

Virologie

EFFETS DE LA CHLOROQUINE SUR LA RÉPLICATION D'UN RÉTROVIRUS MURIN

Par M. SINET, F. VERDIER, G. CHARMOT, B. DESFORGES, C. GAUDIN & J. J. POCIDALO (1) (2)

Effects of chloroquine on the replication of a murine retrovirus/

Summary: The wide use of chloroquine (Cq) for prophylaxis and chemotherapy of malaria in Africa, and the increased spread of AIDS in areas of this continent where malaria is endemic, raised the question of a possible interaction between chloroquine intake and HIV infection. Indeed, hydroxychloroquine and chloroquine itself have been shown to inhibit HIV-1 replication *in vitro*, hydroxychloroquine being proposed as a potential useful adjunctive therapy in the treatment of HIV-1 infection. On the other hand, chloroquine has been reported to enhance the replication of Semliki forest and encephalomyocarditis viruses in a mouse model. In an attempt to elucidate Cq effect on retroviral replication, we have studied the effect of various concentrations of chloroquine *in vitro* (0.1 nmol/l to 25 μ mol/l) on Friend retrovirus (FV)-infected fibroblasts of mice and *in vivo* (2 to 30 mg/kg) on FV-infected mice. No reduction in the number of virus foci was found in chloroquine-treated fibroblasts cultures. In chloroquine treated-infected mice, no differences were observed in the spleen weights, except an increase at 10 mg/kg. A decrease in splenocyte virus titer was only observed at 10 and 30 mg/kg. No differences in the median survival time was observed up to 30 mg/kg. The authors concluded that chloroquine seemed to have variable effects on viral replication *in vivo* depending on the dosage, but has no influence on the course of FV-induced disease.

Résumé : L'importante utilisation de la chloroquine pour la prophylaxie et le traitement du paludisme en Afrique, et l'étendue croissante des cas de sida dans les régions de ce continent où le paludisme sévit de manière endémique, soulèvent la question d'une interaction possible entre la prise de chloroquine et l'infection à VIH. En effet, il a été montré que l'hydroxychloroquine et la chloroquine elle-même inhibaient la réplication de VIH-1 *in vitro*, l'hydroxychloroquine étant même proposée comme thérapeutique complémentaire dans le traitement du sida. A l'inverse, il a également été montré que la chloroquine *in vivo* augmentait la réplication des virus Semliki forest et encephalomyocarditis chez la souris. Les auteurs ont étudié l'effet de concentrations croissantes de chloroquine *in vitro* (0,1 nmol/l à 25 μ mol/l) sur des fibroblastes de souris, infectés par le rétrovirus de Friend (VF) et *in vivo* (2 à 30 mg/kg) sur des souris infectées par ce même virus. Aucune réduction dans le nombre de foyers infectieux n'a été observée dans les fibroblastes traités par la chloroquine. Aucune différence n'a été observée dans le poids des rates des souris traitées par la chloroquine, sauf une augmentation à la dose de 10 mg/kg. Une diminution du titre viral des splénocytes n'a été observée qu'aux doses de 10 et 30 mg/kg. Aucune différence dans les médianes des temps de survie n'a été observée jusqu'à 30 mg/kg. Les auteurs concluent que la chloroquine semble exercer des effets variables sur la réplication virale en fonction de la dose utilisée, mais n'exerce aucune influence sur le cours de la maladie induite par le virus de Friend.

INTRODUCTION

L'importante utilisation de la chloroquine pour la prophylaxie et le traitement du paludisme en Afrique, et l'étendue croissante des cas de sida dans les régions de ce continent où le paludisme sévit de manière endémique, permettent d'évoquer l'hypothèse d'une interaction possible entre la prise de chloroquine et l'infection à VIH. En effet, des études antérieures ont montré que, *in vitro*, la chloroquine et l'hydroxychloroquine

exercent un effet inhibiteur sur la réplication de certains virus, tels que le virus influenza, l'adénovirus, certains rétrovirus murins et le VIH (8, 16 18). A l'inverse, la chloroquine augmenterait l'expression du virus Epstein-Barr (3) et, *in vivo*, elle serait capable d'augmenter la réplication des virus de l'encéphalomyocardite et Semliki Forest dans l'infection expérimentale de la souris (6). Ces résultats apparemment contradictoires nous ont incités à étudier l'effet de différentes concentrations de chloroquine sur la réplication d'un rétrovirus murin, le virus de Friend (VF) d'une part *in vitro*, sur des cultures de fibroblastes de souris, infectés par VF, et *in vivo*, après infection expérimentale de la souris.

(1) INSERM Unité 13, Institut de Médecine et d'Épidémiologie africaines, Paris.

(2) Manuscrit n° 1730. "Virologie". Accepté le 18 avril 1996.

Le virus de Friend, rétrovirus de la leucémie murine, est un complexe rétroviral comprenant un virus compétent pour la réplication, responsable d'une leucémie d'apparition tardive et un virus défectif dont les cellules cibles sont les précurseurs érythropoïétiques, et responsable d'une érythroleucémie aiguë. La maladie se manifeste par une polyglobulie d'apparition rapide accompagnée d'un syndrome d'immunodépression et associée à une splénomégalie importante entraînant la mort des animaux en 4 à 6 semaines. Dans ce modèle d'infection rétrovirale expérimentale d'évolution rapide, les effets thérapeutiques des antirétroviraux ont pu être évalués (13, 14), et ont montré que la zidovudine exerce une action antivirale dans ce modèle.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pour l'étude *in vitro*, des cellules Dunnii (fibroblastes de souris) ont été cultivées dans le milieu de culture RPMI 1640 (Gibco) contenant 10 % de sérum de veau fœtal, 1 % de glutamine, et des antibiotiques (pénicilline 100 U, streptomycine 100 µg/ml). Les cellules Dunnii ($5 \cdot 10^4$ cellules/puits) ont été distribuées dans des plaques de culture 12 puits (Costar) et cultivées pendant 24 heures avant l'inoculation virale (50 UFF/puits de virus de Friend). Puis les cellules ont été incubées en présence de doses croissantes de chloroquine (0,1 nmol/l à 25 µmol/l) pendant cinq jours. La quantification virale est effectuée à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique de la protéine d'enveloppe du virus, gp70. Sa fixation est révélée par un deuxième anticorps conjugué à la peroxydase qui, en présence de substrat, permet la détection des foyers viraux et leur quantification sous la loupe binoculaire (15).

Pour l'étude *in vivo*, des souris DBA2 femelles de 4 à 6 semaines ont été inoculées par injection de 0,2 ml de suspension virale dans le sinus rétro-orbitaire. Différents groupes de 5 souris ont été constitués et 2 séries expérimentales ont été réalisées, chacune comprenant un groupe de souris témoins infectées non traitées. Les souris traitées ont reçu par voie sous-cutanée 2, 4, 10 ou 30 mg/kg de chloroquine base pendant 4 jours consécutifs, selon le modèle recommandé par PETERS (10).

Les souris ont été sacrifiées 14 jours après l'inoculation virale; le poids de la rate et le compte des foyers viraux ont été utilisés comme indices d'infection. Par ailleurs une étude de survie a été réalisée (10 souris dans chaque groupe) dans les mêmes conditions d'infection et de traitement.

RÉSULTATS

In vitro, les effets de la chloroquine ont été mesurés pour des concentrations variant de 0,1 nmol/l à 25 µmol/l. Par rapport au nombre de foyers viraux en l'absence de chloroquine, nous avons observé une

diminution très faible du nombre des foyers viraux avec des doses croissantes de chloroquine et cette diminution n'est pas proportionnelle à la dose. Une diminution significative n'a été obtenue que pour les plus fortes doses, 5 et 25 µmol/l, concentrations pour lesquelles la chloroquine est toxique pour la cellule (fig. 1).

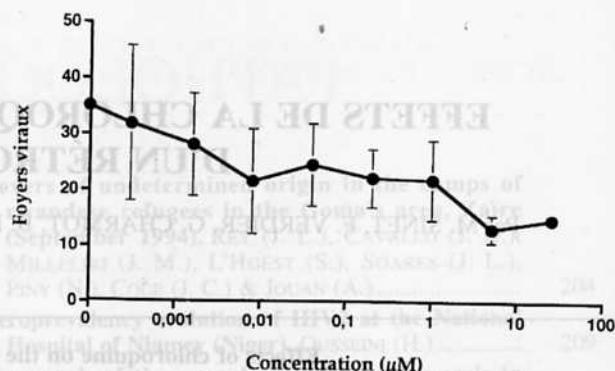


Fig. 1. — Influence de doses croissantes de chloroquine sur le nombre de foyers viraux observés sur fibroblastes de souris (Dunnii) infectés par le virus de Friend.

In vivo, deux séries expérimentales ont été réalisées. Dans la première, les souris non traitées ont été comparées à des souris ayant reçu 2 ou 4 mg/kg/j de chloroquine pendant 4 jours après l'inoculation virale. On ne note aucune différence ni dans le poids des rates ni dans le titre viral des splénocytes par rapport aux souris témoins. La deuxième expérience a comparé des souris non traitées à des souris traitées par 10 ou 30 mg/kg/j de chloroquine administrés pendant 4 jours avant l'inoculation virale. Dans ce cas, l'infection réalisée s'était développée à un niveau moindre. Par rapport à des souris non infectées dont le poids moyen de rate est de 75 mg, la splénomégalie induite par l'infection virale n'était que de 168 mg en moyenne alors qu'elle atteignait 450 mg dans la première série. Par rapport aux souris non traitées, on note une diminution du titre viral pour les souris ayant reçu 10 ou 30 mg/kg/j de chloroquine ($P < 0,001$) mais qui n'a pas d'influence notable sur la splénomégalie (tableau I). Aucune différence entre les médianes des temps de survie, quelle que soit la dose de chloroquine étudiée, n'a été observée (tableau I).

DISCUSSION

On pourrait s'attendre à ce que des agents lysosomotropiques et des bases faibles comme la chloroquine et l'hydroxychloroquine, qui ont des effets cellulaires multiples, inhibent l'action du VIH, même si le mécanisme définitif d'action est incertain : l'hydroxychloroquine et la chloroquine inhibent la fusion des virus aux membranes cellulaires, inhibent la synthèse de l'ADN et de l'ARN et l'acidification des vésicules endosomiales, bloquent l'endocytose et empêchent

Tab. I. — Effet de doses croissantes de chloroquine sur le poids des rates, le nombre de splénocytes infectés et la médiane des temps de survie chez des souris infectées par le virus de Friend.

chloroquine	poids des rates (mg)	titre viral des splénocytes (log ffu/10 ⁶ cellules)	temps moyen de survie (jours)
non traitées [a]	450 ± 93	2,31 ± 0,07	31
2 mg/kg/j	486 ± 119	2,66 ± 0,23	30
4 mg/kg/j	628 ± 179	2,68 ± 0,02	24
non traitées [b]	168 ± 14	1,83 ± 0,05	31
10 mg/kg/j	339 ± 59*	1,49 ± 0,06**	45
30 mg/kg/j	175 ± 8	1,45 ± 0,06**	32

* P < 0,01 versus le groupe non traité [b] et le groupe traité par 30 mg/kg/j

** P < 0,001 versus le groupe non traité [b]

Non traitées [a] et non traitées [b] : groupes témoins de deux séries expérimentales différentes

Sacrifice 14 jours après l'inoculation virale : 5 souris / groupe

Survie : 10 souris / groupe

l'entrée de nombreux virus (5). En fait, dans le modèle *in vitro* utilisé par SPERBER (16) comportant des cellules T et des monocytes infectés par VIH-1, l'hydroxychloroquine n'empêche pas la pénétration du virus mais diminue seulement le pouvoir infectieux des virions produits par les cellules traitées au préalable par 1 µmol/l d'hydroxychloroquine. Des résultats similaires ont été obtenus avec la chloroquine à des concentrations plus élevées (250 and 500 µmol/l) (18). Au cours de notre étude *in vitro* (0,1 nmol/l à 25 µmol/l de chloroquine), nous n'avons pas observé d'inhibition de la réplication virale du virus de Friend. *In vivo*, nous avons observé une diminution de la charge virale dans les rates des animaux infectés, traités par 10 et 30 mg/kg de chloroquine, mais qui ne correspondait pas à une diminution parallèle du poids des rates. Par ailleurs, c'est une tendance à l'augmentation (bien que non significative) du titre viral, ainsi que du poids des rates, qui a été observée avec les doses de 2 et 4 mg/kg. Néanmoins, aucun des schémas thérapeutiques utilisés n'a entraîné de différences significatives entre les médianes des temps de survie.

Il est connu que l'utilisation prolongée de fortes doses de chloroquine (200 à 400 mg/jour, pendant plusieurs mois, voire plusieurs années), comme c'est le cas pour le traitement de maladies inflammatoires chroniques (supposées « auto-immunes ») peut conférer à cette molécule des propriétés immunomodulatrices (10, 19) qui se traduisent par l'inhibition *in vitro* de la réponse lymphocytaire à de nombreux stimuli, de l'activité des cellules NK (9) et de la production d'intermédiaires azotés par les macrophages de murins (4). Tous ces effets, qui devraient en principe se traduire par une augmentation de la réplication virale, n'ont été observés *in vitro* qu'avec de fortes concentrations de chloroquine (jusqu'à 780 µmol/l). L'inhibition de la fonction des monocytes a également été observée chez le volontaire sain ayant reçu des doses de chloroquine prophylactiques (7) et chez le singe ayant reçu des doses thérapeutiques (12). Cet effet dépendait de la concentration sanguine en médicament mais également

de la durée du traitement. *In vivo*, la chloroquine administrée à des souris à la dose de 10 mg/kg augmente la réplication des virus Semliki et encephalomyocarditis. Les auteurs expliquent cet effet par une diminution possible de production endogène d'interféron, cette diminution entraînant une réactivation de la virulence des virus étudiés. Il faut souligner par ailleurs que ces virus ne sont pas des rétrovirus. Dans notre modèle d'infection rétrovirale chez la souris, c'est une diminution de la réplication virale que nous avons observée avec cette même dose, et pas de progression (ni de ralentissement) de la maladie comme en attestent les temps de survie.

Toutefois, la chloroquine pourrait agir d'une manière indirecte sur les relations virus/hôte. En effet la chloroquine inhibe *in vitro* la production de TNF par les monocytes (11). Or le TNF faciliterait la réplication du VIH (2). La chloroquine pourrait également agir comme les glucocorticoïdes (antiinflammatoires et immunorégulateurs), qui s'opposent à l'apoptose des lymphocytes T, sans supprimer la réplication virale (1). La durée de 5 jours de l'expérimentation sur la souris, décrite dans ce travail, est évidemment trop brève pour mettre en évidence une telle action immunomodulatrice de la chloroquine.

La plupart des résultats rapportés précédemment dans la littérature ont été observés avec de fortes concentrations de chloroquine jamais atteintes au cours de traitement prophylactique ou thérapeutique du paludisme et qui, pour certaines d'entre elles (supérieures à 3 µmol/l), correspondent à des doses toxiques (8, 17).

Les résultats de notre étude utilisant un modèle murin d'infection à rétrovirus, montrent que la chloroquine a des effets variables sur la réplication virale *in vivo*, qui semblent dépendre de la dose utilisée et pour lesquels les mécanismes effecteurs ne sont pas clairement élucidés. Elle n'a en tous cas pas d'influence sur le cours de la maladie produite par FV à aucune des doses étudiées.

