante d'identification de nouveaux antiviraux ciblant la cellule infectée

Transcriptome

Le succès de telles stratégies repose en grande partie sur notre capacité à caractériser davantage la biologie cellulaire de ces virus respiratoires et leurs interactions moléculaires et fonctionnelles avec leur hôte. Ces dernières années, de nouvelles approches de biologie cellulaire de l'infection [38–42], et en particulier le développement de la biologie des systèmes, ont considérablement enrichi les connaissances concernant les interactions complexes et multiples entre ces virus et la « machinerie » cellulaire. Parmi elles, les études de la réponse transcriptomique de l'hôte ont permis de mettre en évidence les voies de signalisation sollicitées et/ou détournées lors de l'infection [43,44]. Le transcriptome correspond à l'ensemble des ARN transcrits à partir du génome cellulaire, codé par l'ADN [45]. Ces ARN transcrits sont composés d'ARN messager (ARNm), d'ARN de transfert, d'ARN ribosomal et d'ARN non codant [46]. Déterminer le transcriptome revient donc à « photographier » l'état d'expression du génome, à un moment donné. Il existe différentes techniques de biologie moléculaire permettant d'analyser le transcriptome cellulaire. Cette analyse peut être qualitative et comparative, mais aussi quantitative. Les techniques historiques (banques soustractives) sont maintenant remplacées par des techniques dites de puces à ADN (*microarrays*) ou de séquençage (RNAseq). Ces techniques permettent de déterminer en une seule expérience l'expression transcriptomique [47] et nécessitent l'utilisation d'outils informatiques adaptés. Dans les réactions inflammatoires, le profil de réponse transcriptomique est différent selon que la cause est infectieuse ou non. Dans les infections, il a été démontré, sur modèle animal, qu'il était possible d'établir des réponses spécifiques du micro-organisme responsable [48,49], faisant ainsi du transcriptome un éventuel outil diagnostique. Cette réponse transcriptomique a également été un succès en termes de médecine personnalisée dans le domaine de l'oncologie et de la prise en charge du cancer [50]. L'ensemble de ces données permet d'envisager la détermination d'une signature cellulaire spécifique d'une infection et d'imaginer moduler sa réponse.

Utilisation du transcriptome comme outil de développement de nouvelles approches thérapeutiques

Une des approches visant à minimiser les résistances aux antiviraux tout en permettant des activités antivirales à large spectre consiste à cibler les réponses cellulaires de l'hôte pour contrecarrer la réplication virale et/ou atténuer la pathogenèse associée [51]. Cette stratégie a déjà été utilisée

avec succès dans les thérapies antirétrovirales avec notamment le développement d'antagoniste de CCR5, corécepteur du VIH [52].

En ce qui concerne l'application de ce concept aux virus respiratoires, Cameron et al. ont par exemple montré par analyse transcriptomique que l'expression du gène CXCL10 était fortement induite dans les poumons de furets infectés par une souche hautement pathogène H5N1. Le traitement par un antagoniste de la voie de signalisation associée à CXCL10 a permis une réduction de la mortalité et de la sévérité des symptômes dans ce modèle animal [43]. Par ailleurs, plusieurs méthodes de criblage à haut débit (petits ARN interférents [siRNA], interaction protéine–protéine) ont été menées ces dernières années et ont identifié plusieurs centaines de facteurs cellulaires impliqués dans la réplication des virus influenza et/ou la pathogenèse associée à l'infection, proposant ainsi autant de cibles thérapeutiques potentielles [43,44].

Cependant, malgré des résultats prometteurs sur le plan expérimental, ce type d'approche focalisée sur une voie précise de signalisation cellulaire et un de ses effecteurs s'est pour l'instant toujours soldée par un échec lors de son application en clinique humaine [53,54], probablement du fait de la grande redondance des voies de signalisation de la cellule et de leurs interconnexions multiples.

Une preuve de concept : FLUMED

Fondée sur plusieurs études assez récentes suggérant que le mode d'action des médicaments est davantage dépendant de leur effet transcriptionnel sur la cellule hôte que de leur interaction directe avec leur(s) cible(s) cellulaire(s) [55,56], nous avons mis en place un programme de recherche translationnelle visant à exploiter la réponse transcriptomique de l'hôte infecté en considérant le profil d'expression des gènes cellulaires comme une empreinte globale de l'infection. Nous avons ainsi postulé que les signatures transcriptomiques cellulaires des virus influenza reflètent un état cellulaire globalement favorable à leur réplication, et nous avons émis l'hypothèse que des molécules associées à une signature cellulaire transcriptomique inverse pourraient induire un état cellulaire globalement défavorable à l'infection. L'ensemble de cette stratégie de repositionnement moléculaire est schématisé sur la Figure 1. Il faut préciser que dans cette approche nous ne cherchons pas à distinguer la signature cellulaire favorisant la réplication virale des éléments de la réponse antivirale eux aussi stimulés lors de l'infection, car nous avons choisi d'adopter une approche globale de la cellule en sachant que les voies de signalisation, biogenèse et métabolique cellulaires, sont ambivalentes (à la fois pro- et antivirales en fonction de l'étape, du cycle infectieux et de l'état cellulaire). Par exemple,

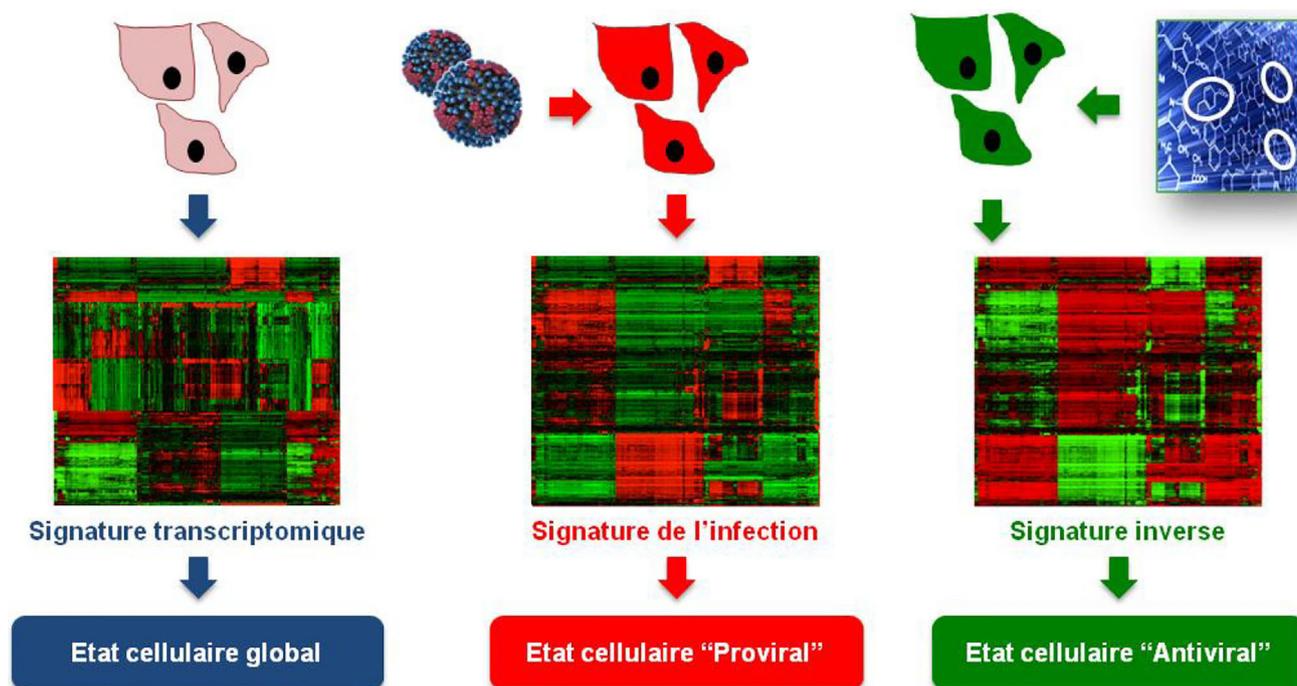


Fig. 1 Détermination des différentes signatures transcriptomiques ; a : sans infection virale ; b : en situation d'infection virale ; c : en présence de la molécule inversant la réponse transcriptomique. Les graphiques correspondent à l'état d'expression des gènes sondés par la présence d'ARNm. Les gènes surexprimés par rapport à l'état basal sont en rouge, les gènes sous-exprimés en vert

l'induction des voies apoptotiques par les virus influenza est à la fois provirale dans les étapes amont (le clivage de caspase est nécessaire au trafic nucléocytoplasmique des génomes viraux néosynthétisés) et antivirale dans les étapes d'aval (qui sont pour le coup inhibées par des facteurs viraux). C'est donc bien l'état cellulaire global auquel nous nous sommes intéressés. Nos premiers travaux ont permis de caractériser des signatures transcriptomiques *in vitro* spécifiques de l'infection par différents virus influenza humains et aviaires [57–59]. Il existe bien sûr des variations dans les signatures transcriptomiques entre les différents sous-types viraux, mais nous nous sommes focalisés sur les similarités, permettant ainsi de dégager un profil transcriptomique commun à tous les virus. Nous avons également développé une méthodologie d'analyse bio-informatique adaptée à un criblage informatique *in silico* permettant la sélection de molécules sur la base de leur signature cellulaire anticorrélée à celle de l'infection (Fig. 2). Cette analyse repose notamment sur l'exploitation de la base de données Connectivity Map [60] (Broad Institute, MIT) qui recense plus de 7 000 profils transcriptomiques obtenus après traitement de cellules par 1 309 molécules différentes, la plupart possédant une autorisation de mise sur le marché pour des indications thérapeutiques très diverses (oncologie, rhumatologie, etc.). Parmi les dix molécules que nous avons sélectionnées, la présence de la ribavirine, connue pour son activité anti-

virale [61], a ainsi constitué une première validation de notre stratégie de criblage non conventionnelle. De manière très intéressante, les neuf autres molécules identifiées dans le criblage n'étaient pas connues pour une indication thérapeutique anti-infectieuse supposée. À l'issue de leur évaluation dans différents tests *in vitro* cellulaires spécifiques, nous avons pu caractériser quatre de ces molécules pour leur propriété antivirale à large spectre contre plusieurs virus influenza humains et aviaires. Ces résultats d'efficacité constituaient ainsi une seconde validation de notre stratégie de criblage et de repositionnement de médicaments. Ces molécules ont fait l'objet de deux dépôts de brevet d'invention (FR n° 0958810- PCT/EP2010/069023-WO 2011069990, US n° 61/279 997) pour une seconde indication thérapeutique anti-infectieuse et ont été décrites dans une publication [57]. Parmi les molécules identifiées, la midodrine, un agoniste des récepteurs alpha-1 adrénergique, usuellement utilisée comme antihypotenseur (Gutron®) [62], présentait la meilleure activité antivirale à dose non cytotoxique contre tous les virus testés *in vitro*. Nous avons mené un essai clinique multicentrique et randomisé (essai FLUMED EUDRACT n° 011-004552-19, promoteur : hospices civils de Lyon, investigateur : Pr Bruno Lina) pour évaluer l'activité antivirale *in vivo* de cette molécule administrée à une dose usuelle de 7,5 mg/j dans la prise en charge des gripes ambulatoires, donc non sévères

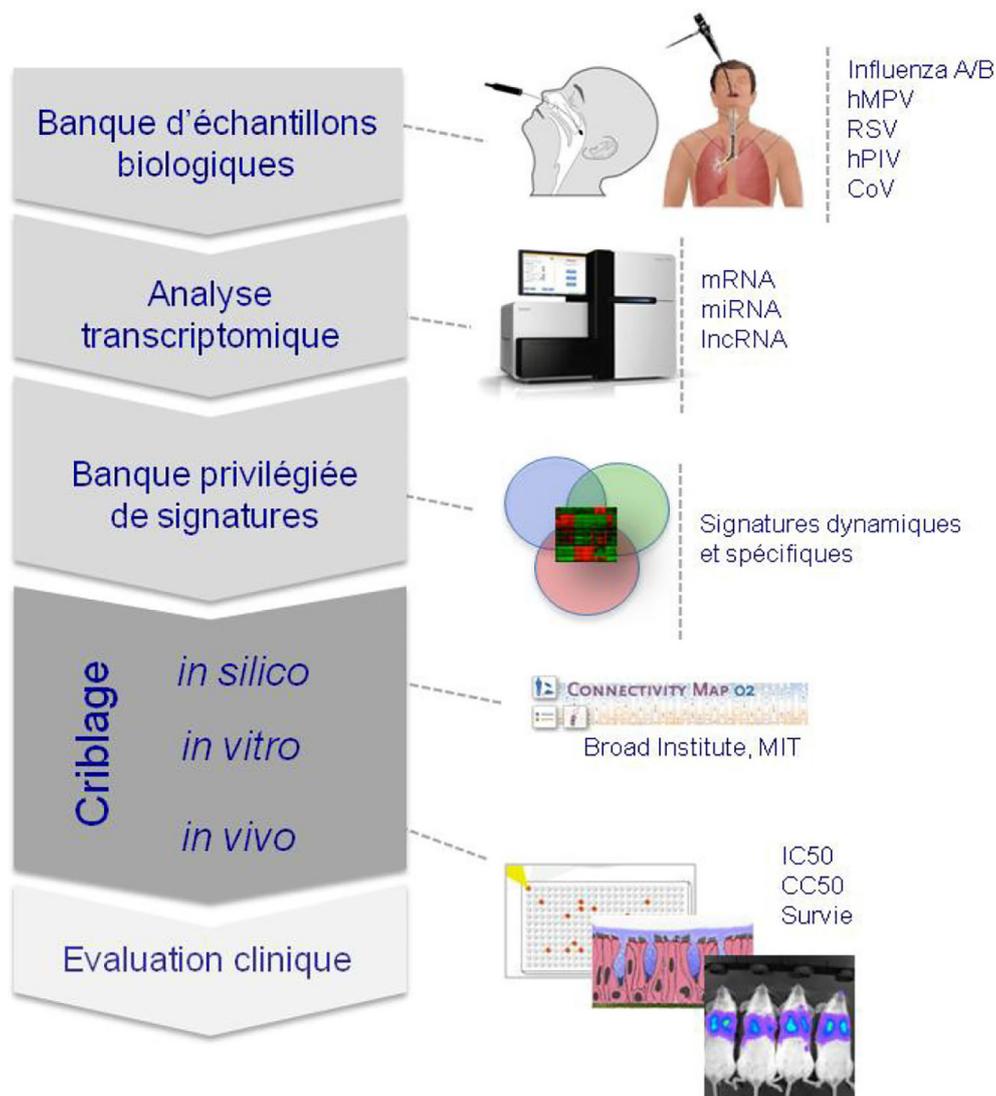


Fig. 2 Étapes nécessaires au repositionnement des molécules comme antiviraux, sur la base du profil transcriptomique des cellules infectées. Les échantillons biologiques, ici respiratoires, font l'objet d'une analyse transcriptomique. Une banque spécifique de signature est ainsi élaborée. Une interrogation informatique permet d'identifier des molécules capables d'inverser le profil transcriptomique. Les molécules identifiées sont testées sur modèles cellulaires et animaux

(80 patients confirmés comme étant infectés à influenza virus A ont été inclus en médecine générale). L'objectif principal de l'essai était d'atteindre une efficacité antivirale significative 48 heures après le traitement dans le bras midodrine, en comparaison du bras placebo. Les analyses de cet essai actuellement terminé sont en cours, avec notamment une caractérisation rétrospective de la signature transcriptomique des patients traités, afin de déterminer l'effet de la midodrine (vs placebo) sur le profil d'expression des gènes en fonction de la posologie suivie et en rapport avec le tableau clinique des patients au moment de l'inclusion et de leur réponse au traitement. Il est important de noter que cette étude pilote constitue la première approche d'explo-

tation de signature transcriptomique pour l'identification et le repositionnement de molécules ayant une AMM pour une nouvelle indication thérapeutique anti-infectieuse, incluant leur évaluation en clinique.

Un essai de confirmation pour des patients plus graves : FLUNEXT

Encouragés par cette première preuve de concept et dans le cadre du projet FLUNEXT (AAP DGOS/Inserm « Recherche clinique translationnelle », investigateur principal : Dr Manuel Rosa-Calatrava) mené avec les hospices civils de

Lyon, nous avons entrepris d'optimiser notre stratégie en exploitant des échantillons de patients hospitalisés dans le but d'établir une signature transcriptomique *in vivo* de l'infection par le virus H1N1pdm09, renforçant ainsi nos chances de sélectionner des molécules en théorie plus efficaces. L'optimisation des protocoles a permis d'exploiter des échantillons pauvres en matériel biologique ($\approx 10\,000$ cellules/5 ml ; de 500 à 70 ng d'ARN/échantillon), issus de lavages nasaux et de liquides bronchoalvéolaires de patients infectés. Fondée sur l'utilisation de kits adaptés, cette méthodologie nous a permis d'extraire et d'amplifier les ARN totaux en qualité et quantité suffisantes pour leur analyse par *microarray* (puce GeneChip[®] Human Genome U133 plus 2.0). L'analyse fonctionnelle de la signature d'infection *in vivo*, et l'exploitation de la base de données Connectivity Map pour un criblage *in silico* de molécules sur la base de leur signature cellulaire anticorrélée à celle de l'infection, a permis d'identifier 34 composés candidats. La détermination *in vitro* de leur concentration cytotoxique médiane (CC50) et de leur concentration inhibitrice médiane (IC50) a révélé des activités antivirales plus importantes que celles des molécules identifiées dans l'étude pilote FLUMED, validant ainsi la valeur ajoutée de la signature physiologique de l'infection, pour le criblage et la sélection de molécules antivirales. Les dix meilleures candidates ont ensuite fait l'objet d'une évaluation *in vivo* dans un modèle murin d'infection par le virus H1N1pdm09 (traitement par gavage). Deux molécules, déjà sur le marché pour des indications thérapeutiques en dehors de l'infectieux, se sont révélées particulièrement performantes et plus efficaces que l'oseltamivir dans nos conditions expérimentales. En traitement « préchallenge », la mortalité viro-induite passe ainsi de 60 % dans le groupe témoin et 40 % dans le groupe oseltamivir à 30 et 10 % respectivement pour nos deux molécules candidates. De plus, la combinaison de ces deux molécules avec l'oseltamivir présente un effet additif en termes de survie, y compris dans des conditions de traitement postinfection. Ces deux molécules ont fait l'objet d'un dépôt de brevet d'invention (FR 15 52284) pour une seconde indication thérapeutique anti-infectieuse, et une publication est en préparation (Terrier et al.).

Sur la base de ces résultats et grâce à l'obtention d'un financement PHRCn 2015 (FLUNEXT TRIAL PHRC n° 15-0442 ; promoteur : CHU de Lille ; investigateur coordonnateur : Dr Julien Poissy), un nouvel essai clinique labellisé par le réseau Trial Group for Global Evaluation and Research in Sepsis (Triggersep) est prévu pour évaluer les propriétés antivirales des deux molécules candidates en combinaison avec l'oseltamivir chez des patients hospitalisés en réanimation pour prise en charge d'une grippe grave.

Cette étude prospective multicentrique randomisée en double insu comptera trois bras parallèles, afin de comparer l'efficacité de l'association de chacune des molécules à l'oseltamivir, contre l'oseltamivir seul. Le bénéfice attendu

est une clairance virale plus rapide et plus importante que dans le groupe oseltamivir seul, avec un bénéfice potentiel sur la durée de ventilation mécanique, la mortalité, les séquelles, notamment respiratoires. L'efficacité (objectif primaire) sera évaluée sur le pourcentage de patients vivant avec une négativation de la charge virale influenza A (par RT-PCR) au niveau d'un écouvillon nasopharyngé à j7 de l'inclusion. Les objectifs secondaires seront :

- de vérifier si l'administration de ces molécules restaure bien un profil transcriptionnel physiologique (inversion *in vivo* de la signature induite par l'infection par influenza) ;
- d'évaluer l'action de ces molécules sur l'évolution de la charge virale (suivi pendant les dix jours du traitement) ;
- d'évaluer l'impact de ces associations sur d'autres critères pronostiques tels que la durée de ventilation mécanique, la durée de séjour en réanimation et la mortalité.

Perspectives

Cette stratégie innovante de criblage de molécules antivirales ciblant la cellule plutôt que le virus est bien adaptée aux viroses respiratoires. Celle-ci s'inscrit dans une démarche de repositionnement thérapeutique. Outre les perspectives de limiter les possibilités d'émergence de résistances, les avantages réglementaires et financiers de cette stratégie sont évidents par rapport au processus long et coûteux du développement de molécules de novo. En perspective, il est tout à fait envisageable que cette stratégie rationnelle et rationalisée que nous proposons pour cribler, sélectionner et repositionner des médicaments puisse non seulement permettre de puiser dans la pharmacopée existante et constituer ainsi une force de réaction rapide en cas d'épidémie ou de pandémie, ou d'émergence de nouveaux virus, mais également être déclinée pour d'autres pathogènes que ceux respiratoires ciblés dans notre programme de recherche translationnelle.

Liens d'intérêts : J. Poissy n'a aucun lien d'intérêt à déclarer. O. Terrier déclare être co-inventeur des brevets cités dans l'article (FR n° 0958810- PCT/EP2010/069023-WO 2011069990, US n° 61/279 997). B. Lina déclare avoir reçu un financement de Biomérieux pour le développement d'outils diagnostiques. J. Textoris déclare être salarié de la société Biomérieux. Il est co-inventeur des brevets cités dans l'article (FR n° 0958810- PCT/EP2010/069023-WO 2011069990, US n° 61/279 997). M. Rosa-Calatrava déclare être salarié à l'Inserm et être co-inventeur des brevets cités dans l'article (FR n° 0958810- PCT/EP2010/069023-WO 2011069990, US n° 61/279 997).

Références

- Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME (2001) Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356:983–9
- Woolhouse M, Gaunt E (2007) Ecological origins of novel human pathogens. *Critical reviews in microbiology* 33:231–42
- Woolhouse ME, Howey R, Gaunt E, et al (2008) Temporal trends in the discovery of human viruses. *Proc Biol Sci* 275:2111–5
- Cheng VC, Lau SK, Woo PC, et al (2007) Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clinical Microbiol Rev* 20:660–94
- Zumla A, Hui DS, Perlman S (2015) Middle East respiratory syndrome. *Lancet* 386:995–1007
- Legend A, Briand S, Shindo N, et al (2013) Addressing the public health burden of respiratory viruses: the battle against respiratory viruses (BRaVe) initiative. *Future Virol* 8:953–68
- Jain S, Self WH, Wunderink RG, et al (2015) Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. adults. *N Engl J Med* 373:415–27
- Pavia AT (2011) Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin Infect Dis* 52:S284–S9
- Shaw ML, Palese P (2006) Orthomyxoviridae. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields Virol*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, pp 1151–85
- Hutchinson EC, von Kirchbach JC, Gog JR, et al (2010) Genome packaging in influenza A virus. *J Gen Virol* 91:313–28
- Zimmer SM, Burke DS (2009) Historical perspective — Emergence of influenza A(H1N1) viruses. *N Engl J Med* 361:279–85
- Bonmarin I, Belchior E, Bergounioux J, et al (2016) Intensive care unit surveillance of influenza infection in France: the 2009/10 pandemic and the three subsequent seasons. *Euro Surveill* (in press)
- Ortiz JR, Neuzil KM, Shay DK, et al (2014) The burden of influenza-associated critical illness hospitalizations. *Crit Care Med* 42:2325–32
- Streng A, Prifert C, Weissbrich B, et al (2015) Continued high incidence of children with severe influenza A(H1N1)pdm09 admitted to paediatric intensive care units in Germany during the first three post-pandemic influenza seasons, 2010/11–2012/13. *BMC Infect Dis* 15:573
- Callaghan WM, Creanga AA, Jamieson DJ (2015) Pregnancy-related mortality resulting from influenza in the United States during the 2009–2010 pandemic. *Obstet Gynecol* 126:486–90
- Alshammari TM, AlFehaid LS, AlFraih JK, et al (2014) Health care professionals' awareness of, knowledge about and attitude to influenza vaccination. *Vaccine* 32:5957–61
- Wicker S, Rabenau HF, von Gierke L, et al (2013) Hepatitis B and influenza vaccines: important occupational vaccines differently perceived among medical students. *Vaccine* 31:5111–7
- Catania J, Que LG, Govert JA, et al (2014) High intensive care unit admission rate for 2013–2014 influenza is associated with a low rate of vaccination. *Am J Respir Crit Care Med* 189:485–7
- Gilca R, Skowronski DM, Douville-Fradet M, et al (2015) Mid-season estimates of influenza vaccine effectiveness against influenza A(H3N2) hospitalization in the elderly in Quebec, Canada, January 2015. *PLoS One* 10:e0132195
- Haveri A, Ikonen N, Julkunen I, et al (2015) Reduced cross-protection against influenza A(H3N2) subgroup 3C.2a and 3C.3a viruses among Finnish healthcare workers vaccinated with 2013/14 seasonal influenza vaccine. *Euro Surveill* 20:21028
- Beigel JH (2008) Influenza. *Crit Care Med* 36:2660–6
- Bright RA, Medina MJ, Xu X, et al (2005) Incidence of adamantane resistance among influenza A(H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* 366:1175–81
- Bright RA, Shay DK, Shu B, et al (2006) Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005–2006 influenza season in the United States. *JAMA* 295:891–4
- Hayden FG (2006) Antiviral resistance in influenza viruses—implications for management and pandemic response. *N Engl J Med* 354:785–8
- Kaiser L, Wat C, Mills T, et al (2003) Impact of oseltamivir treatment on influenza-related lower respiratory tract complications and hospitalizations. *Arch Intern Med* 163:1667–72
- Nicholson KG, Aoki FY, Osterhaus AD, et al (2000) Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. *Neuraminidase Inhibitor Flu Treatment Investigator Group*. *Lancet* 355:1845–50
- Treanor JJ, Hayden FG, Vrooman PS, et al (2000) Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: a randomized controlled trial. *US Oral Neuraminidase Study Group*. *JAMA* 283:1016–24
- Hayden FG, Treanor JJ, Fritz RS, et al (1999) Use of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in experimental human influenza: randomized controlled trials for prevention and treatment. *JAMA* 282:1240–6
- Walker JB, Hussey EK, Treanor JJ, et al (1997) Effects of the neuraminidase inhibitor zanamivir on otologic manifestations of experimental human influenza. *J Infect Dis* 176:1417–22
- McGeer A, Green KA, Plevneshi A, et al (2007) Antiviral therapy and outcomes of influenza requiring hospitalization in Ontario, Canada. *Clin Infect Dis* 45:1568–75
- Welch SC, Lam SW, Neuner EA, et al (2015) High-dose versus standard dose oseltamivir for treatment of severe influenza in adult intensive care unit patients. *Intensive Care Med* 41:1365–6
- Moscona A (2005) Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med* 353:1363–73
- de Jong MD, Tran TT, Truong HK, et al (2005) Oseltamivir resistance during treatment of influenza A(H5N1) infection. *N Engl J Med* 353:2667–72
- Le QM, Kiso M, Someya K, et al (2005) Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* 437:1108
- Escuret V, Frobert E, Bouscambert-Duchamp M, et al (2008) Detection of human influenza A(H1N1) and B strains with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J Clin Virol* 41:25–8
- Hoang Vu MP, Nguyen CT, Nguyen le KH, et al (2013) Oseltamivir resistance among influenza viruses: surveillance in northern Viet Nam, 2009–2012. *Western Pac Surveill Response J (WPSAR)* 4:25–9
- Dixit R, Khandaker G, Ilgoutz S, et al (2013) Emergence of oseltamivir resistance: control and management of influenza before, during and after the pandemic. *Infect Disord Drug Targets* 13:34–45
- Terrier O, Moules V, Carron C, et al (2012) The influenza fingerprints: NS1 and M1 proteins contribute to specific host cell ultrastructure signatures upon infection by different influenza A viruses. *Virology* 432:204–18
- Terrier O, Carron C, Cartet G, et al (2014) Ultrastructural fingerprints of avian influenza A(H7N9) virus in infected human lung cells. *Virology* 456–457:39–42
- Ehrhardt C, Seyer R, Hrinčius ER, et al (2010) Interplay between influenza A virus and the innate immune signaling. *Microbes Infect* 12:81–7
- Planz O (2013) Development of cellular signaling pathway inhibitors as new antivirals against influenza. *Antiviral Res* 98:457–68
- Zhang H, Hale BG, Xu K, et al (2013) Viral and host factors required for avian H5N1 influenza A virus replication in mammalian cells. *Viruses* 5:1431–46

43. Cameron CM, Cameron MJ, Bermejo-Martin JF, et al (2008) Gene expression analysis of host innate immune responses during Lethal H5N1 infection in ferrets. *J Virol* 82:11308–17
44. Kash JC, Basler CF, Garcia-Sastre A, et al (2004) Global host immune response: pathogenesis and transcriptional profiling of type A influenza viruses expressing the hemagglutinin and neuraminidase genes from the 1918 pandemic virus. *J Virol* 78:9499–511
45. Carninci P, Yasuda J, Hayashizaki Y (2008) Multifaceted mammalian transcriptome. *Curr Opin Cell Biol* 20:274–80
46. Jacquier A (2009) The complex eukaryotic transcriptome: unexpected pervasive transcription and novel small RNAs. *Nat Rev Genet* 10:833–44
47. Katagiri F, Glazebrook J (2009) Overview of mRNA expression profiling using DNA microarrays. FM Ausubel, et al (eds) *Current protocols in molecular biology*, chapter 22, unit 22–24
48. Nau GJ, Richmond JF, Schlesinger A, et al (2002) Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1503–08
49. Feezor RJ, Oberholzer C, Baker HV, et al (2003) Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with gram-negative versus gram-positive bacteria. *Infect Immun* 71:5803–13
50. Liu R, Wang X, Chen GY, et al (2007) The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med* 356:217–26
51. Kash JC (2009) Applications of high-throughput genomics to antiviral research: evasion of antiviral responses and activation of inflammation during fulminant RNA virus infection. *Antiviral Res* 83:10–20
52. Reeves JD, Piefer AJ (2005) Emerging drug targets for antiretroviral therapy. *Drugs* 65:1747–66
53. Angus DC, van der Poll T (2013) Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 369:840–51
54. Cohen J, Vincent JL, Adhikari NK, et al (2015) Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect Dis* 15:581–614
55. Hopkins AL, Groom CR (2002) The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* 1:727–30
56. Sirota M, Dudley JT, Kim J, et al (2011) Discovery and preclinical validation of drug indications using compendia of public gene expression data. *Sci Translat Med* 3:96ra77
57. Josset L, Textoris J, Loriod B, et al (2010) Gene expression signature-based screening identifies new broadly effective influenza A antivirals. *PLoS One* 5:pii:e13169
58. Terrier O, Josset L, Textoris J, et al (2011) Cellular transcriptional profiling in human lung epithelial cells infected by different subtypes of influenza A viruses reveals an overall down-regulation of the host p53 pathway. *Virol J* 8:285
59. Terrier O, Textoris J, Carron C, et al (2013) Host microRNA molecular signatures associated with human H1N1 and H3N2 influenza A viruses reveal an unanticipated antiviral activity for miR-146a. *J Gen Virol* 94:985–95
60. Lamb J (2007) The Connectivity Map: a new tool for biomedical research. *Nat Rev Cancer* 7:54–60
61. Gilbert BE, McLeay MT (2008) MegaRibavirin aerosol for the treatment of influenza A virus infections in mice. *Antiviral Res* 78:223–9
62. McClellan KJ, Wiseman LR, Wilde MI (1998) Midodrine. A review of its therapeutic use in the management of orthostatic hypotension. *Drugs Aging* 12:76–86