

Université de Montréal

Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de CCR5

par :

Odalis Asin Milan.

Département de Microbiologie Infectiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de Docteur
ès science (PhD) en Microbiologie et Immunologie

Decembre 2014

©, Odalis Asin Milan, 2014

Université de Montréal

Département de Microbiologie Infectiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de Docteur
ès science (PhD) en Microbiologie et Immunologie

Thèse intitulée:

Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de CCR5

Présentée par :

Odalis Asin Milan.

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Président rapporteur: Dr Hugo Soudeyns.

Directrice de recherche: Dre. Cécile Tremblay

Membre du jury: Dr. Nicolaus Heveker

Examineur externe: Dr. Lionel Berthoux.

Représentant du doyen de la FES: Dr Jacques Archanbault

©, Odalis Asin Milan, 2014

Sommaire

Sommaire

Le travail décrit dans ce manuscrit vise à caractériser les voies de résistance aux inhibiteurs de CCR5. Lors d'une première étape, nous avons développé un test phénotypique clonal nous permettant d'une part d'identifier le tropisme viral et d'autre part de mesurer la résistance aux inhibiteurs des CCR5. Des virus à tropisme R5 ou X4 représentant aussi peu que 0,4% d'un mélange de populations virales sont détectables par ce test, démontrant ainsi sa sensibilité. De plus, grâce à son approche clonale, cette technique permet de différencier les virus à tropisme double de populations virales mixtes.

Par la suite, nous avons étudié l'impact des mutations dans les régions variables de la protéine gp120 de l'enveloppe du virus VIH-1 sur la résistance aux inhibiteurs de CCR5. Pour ce faire, nous avons généré des virus résistants par passage des isolats CC1/85 et BAL, en présence de concentrations sous-inhibitrices de maraviroc (MVC) et vicriviroc (VCV). Après quelques passages du virus CC1/85 en présence de MVC, certaines sont apparues dans différentes régions de la gp120. Par la suite, nous avons sélectionné trois mutations dans les domaines variables de la gp 120, V169M en V2, L317W en V3 et I408T en V4 pour construire des virus contenant des mutations simples, doubles et triples afin d'évaluer la contribution des mutations individuelles ou combinées au phénotype de résistance. Nous avons déterminé la sensibilité de chaque mutant à MVC et VCV, le pourcentage d'infectivité et le tropisme viral par rapport au phénotype sauvage. Tous les mutants ont conservé le tropisme R5 et ont montré une diminution d'infectivité par rapport au contrôle. Nos résultats ont montré que les mutants qui portent des mutations en V4 (I408T) ont eu le plus d'impact sur la susceptibilité au MVC.

Finalement, nous avons voulu évaluer l'activité antivirale d'un nouvel inhibiteur de CCR5, VCH-286 avec d'autres inhibiteurs de CCR5 tels que MVC et VVC ainsi que ses interactions avec des médicaments représentatifs de différentes classes d'antirétroviraux ARV employés en clinique pour traiter le VIH/SIDA., afin d'évaluer si ces médicaments pourraient être utilisés dans un même régime thérapeutique. Nous avons tout d'abord évalué indépendamment l'activité antivirale des trois inhibiteurs de CCR5 : VCH-286, MVC et VVC. Par la suite nous avons évalué les interactions de VCH-286 avec MVC et VVC. Finalement nous avons évalué les interactions de VCH-286 avec d'autres médicaments antirétroviraux. Ces études ont montré que VCH-286 est un inhibiteur puissant de CCR5 avec une activité antivirale *in vitro* de l'ordre du nanomolaire et des interactions médicamenteuses favorables avec la majorité des ARV tels que les inhibiteurs de transcriptase inverse, de protéase, d'intégrase, et de fusion employés en clinique pour traiter le VIH/SIDA et des interactions allant de synergie à l'antagonisme avec les inhibiteurs de CCR5.

Nos résultats montrent que la plasticité de l'enveloppe virale du VIH-1 a des répercussions sur la résistance aux inhibiteurs de CCR5, le tropisme et la possible utilisation de ces molécules en combinaison avec d'autres molécules appartenant à la même classe.

Mots-clés: VIH, résistance, inhibiteurs d'entrée, corécepteur CCR5.

Abstract

Abstract

The work described in this manuscript aimed to characterize the resistance pathways to CCR5 inhibitors. We first developed a phenotypic assay to identify viral tropism and to measure the resistance to CCR5 inhibitors. This assay detects R5 tropic viruses or X4 when they represent as little as 0.4% in a mixture of viral populations, demonstrating its robustness and sensitivity. Based on its clonal approach, this assay can differentiate the truly dual-tropic viruses from mixed viral populations.

We then studied the impact of mutations in the variable regions of gp120 envelope protein of HIV-1 virus on resistance to CCR5 inhibitors. To do this, resistant viruses were generated by passage of CC1/85 and BAL isolates in the presence of sub-inhibitory concentrations of maraviroc (MVC) and vicriviroc (VCV). Following some passages of the CC1/85 virus in the presence of MVC, some mutations were identified in different regions of the gp120. We further selected three mutations in the variable domains of gp120, V169M in V2, L317W in V3 and I408T in V4 to construct viruses containing single, double and triple mutations to assess the contribution of individual or combined mutations in the resistance phenotype to MVC and VCV. We determined the sensitivity of each mutant to MVC and VCV, the tropism and the percentage of infectivity compared to wild type. Our results showed that the sequences that carry mutations in the V4 domain I408T, had the most impact on susceptibility to MVC.

Finally, we aimed to evaluate the antiviral activity of a new CCR5 inhibitor, VCH-286 and its interaction with representative drugs from different classes of antiretroviral (ARVs) such as reverse transcriptase inhibitors, protease inhibitors, integrase inhibitors and fusion inhibitors used in clinic to treat HIV/AIDS and other CCR5 inhibitors such as MVC and VVC to assess whether these drugs could be used together within the same treatment regimen. To answer this question, we first evaluated the antiviral activity of the three CCR5 inhibitors: VCH-286, MVC, and VVC. We then evaluated the interactions of VCH -286 with MVC VVC. We finally evaluated the interactions of VCH -286 with other ARV drugs

These studies showed that VCH-286 is a potent inhibitor of R5 viruses with antiviral activity at the nanomolar range and favorable drug interactions with the majority of ARVs such as reverse transcriptase, protease, integrase and fusion inhibitors employed clinically to treat HIV/AIDS. The combinations of CCR5 inhibitors have interactions ranging from synergy to antagonism.

Our results show that the plasticity of the viral envelope of HIV-1 affects resistance to CCR5 inhibitors, its tropism and the potential combination of these drugs.

Keywords: HIV, resistance, HIV inhibitors, coreceptor CCR5.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
ABSTRACT.....	vi
TABLE DES MATIÈRES.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	xii
ABRÉVIATIONS.....	xiv
MOLÉCULES APPROUVÉES POUR LE TRAITEMENT DE L'INFECTION A VIH.....	xvi
LISTE D'ACIDES AMINÉS.....	xvii
DÉDICACE.....	xviii
REMERCIEMENTS.....	xix
1 Introduction.....	1
1.1 Les origines du VIH.....	2
1.2 La pandémie de SIDA.....	4
1.3 Le virus du VIH.....	6
1.3.1 Les types et diversités du VIH.....	6
1.3.2 Généralités et structure du VIH.....	8
1.3.3 Organisation du génome du VIH.....	11
1.3.4 Les glycoprotéines d'enveloppe.....	12
1.3.4.1 Synthèse et maturation des glycoprotéines d'enveloppe.....	12
1.3.4.2 Structure de la glycoprotéine gp120.....	13
1.3.4.3 Structure de la glycoprotéine gp41.....	20
1.4 L'entrée du VIH.....	24
1.4.1 Interactions de CD4 avec la glycoprotéine gp120.....	28
1.4.2 Les interactions de la gp120 avec les corécepteurs.....	29
1.4.3 Différents mécanismes d'entrée du VIH dans la cellule.....	32
1.4.3.1 L'Entrée du VIH par endocytose.....	32
1.4.3.2 L'entrée du VIH par transfert de cellule à cellule.....	36
1.4.3.3 L'entrée du VIH par transcytose.....	40

1.5	Chimiokines et récepteurs de chimiokines.....	42
1.5.1	Structure des récepteurs des chimiokines.....	45
1.6	Corécepteurs du VIH-1 et tropisme.....	46
1.6.1	Récepteur de chimiokines CXCR-4 (CXCR4).....	46
1.6.2	Récepteur de chimiokines CC-5 (CCR5).....	48
1.6.3	La délétion de CCR5 et ses conséquences.....	50
1.6.4	Les corécepteurs alternatifs du VIH.....	52
1.6.5	Le tropisme du VIH-1.....	53
1.6.6	Le tropisme au cours de l'infection à VIH.....	54
1.6.7	Approches phénotypiques et génotypiques pour déterminer le tropisme.....	56
1.7	Le traitement du VIH.....	64
1.7.1	Les médicaments antirétroviraux.....	64
1.7.1.2	Les inhibiteurs d'entrée du VIH.....	64
1.7.1.2.1	Les inhibiteurs de CD4 et les inhibiteurs de la liaison CD4-gp120.....	65
1.7.1.2.2	Les inhibiteurs de fusion.....	67
1.7.1.2.3	Les inhibiteurs de CCR5.....	68
1.7.1.2.4	Les petites molécules inhibitrices de CCR5.....	69
1.7.1.2.5	Les inhibiteurs de CXCR4.....	75
1.7.1.2.6	Vaccines et anticorps neutralisants ciblant l'enveloppe du VIH-1	77
1.7.1.2.7	Les inhibiteurs de CCR5 comme candidats dans le développement de microbicides et autres stratégies de type prophylaxie pré-exposition (PrEP).....	81
1.8	La résistance aux médicaments contre le VIH-1.....	85
1.8.1	La résistance aux inhibiteurs de CCR5.....	87
1.8.2	La résistance aux inhibiteurs de CCR5 <i>in vitro</i>	87
1.8.3	La résistance aux inhibiteurs de CCR5 <i>in vivo</i>	92
1.8.4	La résistance aux inhibiteurs de CXCR4.....	93
1.8.5	La résistance aux inhibiteurs de fusion.....	93
1.8.6	Évaluation de la résistance.....	94
1.9	Interactions médicamenteuses.....	96
1.9.1	Les combinaisons des inhibiteurs de CCR5 avec les autres antirétroviraux.....	100
1.9.2	Les combinaisons d'inhibiteurs de CCR5.....	101
2	Hypothèse de Recherche.....	102
3	Objectifs.....	105
4	Résultats.....	107

4.1	Article 1.....	109
4.2	Article 2.....	139
4.3	Article 3.....	161
5	Discussion.....	176
6	Conclusion et Perspectives.....	203
7	Contributions.....	208
8	Bibliographie.....	210

LISTE DES FIGURES.

Figure 1	Prévalence mondiale du VIH-1 en 2013	5
Figure 2	Distribution mondiale du VIH-1	8
Figure 3	Structure du VIH-1	10
Figure 4	Structure du génome du VIH-1	12
Figure 5	Répresentation schématique de la glycoprotéine de surface gp120 du VIH-1	14
Figure 6	Répresentation de la structure tridimensionnelle de la gp120 du VIH-1	17
Figure 7	Représentation des changements dans la structure trimérique de l'Env	19
Figure 8	Schéma de la gp41 du VIH-1	22
Figure 9	Structure du complexe des hélices N36 et C34 de la gp 41	24
Figure 10	L'entrée du VIH-1	27
Figure 11	Structure de la boucle V3	30
Figure 12	Modèle d'interaction de la boucle V3 avec le corécepteur CCR5	31
Figure 13	L'entrée par endocytose	34
Figure 14	La synapse virologique	38
Figure 15	L'infection des cellules épithéliales par le VIH.	41
Figure 16	La structure des récepteurs de chimiokines	45
Figure 17	Représentation schématique de la séquence CXCR4	47
Figure 18	Représentation schématique du corécepteur CCR5	49
Figure 19	Illustration du test de tropisme	59
Figure 20	Structures chimiques des inhibiteurs de CCR5: aplaviroc, maraviroc, vicriviroc, TAK779 et TAK 220.	70
Figure 21	Site de liaison partagé par les petites molécules inhibitrices de CCR5 au sein du corécepteur CCR5	71
Figure 22	Les résidus du CCR5 impliqués dans l'interaction avec vicriviroc	73
Figure 23	Les résidus du CCR5 impliqués dans l'interaction avec maraviroc	74
Figure 24	Résistance aux inhibiteurs de CCR5. La résistance compétitive	88
Figure 25	Résistance aux inhibiteurs de CCR5. La résistance non compétitive	89

Figure 26	Résistance aux inhibiteurs de CCR5 avec maintien du tropisme R5.	194
-----------	--	-----

Liste des Tableaux

Tableau 1	Les récepteurs de chimiokines et leurs ligands.....	44
Tableau 2	Caractéristiques techniques des tests de tropisme phénotypiques.....	60

Abréviations.

1.	AA	Acide aminé.
2.	A	Adénosine.
3.	ARV	Antirétroviraux.
4.	ARN	Acide ribonucléique.
5.	CA	Capside.
6.	CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité.
7.	CTL	Lymphocytes T cytotoxiques.
8.	CPA	Cellules présentatrices d'antigènes.
9.	CL	Cellules de Langerhans.
10.	CRF	Formes circulantes recombinantes.
11.	CT	Queue cytoplasmique.
12.	CHR	Région de répétition d'heptapéptides C terminale.
13.	cSMAC	Cluster activation supramoléculaire central.
14.	C	Cytosine.
15.	DC	Cellules dendritiques.
16.	dNTPs	Désoxynucléotides triphosphates.
17.	ddN	Didésoxynucléotide.
18.	DAG	Diacylglycérol.
19.	ds	Double brin.
20.	Env	Protéine d'enveloppe.
21.	ER	Réticulum endoplasmique.
22.	FP	Peptide de fusion.
23.	gag	Group-specific antigen.
24.	G	Guanidine.
25.	HAART	Traitement antirétroviral hautement actif.
26.	IP3	Inositol triphosphate.
27.	IFN	Interféron.
28.	INTI	Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse.
29.	INNTI	Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse.
30.	IN	Intégrase.
31.	IP	Inhibiteurs de protéase.
32.	LTR	Régions de répétitions longues terminales.
33.	MPI	Plateau maximal d'inhibition.
34.	Mo	Monocytes.
35.	MΦ	Macrophages.
36.	MA	Matrice.
37.	MLV	Virus de la leucémie murine.
38.	MPER	Membrane externe proximale région.
39.	NC	Nucléocapside.
40.	NHR	Région de répétition d'heptapéptides N terminale.
41.	NO	Oxyde nitrique.
42.	NSO	Oxyde nitrique synthase.
43.	ONUSIDA	Programme des Nations Unies sur le VIH et le SIDA.
44.	pDC	Cellules dendritiques plasmacytoïdes.

45.	PKC	Protéine kinase C.
46.	PIP2	Phosphatidylinositol biphosphate.
47.	PLC	Phospholipase C.
48.	pSMAC	SMAC périphérique.
49.	PIP	Protéines inflammatoires des macrophages.
50.	pol	Polymérase.
51.	PIC	Complexe de préintégration.
52.	PR	Protéase.
53.	RT	Transcriptase inverse.
54.	SV	Synapses virologiques.
55.	ss	Simple brin.
56.	SDF	Facteur stromal dérivé des cellules.
57.	TBP	Protéine de liaison TATAA.
58.	TM	Domaine transmembranaire.
59.	U	Uracile.
60.	SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise.
61.	SNC	Système nerveux central.
62.	SI	Synapse immunologique.
63.	SMAC	Cluster d'activation supramoléculaire.
64.	SU	Surface.
65.	TAMS	Mutation des analogues de la thymidine.
66.	TI	Transcriptase inverse.
67.	TLR	Toll-like récepteurs Toll-like.
68.	TLR	Toll-like récepteurs Toll-like.
69.	TFIID	Facteur de transcription IID.
70.	TEFb	Facteur d'élongation de la transcription b.
71.	TCR	Récepteur des cellules T.
72.	T	Thymidine.
73.	URF	Formes recombinantes uniques.
74.	Vif	Facteur viral infectieux.
75.	VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1.
76.	VIH-2	Virus de l'immunodéficience humaine de type 2.
77.	VIS	Virus de l'immunodéficience simienne.
78.	VIS den	VIS du singe mona dent.
79.	VIS cpz	VIS des chimpanzés.
80.	VIS gor	VIS des gorilles.
81.	VIS gsn	VIS du singe «spot-nosed».
82.	VIS mac	VIS du macaque rhésus.
83.	VIS mon	VIS du singe mona.
84.	VIS mus	VIS du singe moustachu.
85.	VIS sm	VIS des sooty mangabey.
86.	Vpu	Protéine virale U.
87.	Vpr	Protéine virale R.

Molécules approuvées pour le traitement de l'infection par le VIH.

Inhibiteurs nucléosidiques / nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI)

Zidovudine (AZT)

Zalcitabine (ddC)

Stavudine (d4T)

Didanosine (ddI)

Abacavir (ABC)

Lamivudine (3TC)

Emtricitabine (FTC)

Ténofovir disoproxil fumarate (TDF)

Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)

Efavirenz (EFV)

Étravirine (TMC-125)

Névirapine (NVP)

Delavirdine (DLV)

Rilpivirine (TMC-278)

Inhibiteurs de protéase (IP)

Ritonavir (RTV)

Indinavir (IDV)

Nelfinavir (NFV)

Lopinavir (LPV)

Amprénavir (APV)

Fosamprénavir (FPV)

Atazanavir (ATZ)

Tipranavir (TPV)

Darunavir (DRV)

Saquinavir (SQV)

Inhibiteurs de l'intégrase du VIH

Raltégravir (RAL)

Inhibiteurs d'entrée du VIH

Antagoniste du CCR5: Maraviroc (MVC)

Inhibiteurs de fusion: enfuvirtide, Fuzeon ou T20

Liste des acides aminés.

- A Alanine**
- C Cystéine**
- D Acide aspartique**
- E Acide glutamique.**
- F Phénylalanine**
- G Glycine**
- H Histidine**
- I Isoleucine**
- K Lysine**
- L Leucine**
- M Méthionine**
- N Asparagine**
- P Proline**
- Q Glutamine**
- R Arginine**
- S Sérine**
- T Thréonine**
- V Valine**
- W Tryptophane**
- Y Tyrosine**

DÉDICACE

Je voudrais dédier cette thèse de doctorat à Dieu pour sa présence dans mon cœur, son aide et sa protection de tous les jours. Je n'ai aucun doute que sans son soutien et son amour je n'aurais pu terminer ce processus.

Je la dédie également à mes parents, Alberta Milan Claro et Juan Asin Suarez pour avoir été là tout le temps pour moi, ainsi qu'à mes enfants, Sheyla, Juan Miguel et Daniel pour leur amour, leurs encouragements, et leur enthousiasme. Pensées particulières pour mes frères et sœurs, en particulier Danny qui a été mon frère et ami en même temps.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier la Dre. Cécile Tremblay pour son inspiration et ses conseils ainsi que pour tout ce qu'elle m'a enseigné.

Je tiens également à remercier la Dre Annie Chamberland, ainsi que mes collègues de travail et amis Sylla Mohamed et Alpha Haidara pour leur appui et leur assistance.

Merci pour votre aide Mohamed El Far, Amal Nadiri et tous les autres qui m'ont accompagné dans cette aventure et dont je ne me souviens pas maintenant.

Enfin, je tiens à remercier mon conjoint Arnaldo Labrada Fuentes pour son soutien et ses encouragements. Je n'aurais pu compléter cet effort sans son aide, sa tolérance, son enthousiasme et son amour.

Introduction

1. Introduction.

1.1 Les origines du VIH

Le Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA) a été reconnu comme une nouvelle maladie en 1981 suite à l'observation d'une augmentation de cas d'infections opportunistes rares comme la pneumonie à *Pneumocystis carinii* ainsi que des cancers comme le sarcome de Kaposi [1] chez des hommes homosexuels. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine type 1 (VIH-1) a été identifié par la suite comme l'agent causal du SIDA. Depuis, cette infection est devenue une des maladies contagieuses les plus dévastatrices de l'histoire [2]. En 1986, un nouveau virus morphologiquement similaire, mais antigéniquement distinct causant aussi le SIDA a été découvert en Afrique de l'Ouest. Il a été nommé le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 2 (VIH-2) [1]. L'analyse moléculaire du génome de divers types de VIH-1 montre que certaines séquences de son génome sont similaires aux génomes trouvés dans le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) de chimpanzés (VIS cpz) (pan troglodytes) de l'Afrique de l'Ouest et Centrale. Les séquences du génome du VIH-2 quant à elles, sont similaires aux séquences du VIS de singes mangabey (VIS sm) (*Cercocebus atys*) de l'Afrique de l'Ouest. Cinq évidences ont été utilisées pour justifier la transmission zoonotique de lentivirus des primates [3-5], les similarités dans l'organisation du génome viral, la similitude phylogénétique, la prédominance dans son hôte naturel, l'association géographique et enfin les routes plausibles de transmission [3, 6, 7] .

Les circonstances de la transmission interspèce des singes à l'homme restent inconnues, mais les blessures accidentelles provenant des singes domestiqués [1], l'utilisation des grands singes pour la pratique de rites, la déforestation suivant l'expansion de l'industrie forestière et minière

en Afrique Centrale, la commercialisation de la viande de brousse sont autant de facteurs considérés [8]. L'hypothèse plus probable est l'exposition de l'homme à des animaux infectés via le contact avec le sang, des tissus ou des sécrétions infectées pendant la chasse ou la préparation de viande [1, 9].

Des données phylogénétiques associent le groupe P au VIS gor (gorilles) et le groupe O au VIS cpz ou le VIS gor. Les types M et N ont un réservoir commun soit le VIS cpz pan troglodytes. [1]. Pour ces groupes, les premiers événements de transmission semblent avoir eu lieu dans le sud du Cameroun où des réservoirs de virus ont été identifiés [4, 10]. Pour les types O et P, l'origine de la transmission interspèce n'est pas encore identifiée, mais le fait que ces deux virus soient liés plus étroitement au VIS cpz pan *troglodytes troglodytes* qu'au VIS cpz pan *troglodytes schweinfurthii* suggère que les deux groupes sont originaires de la partie ouest de l'Afrique centrale, ceci étant cohérent avec leur distribution actuelle [1].

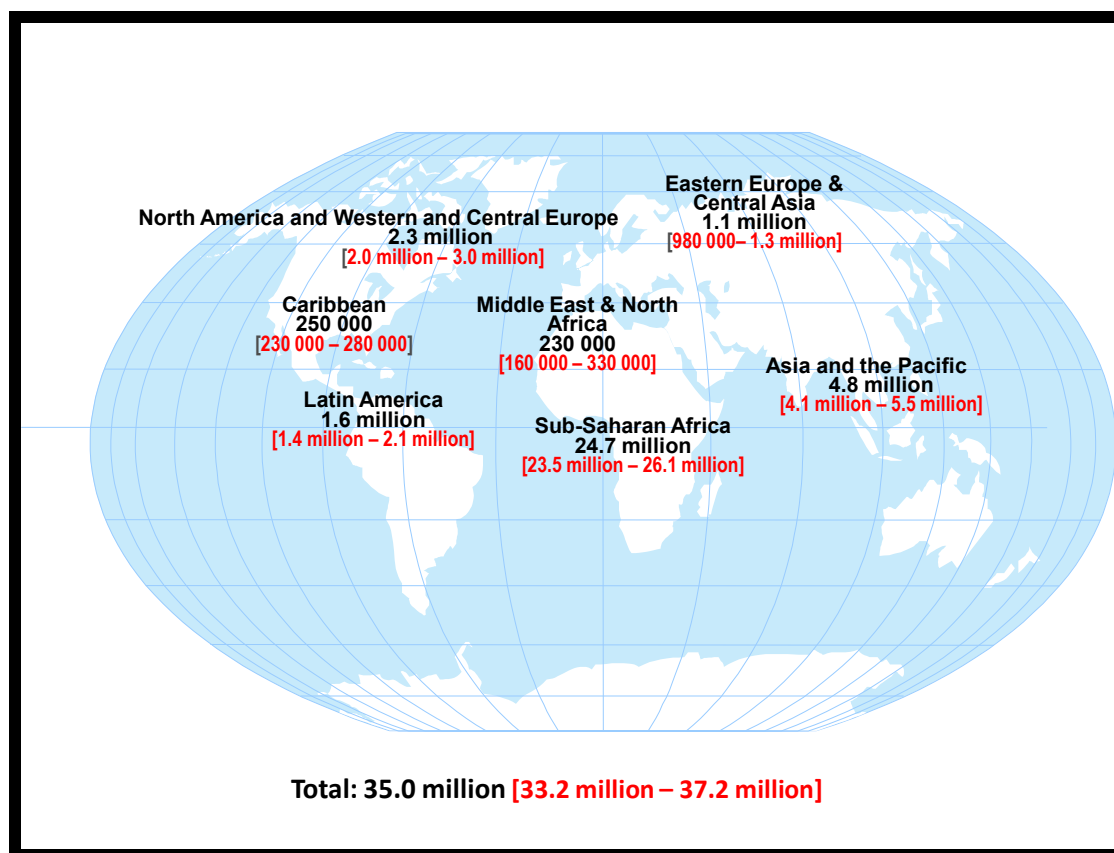
Des analyses phylogénétiques et statistiques suggèrent que l'ancêtre commun du groupe M du VIH-1 est apparu entre 1910 et 1930. L'épidémie du VIH-1 aurait donc débuté à l'époque coloniale et se serait propagée à bas bruit pendant 50 à 70 ans avant d'être identifiée [11]. L'analyse génétique des échantillons de sang et de tissus infectés recueillis par des habitants de Kinshasa en 1959 et 1960, alors appelée Léopoldville, a révélé que le VIH-1 était déjà diversifié en différents sous-types dès cette époque. Il a été également possible de retracer les voies de migration de certains sous-types du groupe M du VIH-1 et de certaines formes circulantes recombinantes (CRF) [1].

1.2 La pandémie de SIDA.

Le rapport du programme de l'ONUSIDA (Programme des Nations Unies sur le VIH et le SIDA) de 2013 révèle que 35,000,000 de personnes vivaient avec le VIH dans le monde à la fin de 2013 (Figure 1). Le nombre de personnes nouvellement infectées est à la baisse au niveau mondial. En effet, en 2012, environ 2,300,000 personnes ont été infectées par le VIH, ce qui est inférieur de 33 % par rapport au taux de 2001. L'Afrique subsaharienne reste toutefois la région la plus touchée, avec près d'un adulte sur 20 (4,7 %) vivant avec le VIH, ce qui représente 69 % du total mondial du nombre d'infections [12].

En 2013, 240,000 enfants ont été infectés par le VIH. Cela représente une baisse de 35 % depuis 2009. Les services de prévention destinés aux femmes enceintes vivant avec le VIH varient d'une région à l'autre. L'humanité s'est engagée dans un effort historique pour mettre fin aux nouvelles infections par le VIH chez les enfants et pour réduire le nombre de femmes qui meurent de causes liées à la grossesse d'ici 2015 [12]. En 2011, plus de personnes ont commencé une thérapie antirétrovirale que dans toutes les années précédentes; ainsi le nombre de personnes vivant avec le VIH (PVVIH) et recevant un traitement est en hausse de 21 % par rapport à 2010 [13]. Finalement 1,500,000 personnes sont décédées de causes liées au SIDA en 2013, ce qui représente une baisse de 35 % par rapport à 2005 [12, 13].

Figure 1. Prévalence mondiale du VIH en 2013.



Tiré de la page <http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013>. Visité le 14 août 2014. Les intervalles sont spécifiés en rouge.

Le nombre de PVVIH au Canada continue d'augmenter, on estimait ce nombre à 64,000 en 2008 et à 76,275 en 2011 (12,4 % d'augmentation). Le nombre de nouvelles infections en 2012 a été estimé à 2,062 ce qui représente une diminution de 7,8% par rapport à 2011 (2,237). Comme pour les années précédentes, c'est l'Ontario qui comptait le nombre de cas le plus élevé (843), suivi par le Québec (450), de l'Alberta (239), la Colombie-Britannique (238), et le Saskatchewan (184). Le Saskatchewan est une province relativement peu peuplée, mais celle-ci a connu une augmentation significative du nombre de cas de VIH attribués à l'utilisation de drogues par injection principalement chez les populations

Autochtones. En réponse à cette situation, le ministère de la Santé du Saskatchewan a lancé des stratégies d'intervention pour tenter d'enrayer ce phénomène [14, 15].

1.3 Le virus du VIH

1.3.1. Les types et diversités du VIH

Il existe deux types de VIH : le VIH-1 et le VIH-2; ce dernier est moins virulent, moins transmissible et limité géographiquement à l'Afrique de l'Ouest. On observe une quasi-absence de transmission verticale pour le VIH-2 [8, 16].

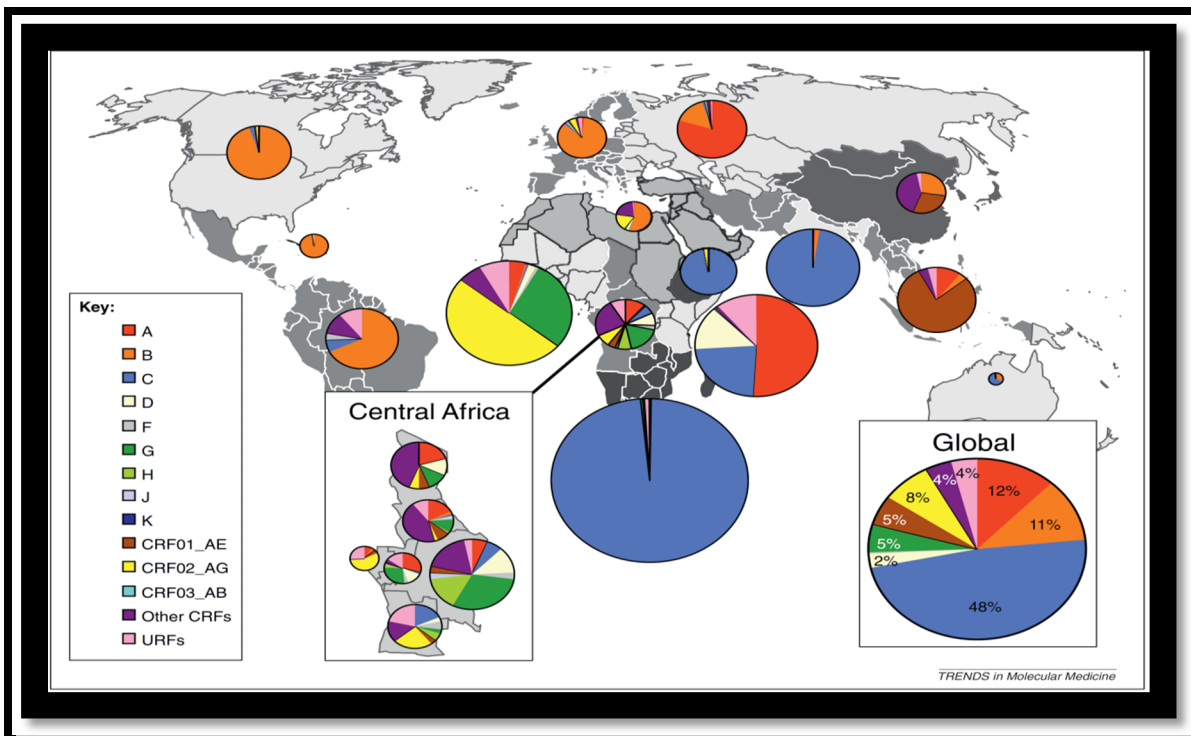
Le VIH-1 est le type le plus commun et le plus largement distribué. Il est responsable de la plupart des infections dans le monde [17]. Sa variabilité génétique est générée par l'absence de mécanismes de réparation des erreurs de la transcriptase inverse (TI), la réplication rapide du VIH-1 *in vivo*, les pressions sélectives du système immunitaire et la recombinaison lors de la réplication virale [18, 19]. En fonction de sa variabilité génétique, le VIH-1 est divisé en quatre groupes : M (« majeur »), O (« outlier »), N (« non-M, non-O »). En 2009, un isolat humain étroitement lié au virus de l'immunodéficience simienne des gorilles (VIS gor) a été isolé et attribué à un nouveau groupe, le groupe P [20]. La grande majorité (plus de 90 %) des souches de VIH-1 responsables de la pandémie mondiale de SIDA appartiennent au groupe M, qui a évolué chez les humains pour former au moins neuf sous-types génétiques, appelés clades et désignés par les lettres A, B, C, D, F, G, H, J et K. Les sous-types A et F sont aussi divisés en sous sous-types, désignés par des chiffres (A1, A2, A3, A4, F1 et F2) [16, 20, 21].

Les progrès dans le séquençage du génome complet du VIH ont conduit à l'identification de formes recombinantes (CRFs) et de formes recombinantes uniques (URFs). Celles-ci sont

le résultat d'une recombinaison entre différents sous-types au sein d'une personne surinfectée et dont les formes recombinantes sont ensuite transmises à d'autres personnes. Les descendants recombinants sont classés comme des formes recombinantes circulantes si elles ont été identifiées au moins chez trois individus qui ne partagent pas de lien épidémiologique direct; autrement, il s'agit plutôt d'une forme recombinante unique. Actuellement, 51 CFR sont décrites, les plus fréquentes étant CRF02_AG et CRF01_AE [20, 22] .

Des études d'épidémiologie moléculaire décrivent le modèle de distribution géographique des groupes et des sous-types du VIH-1 (Figure 2). Dans le groupe M, le sous-type C est principalement rencontré en Afrique orientale et Centrale, en Asie Centrale et Europe de l'Est. Il est le sous-type plus répandu au monde, responsable de 48 % de toutes les infections [23]. Le sous-type A, commun dans l'est et le centre de l'Afrique, en Asie Centrale et l'Europe de l'Est, représente 12 % des infections. Le sous-type B est le sous-type le plus répandu dans les pays industrialisés (Amérique du Nord, Europe, Asie et Australie). Il est responsable de 11 % des infections. Le sous-type D quant à lui, est limité à l'Afrique de l'Est et centrale et représente seulement 2 % des infections. Le sous-type F a été décrit en Afrique Centrale, en Amérique du Sud et en Europe de l'Est, alors que le G a été observé en Afrique Occidentale, en Afrique de l'Est ainsi qu'en Europe Centrale. Le sous-type H s'observe en Afrique Centrale, le J en Amérique Centrale et le K en République Démocratique du Congo et au Cameroun. Finalement, les groupes O, N et P sont observés au Cameroun et d'autres pays proches. Le CRF02_AG est responsable de 8 % des infections. Il est très répandu en Afrique Occidentale; le CRF01_AE prédomine dans le Sud-Est de l'Asie, et représente 5 % des infections. CRF07_BC et CRF08_BC sont répandus en Chine [16, 24].

Figure 2. Distribution mondiale du VIH-1.



Reproduit avec permission [25].

1.3.2 Généralités et structure du VIH-1.

Le virus du VIH fait partie de la famille des retroviridae, de la sous-famille lentivirinae et du genre lentivirus. La famille des retroviridae regroupe des virus définis par la présence d'un génome à ARN lequel est rétrotranscrit en ADN grâce à l'enzyme transcriptase inverse, pour ensuite s'intégrer dans le génome de la cellule hôte. Cette famille est aussi divisée en trois sous-familles sur la base des critères de pathogénicité, les Oncovirinae (Oncovirus), les Spumavirinae (Spumavirus) et les Lentivirinae (Lentivirus). Les lentivirus sont des virus cytopathiques responsables de maladies à évolution lente. [26-28].

La structure du VIH-1 est typique de la famille retroviridae. Le virion mature est de forme sphérique entouré d'une bicouche lipidique externe, dont la taille est d'environ de 120-

200 nm de diamètre [29, 30] (Figure 3). La bicouche lipidique est parsemée de trimères de protéine d'enveloppe (Env) et contient également plusieurs protéines membranaires provenant de la cellule hôte, comme les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité I et II, [31] et les protéines CD40L [32], ICAM-1[33], CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) [34] et CD 45 [35]

La capside ou core est de forme conique et renferme: deux molécules d'ARN génomique monocaténaire identiques d'environ 10 KB de polarité positive, entourées par la nucléocapside (NC) et les enzymes virales telles que la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN) [36].

Figure 3. Structure du VIH-1.

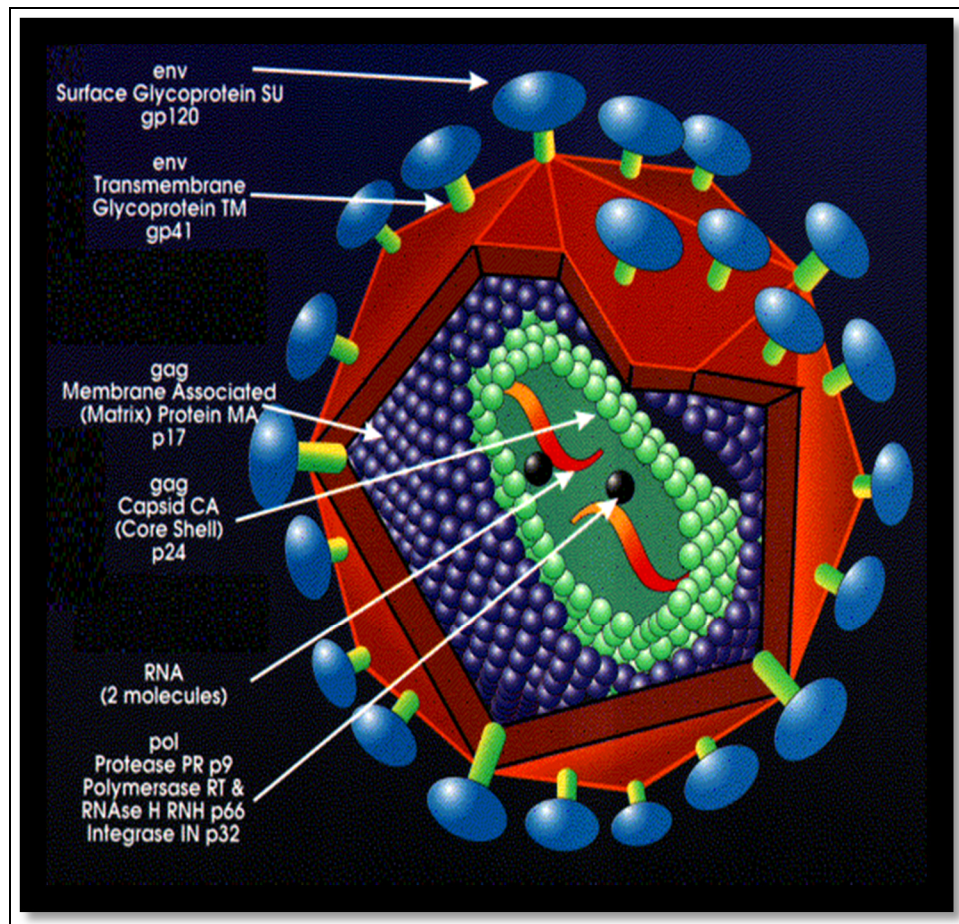


Schéma de la structure du VIH. Tiré de la page web. <http://biology.kenyon.edu/slonc/gene-web/Lentiviral/Lentivi2.html>, le 14 janvier 2013.

1.3.3 Organisation du génome du VIH-1

Le génome du VIH-1 a une longueur de 9200 pb (paires de bases), et code pour toutes les protéines structurales et non structurales communes à tous les rétrovirus (Figure 4). À l'intérieur des extrémités 5' et 3' du génome se trouvent les trois gènes, *gag* (de l'anglais group-specific antigen), *pol* (polymérase), et *env* (enveloppe). Il existe aussi des gènes accessoires ou supplémentaires (*vif*, *vpr*, *vpu*, *rev*, *tat* et *nef*) qui codent pour des protéines qui participent à la régulation du cycle viral du VIH et qui ont un rôle à jouer dans le pouvoir infectieux des virions. Le génome est encadré par deux séquences non codantes, les LTR de l'anglais long terminal repeat [37]. Ce sont des séquences promotrices répétées d'environ 640 pb de longueur et sont composées de trois régions : U3 (pour extrémité unique 3'), R (pour répété) et U5 (pour extrémité unique 5'). Les LTR 5' dirigent la transcription virale, puisqu'ils comprennent le promoteur tandis que les 3' LTR sont nécessaires à une polyadénylation efficace [37]. Ils contiennent plusieurs sites actifs reconnus par la protéine virale Tat et divers facteurs de transcription cellulaires [38]. Citons par exemple, le facteur de transcription NF-κB, le facteur activateur des lymphocytes (LEF-1), ou encore le facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NF-AT) qui modulent la transcription du VIH-1 [39].

Figure 4. Structure du génome du VIH-1.

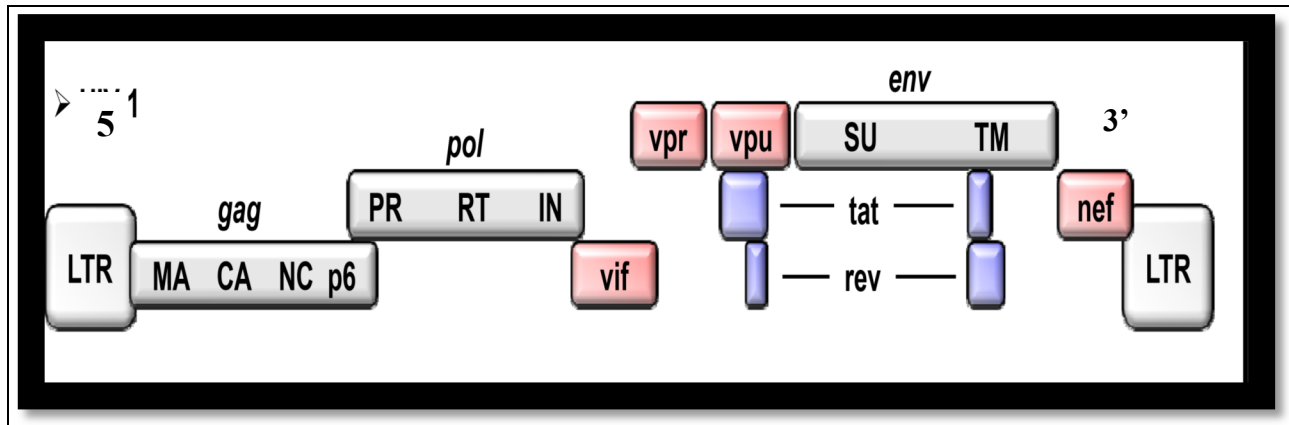


Schéma du génome du VIH-1. Reproduit avec permission de [40]

Le gène *gag* code pour le précurseur polyprotéique Pr55Gag dont le nom est basé sur son poids moléculaire [37, 41]. Le clivage de ce précurseur génère les protéines structurales incluant la capsid (p24), la matrice (p17), et la nucléocapsid ou core (p6,p7) [42]. Le gène *pol* code pour la polyprotéine Gag-Pol [43], précurseur des enzymes virales : transcriptase inverse (TI), intégrase (IN) et protéase (PR). Enfin le gène *env* code pour les glycoprotéines d'enveloppe gp 120 et gp 41 [42].

1.3.4. Les glycoprotéines d'enveloppe.

1.3.4.1. Synthèse et maturation des glycoprotéines de l'enveloppe.

Les glycoprotéines d'enveloppe (Env) sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) d'abord en un précurseur unique nommé gp160 [44]. La gp160 est ensuite clivée par des protéases cellulaires de type furine. Ce clivage donne naissance à la sous-unité de surface (SU) gp120 et à la sous-unité transmembranaire (TM) gp41 qui restent associées par des interactions non covalentes en un trimère [45]. La gp160 subit un processus de maturation

en s'insérant dans la lumière du RE pour former un oligomère [46, 47]; elle est ensuite transportée vers l'appareil de Golgi où elle sera clivée par une protéase cellulaire et générera les deux glycoprotéines d'enveloppe matures, la gp120 et la gp41. Les complexes gp120/gp41 sont transportés à travers les voies de sécrétion de la membrane plasmique et sont incorporés dans les particules virales. Dans la membrane plasmique, la plupart des complexes sont endocytosés dans des endosomes précoces et vont devenir matures dans des endosomes tardifs. Certaines protéines d'Env sont recyclées à la membrane par les endosomes de recyclage [48-53].

1.3.4.2 Structure de la glycoprotéine gp120

La gp120 est une glycoprotéine d'environ 500 aa (acides aminés) pour un poids moléculaire de 120 kD. Elle est fortement glycosylée, les hydrates de carbone représentent environ 40 % à 50 % de son poids moléculaire [54]. Elle est composée de cinq domaines conservés (C1-C5) et cinq domaines variables (V1-V5) (Figure 5). Les domaines conservés forment la base de la gp120, tandis que les domaines variables sont situés près de la surface de la molécule. Les régions V1-V4 forment des «boucles» qui sont liées au niveau de sa base par des ponts disulfures [54, 55] qui masquent les sites de liaison du récepteur CD4 et des corécepteurs CXCR4 ou CCR5. Les domaines conservés contribuent au core de la gp120 et forment des structures discontinues importantes dans les interactions avec l'ectodomaine de gp41 et les récepteurs viraux à la surface cellulaire. Les domaines variables ainsi que de nombreux sites de N-glycosylation sont situés près de la surface de la molécule. Cette glycoprotéine est responsable de l'attachement au récepteur CD4 et de l'interaction avec les corécepteurs CCR5 ou CXCR4 sur la cellule cible [56].

Figure 5. Représentation schématique de la glycoprotéine de surface gp120 du VIH-1

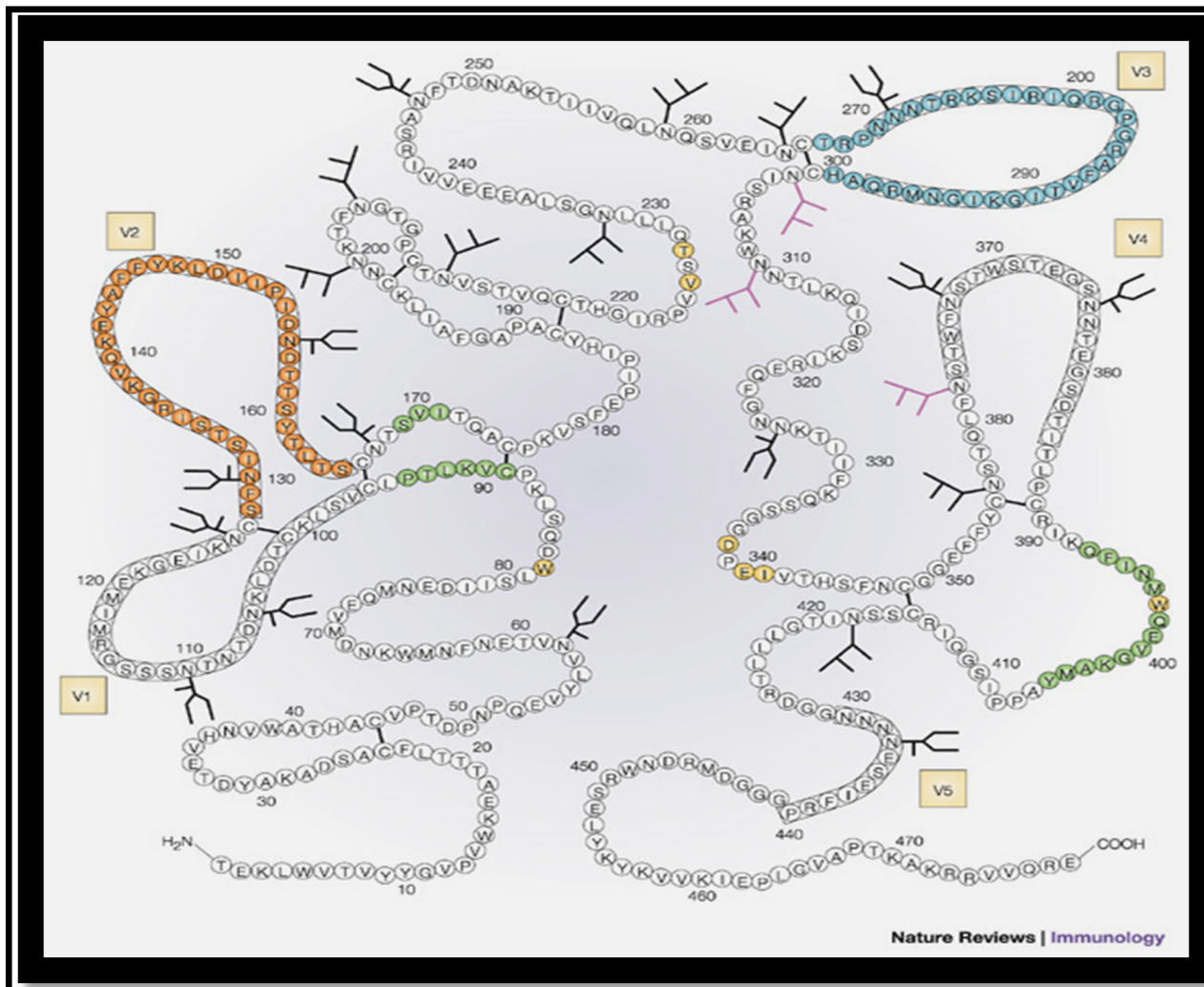


Schéma de la gp 120. Les régions conservées (C1-C5) et les boucles variables (V1V5). Reproduit avec permission [57]

La complexité de la gp120 rend la protéine difficile à cristalliser dans son intégralité, mais plusieurs structures ont été résolues sous forme de complexes CD4-gp120 ou CD4-gp120-anticorps au cours des dernières années. La première structure cristalline de la protéine gp120 du virus HXB2 a été réalisée en utilisant une forme tronquée de gp120 manquant les boucles V1, V2 et V3, en complexe avec les domaines D1 et D2 de la molécule CD4, ainsi que la région Fab de l'anticorps 17 b [58]. En 2000, la structure de l'enveloppe du virus YU2 a été déterminée [59] et en 2005 l'enveloppe du VIH-1 dans un complexe avec la molécule CD4 et un anticorps neutralisant ont permis d'élucider la structure de la boucle V3 [60].

Enfin, en comparant toutes les structures cristallographiques [58, 60-62] ainsi que des données thermodynamiques [63, 64], il a été possible d'élucider les changements de structure de la gp120 du HIV-1 [58]. De cette structure il a été déduit que dans son état natif, non lié à la molécule CD4, la gp120 contient deux régions distinctes : un domaine interne qui est impliqué dans les interactions avec gp41 et la formation des spicules d'enveloppe trimériques et un domaine externe fortement glycosylé qui forme une grande partie de la surface des spicules. Cette structure est très flexible et les boucles V1/V2 et V3 sont orientées en direction opposée (Figure 6 A) [65]. La liaison du récepteur CD4 à la gp120 induit des changements conformationnels qui conduisent à la formation du feuillet de liaison ou « *bridging sheet* » [58]. Il se compose de deux paires de feuillets β antiparallèles ($\beta 2$ - $\beta 3$ and $\beta 20$ - $\beta 21$), formés à partir de la région conservée (C4) de la gp120 et de la tige des boucles V1/V2. Il lie les domaines interne et externe et avec la boucle V3, joue un rôle majeur dans l'interaction avec les corécepteurs [65, 66]. Le domaine interne, dans son extrémité proximale contient deux hélices et cinq brins β qui participent à l'association avec la gp41 [67, 68]. De son extrémité distale émane la tige V1/V2. Elle est formée par les régions C1 et C5 et les boucles V1/V2 et est dépourvue de glycanes [58,

66]. Elle est proche des points de contact avec la gp41 et des extrémités N et C-terminales de la gp120. Le domaine externe est composé d'un feuillet à six segments encadrant une hélice et d'un feuillet à sept segments. Son extrémité proximale comprend aussi les boucles variables V4 et V5 [58].

Dans la structure cristallographique de la gp120 contenant la boucle V3 liée à la molécule CD4, la boucle V3 s'éloigne et se projette en direction de la membrane cellulaire (Figure 6 B) [60]. La structure d'une variante de la gp120 du VIH-1 avec des extrémités intactes liées au CD4 soluble et un fragment d'anticorps neutralisant [69] révèle que les parties N- et C-terminales de la gp120 se projettent du domaine interne vers la membrane virale, probablement en contactant l'ectodomaine de la gp41. Le site de fixation aux corécepteurs est formé et réorienté vers la membrane cellulaire pour faciliter l'interaction avec les corécepteurs CXCR4 ou CCR5 [97]. Le domaine externe est largement couvert par des glycanes et se trouve exposé à côté du domaine interne [69].

Figure 6. Représentation de la structure tridimensionnelle de la gp120 du VIH-1.

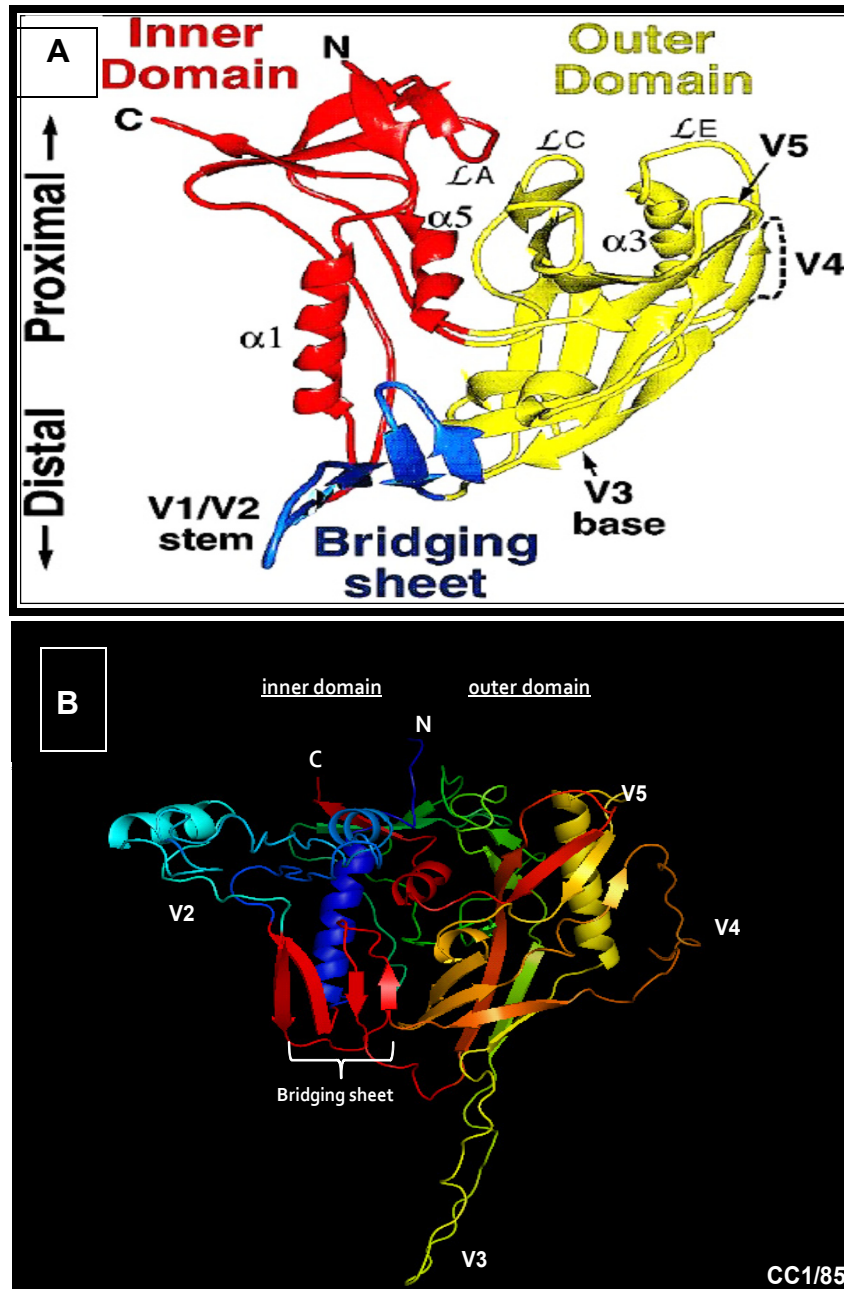
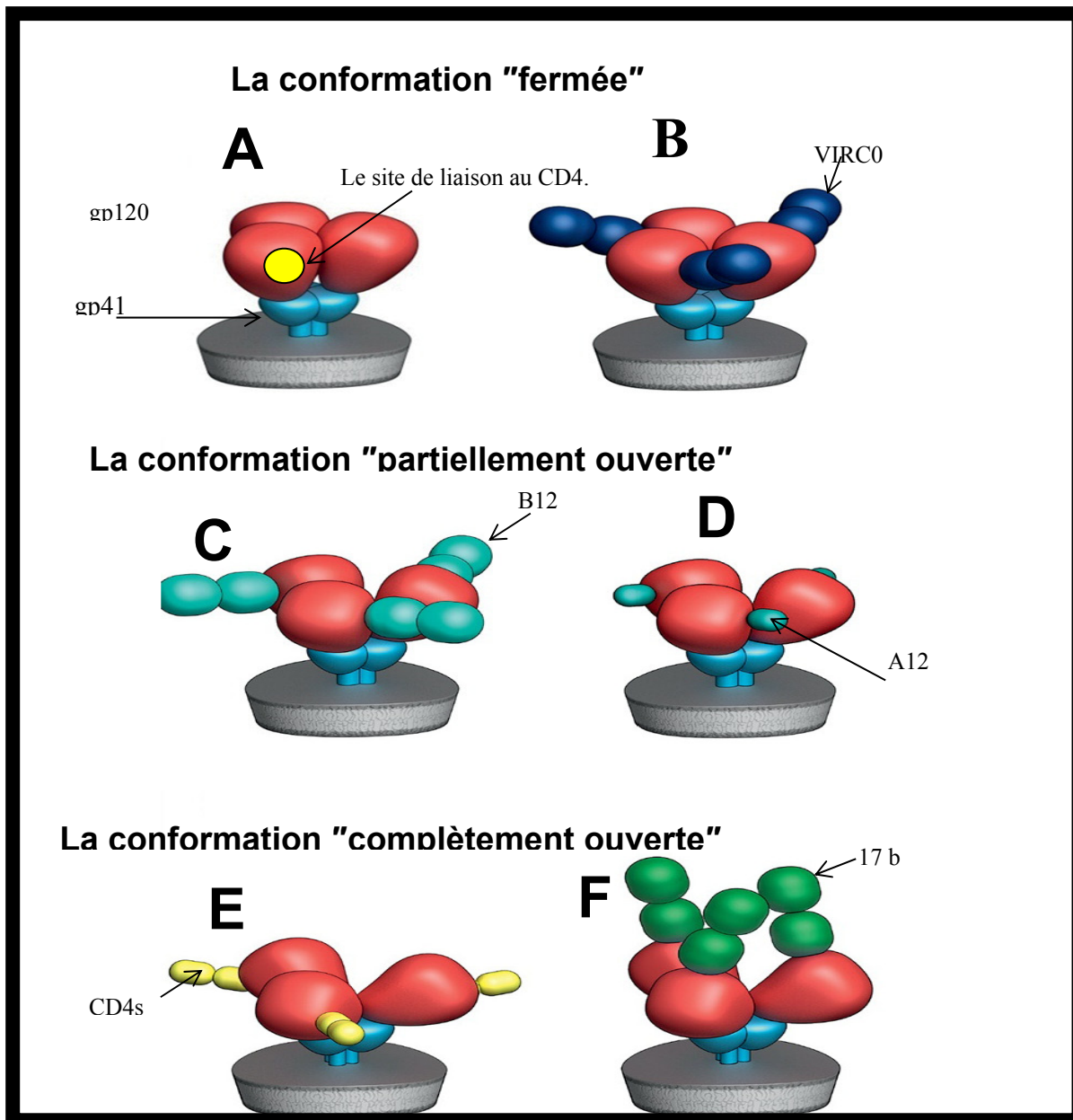


Figure A. Le domaine interne (inner) est présenté en rouge, le domaine externe (outer) en jaune et le feuillet de liaison (bridging sheet) en bleu. Reproduit avec permission [70]. Figure B. Le modèle de CCR/85 a été généré en utilisant le serveur de modélisation par homologie automatisée Swiss Model [71-73] accessible à l'adresse : <http://swissmodel.expasy.org/> et le programme Pymol [74], basé sur la structure cristalline de la souche JR-FL du HIV-1 contenant la troisième région variable complexée avec la molécule CD4 et l'anticorps X5 [60]. APB 2b4cG a été utilisé comme matrice.

Les structures moléculaires quaternaires de l'Env et les changements conformationnels qui dérivent des liaisons avec le récepteur CD4 d'une part et de nombreux anticorps monoclonaux d'autre part ont été analysés par tomographie cryoélectronique. Ces études ont identifié trois conformations quaternaires distinctes de l'Env trimérique (Figure 7). Une conformation « fermée », définie par le positionnement des boucles V1/V2 à proximité de la pointe (sommet) des spicules viraux est observée lorsque l'Env trimérique est non liée ou quand elle est liée à des anticorps neutralisants (VRC01, VRC02 et VRC03) dirigés contre le site de liaison avec le récepteur CD4 [75, 76]. Une deuxième conformation définie comme « partiellement ouverte » est observée lorsque l'Env est liée à l'anticorps b12 dirigé contre le site de liaison avec le récepteur CD4. Elle se caractérise par un léger déplacement vers l'extérieur et de la rotation des monomères de la gp120 par rapport à l'axe central de la pointe [75]. Enfin, une troisième conformation définie comme « complètement ouverte » de l'Env quaternaire comprenant d'importants réarrangements de gp120 et gp41 est observée après la liaison avec la molécule CD4 soluble et l'anticorps 17 b [75-78].

Figure 7. Représentation schématique des changements conformationnels dans la structure trimérique de l'Env.



Dans la conformation fermée, la gp120 est représentée non liée (A) et liée à l'anticorps VRC01 (B). Pour la conformation partiellement ouverte, elle est représentée liée aux anticorps B12 (C) et A12 (D). Finalement dans sa conformation complètement ouverte elle est représentée liée à la molécule CD4 soluble (E) et à l'anticorps 17 b (F). La gp120 est représentée en rouge, la gp41 en bleu et le site de liaison à CD4 en jaune. Adapté et Imprimé avec la permission de [45].

1.3.4.3 Structure de la glycoprotéine gp41

La glycoprotéine gp41 est une protéine de fusion virale de classe I. Les protéines de cette classe subissent un clivage post-traductionnel qui donne naissance à un peptide de fusion dans la partie amino-terminale. Des changements conformationnels forment alors une structure transitionnelle en forme de long faisceau ou encore en forme intermédiaire d'hélices torsadées. Après ce réarrangement, il y a formation d'un complexe à six hélices (*six-helix bundle*) dans lequel le peptide de fusion et le domaine transmembranaire se trouvent localisés à la même extrémité et sont tous deux ancrés dans la membrane cellulaire issue de la fusion [79].

La gp41 est une protéine transmembranaire complexe de 345 aa, sa masse moléculaire est de 41 kDa, elle correspond à la séquence 512-862 du gène *env* basée sur la numérotation de la souche de référence HXB2 (Figure 8). Elle est composée de trois domaines bien définis, la région extracellulaire, appelée aussi ectodomaine, le domaine transmembranaire (TM) ainsi qu'une longue queue cytoplasmique (CT) [52].

L'ectodomaine est composé d'une région hydrophobe N-terminale, le peptide de fusion (PF), une région polaire et deux régions de répétition d'heptapeptides contigus HR1 (N-terminal ou NHR) et HR2 (C-terminal ou CHR). Ces deux régions constituent la structure complexe à six hélices torsadées (coiled coils) située au milieu de l'ectodomaine HR1 et comporte l'hélice N36 responsable de la trimérisation de la protéine d'Env. Dans la structure complexe à six hélices de la gp41, chaque hélice C34 de la région HR2 se positionne de façon antiparallèle dans les sillons formés par les deux hélices N36 de la région HR1 (Figure 8) [56]. Ces régions sont impliquées dans la fusion des membranes virales et cellulaires et seront décrites dans la section sur l'entrée

du VIH-1. Une boucle hydrophile, connue aussi comme la boucle de connexion ou boucle immunodominante, formée par un pont disulfure relie les deux régions de répétition d'heptapeptides, une région riche en Trp connue sous le nom MPER (région externe membrane proximale), un domaine transmembranaire, ainsi que la queue cytoplasmique. Immédiatement après les régions de répétition d'heptapeptide HR1 et HR2 se trouve le peptide de fusion (PF) [80].

Le PF correspond aux 15 premiers aa de la gp 41. Il est riche en résidus glycine et résidus hydrophobes, et s'ancre dans la membrane cellulaire suivant l'activation des corécepteurs [81]. Il est supposé que dans l'état non fusogène de la gp41, le PF est enterré dans le complexe quaternaire gp120/gp41 et est exposé uniquement de façon transitoire pour les interactions avec la membrane de la cellule hôte après la liaison de la gp120 au récepteur CD4. L'implication du FP dans le déclenchement de la fusion de la membrane virale et de la membrane cellulaire a été confirmée par des études de mutagénèse [82-84]. Il a été proposé que le FP provoque la déstabilisation de la membrane par insertion oblique dans la membrane cellulaire, ce qui entraîne la fusion des membranes [85]. La région externe de la membrane proximale ou MPER est exceptionnellement riche en résidus tryptophane; elle présente une conformation α hélicoïdale et est composée de résidus hydrophobes hautement conservés. Cette région participe activement au regroupement de la gp41 et à la déstabilisation de l'architecture de la bicouche lipidique. Récemment, il a été démontré que le motif LWYIK hautement conservé agit comme un déterminant structurel dans la modulation des événements post-fusion. Le cholestérol de la membrane plasmique ainsi que des microdomaines de radeaux lipidiques sont essentiels pour l'entrée du VIH dans les macrophages [86] et les lymphocytes [87].

Figure 8 Schéma de la gp41 du VIH-1.

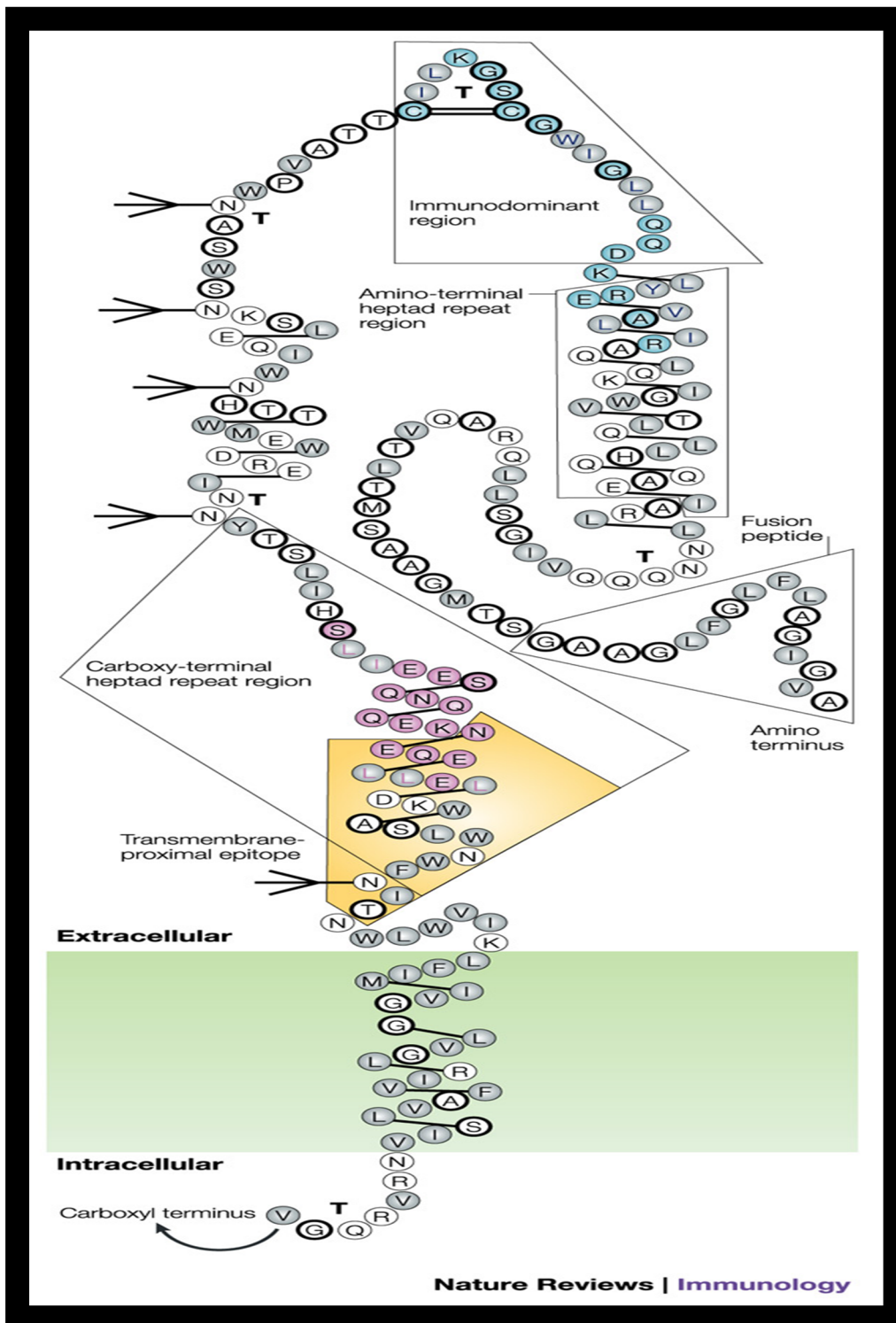
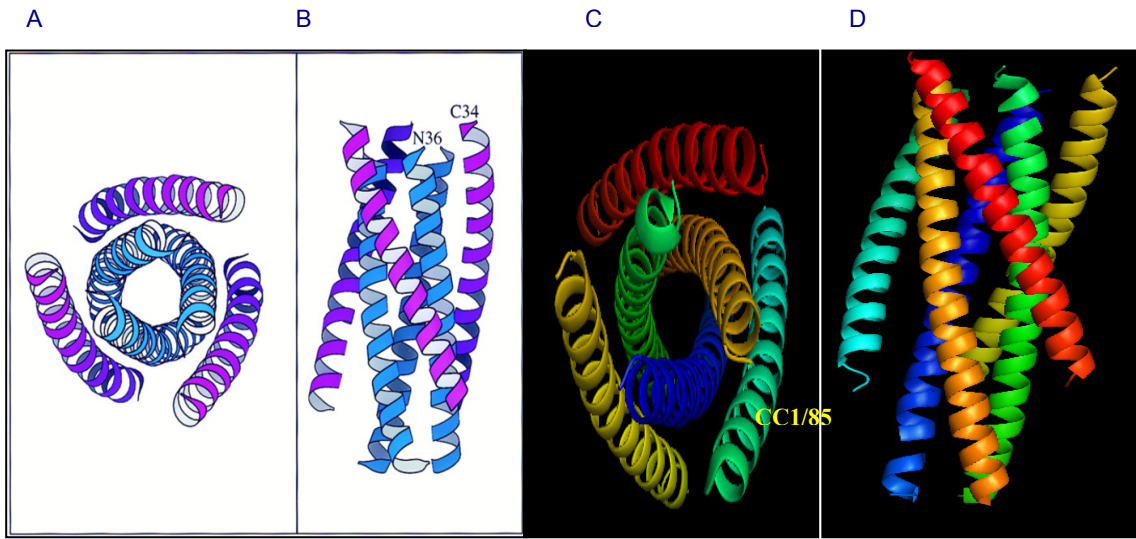


Schéma de la structure de la gp 41. Les aa hydrophobes sont indiqués par des cercles gris, les aa chargés par des cercles blancs et les aa neutres par des cercles blancs à cercle noir. Les sites potentiels de glycosylation sont représentés par des traits noirs ramifiés. Reproduit avec permission [57].

Le domaine TM est l'une des régions les plus conservées de la séquence gp41 parmi les isolats du VIH-1. Il est responsable de l'ancrage de l'Env dans la bicouche lipidique [52, 85]. Le domaine cytoplasmique CT est exceptionnellement long (150 aa) pour une protéine transmembranaire. Il est impliqué dans l'incorporation de l'Env dans le virus [88]. D'autres fonctions, comme l'interaction avec la protéine de matrice virale et des interactions avec d'autres protéines ont été décrites [85, 89, 90]. L'insertion du FP dans la membrane cellulaire conduit à la formation d'une structure en super hélice (*coiled coil*). Ce processus provoque la dissociation de la gp41 et de la gp120 puis la formation du complexe à six hélices (*six-helix bundle*), lequel est nécessaire pour la fusion de l'enveloppe virale et la membrane plasmique [85].

Figure 9. Structure du complexe des hélices N36 et C34 de gp 41.



A et B. Les hélices α du trimère central sont indiquées en bleu (HR1) et les hélices α de la région HR-2, sont indiquées en violet. Reproduit avec permission [80]. C et D. Structure du complexe N36 et C34 du virus CC1/85. Les hélices α du trimère central sont indiquées en bleu foncé, vert et orange (HR1) et les hélices α de la région HR-2, sont indiquées en rouge, bleu ciel et jaune. Vue d'en haut A et C et vue de côté C et D. Le modèle de CCR/85 a été généré grâce au serveur de modélisation par homologie automatisée Swiss Model [71-73] accessible à l'adresse : <http://swissmodel.expasy.org/> et le programme Pymol [74], APB 2b4cG a été utilisé comme matrice

1.4 L'entrée du VIH

La première étape de l'entrée du virus nécessite l'attachement des particules virales à la surface des cellules cibles. Plusieurs molécules peuvent être impliquées selon les populations cellulaires. Par exemple les protéoglycans héparans sulfates [91], les récepteurs des mannoses sont présents sur les macrophages [92], et les récepteurs dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule grabbing non-integrin (DC-SIGN) sont présents sur les cellules dendritiques et peuvent interagir avec des carbohydrates et des résidus sucrés riches en mannose de la gp120 virale [93]. Le galactosyl ceramide (GalCer) est un glycosphingolipide présent à la surface

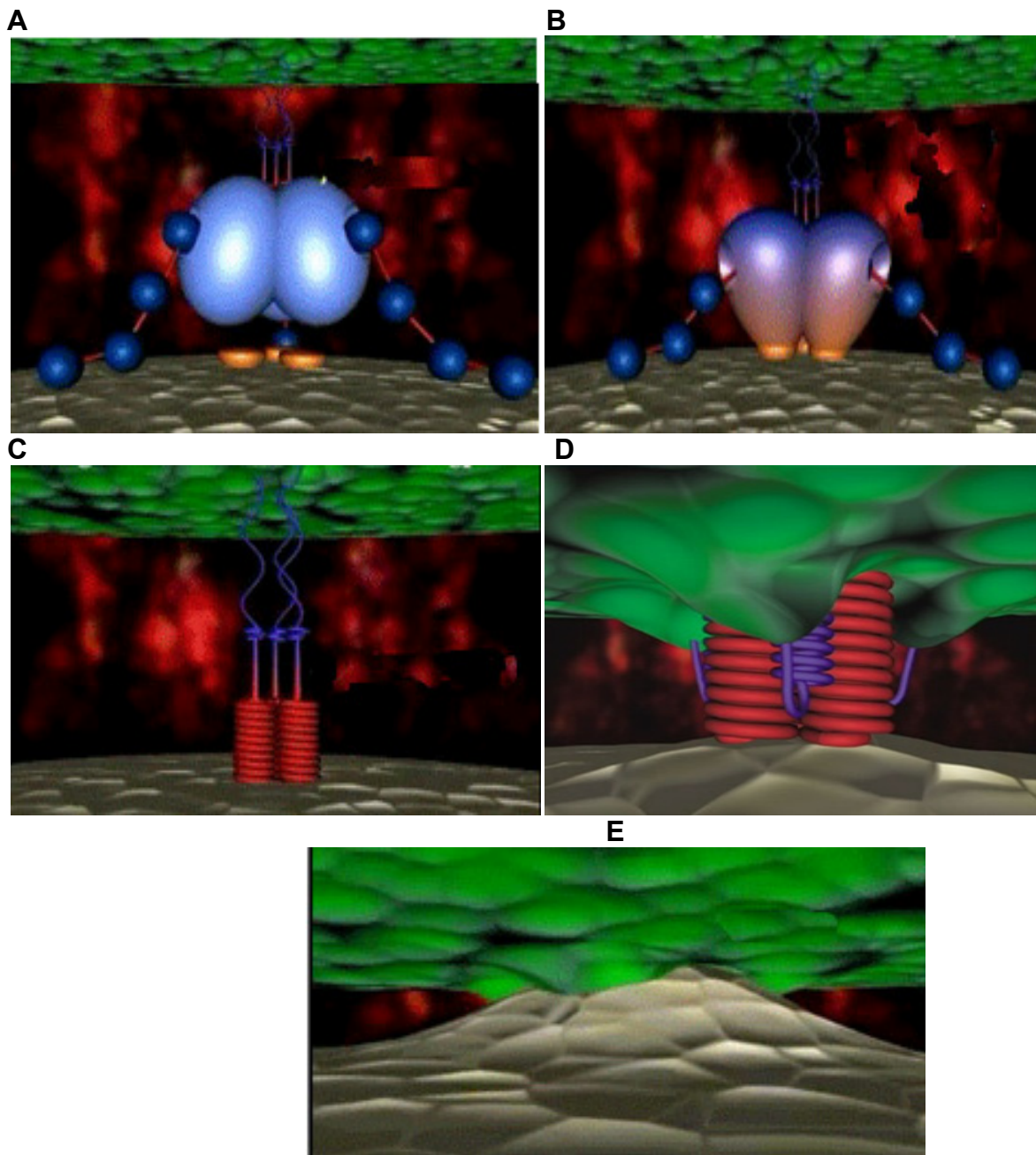
apicale des cellules épithéliales et interagit avec la gp120 et la gp41[94]. Enfin l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ est utilisée dans le cas des lymphocytes T CD4 mémoires [93]. L'attachement peut aussi avoir lieu grâce à des interactions indépendantes de la gp120. Par exemple la molécule d'adhésion intercellulaire ICAM-1 est une molécule qui est incorporée dans l'enveloppe et peut interagir avec son ligand naturel LFA-1 sur la surface des cellules cibles, principalement les lymphocytes T CD4 mémoires [95]. Le complexe VIH-1-anticorps anti-VIH peut aussi interagir avec certaines molécules membranaires comme les récepteurs pour la portion Fc des immunoglobulines (les RFc γ), particulièrement le RFc γ III présent sur la surface des cellules épithéliales, des monocytes et des macrophages [96]. L'interaction avec les récepteurs du complément des cellules cibles comme les macrophages avec des virus opsonisés par des fragments du complément a été aussi proposée comme mécanisme d'entrée [96, 97],

La deuxième étape de l'entrée du virus est la liaison de la gp120 de l'enveloppe virale à son récepteur primaire CD4 sur la surface des macrophages ou des lymphocytes T [28] (Figure 10 A). La liaison initiale de la gp120 au CD4 se produit avec une haute affinité et déclenche un changement de conformation de la gp120. Ces changements exposent les éléments structurels pour engager l'un des deux récepteurs de chimiokines, le CCR5 ou le CXCR4 (Figure 10 B) [29].

La liaison aux corécepteurs permet la formation d'un trimère de gp 41 où chaque monomère expose son PF pour l'insérer dans la membrane de la cellule cible ce qui permet d'obtenir une structure étendue. Le faisceau de six hélices est formé par la liaison antiparallèle des hélices C34 de la région HR2 et des hélices N36 de la région HR1 (Figure 10C-D) [98, 99]. Ceci favorise la juxtaposition des membranes cellulaires et virales résultant en une structure

énergétiquement stable qui facilite la fusion entre les deux membranes (Figure 10E). La formation de cette structure thermostable rapproche les membranes virales et cellulaires et conduit à leur fusion [98].

Figure 10. Entrée du VIH-1



Adapté de [30] avec la permission de Nature. Liaison de la glycoprotéine d'enveloppe virale gp120 au récepteur CD4 (A). Après la fixation, un changement de conformation se produit dans la gp120, permettant son association avec des corécepteurs cellulaires chimiokines CCR5 et/ou CXCR4 (B). Un autre changement de conformation, cette fois dans la glycoprotéine d'enveloppe virale gp41 lui permet alors d'insérer son extrémité N-terminale hydrophobe, le peptide de fusion, dans la membrane de la cellule hôte(C) . En l'absence d'un inhibiteur de fusion, le domaine HR2 hélicoïdal se replie sur lui-même et s'associe à la deuxième structure hélicoïdale, le domaine HR1 (D.). Ce processus conduit à la fusion des membranes cellulaires et virales et, par conséquent à l'infection de la cellule cible (E).

1.4.1 Les interactions de CD4 avec la glycoprotéine gp120

La molécule CD4 est une glycoprotéine de surface exprimée sur les lymphocytes T CD4+, les cellules régulatrices T, les monocytes, les macrophages ainsi que sur certaines cellules dendritiques. Elle est composée de trois régions: la région extracellulaire, la région transmembranaire et la queue cytoplasmique. La région extracellulaire est composée de 4 domaines nommés de D1 à D4. Le domaine D1 est constitué de trois sous domaines, CDR1, CDR2 et CDR3. La phénylalanine en position 43 (Phe43), l'arginine 59 (Arg59) ainsi que d'autres résidus de charge positive de CDR2 sont essentiels à la liaison du récepteur CD4 avec la gp120. Le récepteur CD4 stabilise la liaison du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) par son attachement au domaine β_2 du CMH II. [58, 100, 101]. Une liaison entre la molécule CD4 et la protéine gp120 se crée au niveau de la boucle de liaison du CD4 ou "CD4 binding loop" située dans une dépression formée à l'interface des domaines externe et interne avec le "feuillet de liaison" ou "bridging sheet" de la gp120 qui se forme de façon stable après la liaison avec la molécule CD4 [58, 102]. La liaison de CD4 initie une séquence de réarrangements structuraux dans l'Env qui révèle le site de liaison aux corécepteurs (Figure 10 B). Dans un premier temps la liaison de CD4 induit le mouvement de la tige V1/V2 de l'axe central de symétrie en direction de la face latérale du trimère. Cela conduit à un réarrangement de la boucle V3 et conséquemment à l'exposition d'une partie du site de liaison aux corécepteurs. Par ailleurs, le dépassement de la tige de V3 vers l'extrémité distale du trimère permet le rapprochement la membrane virale à la membrane de la cellule cible. Dans un second temps, le feuillet de liaison est formé en amenant ensemble quatre feuillets β antiparallèles, deux provenant du domaine interne et deux du domaine externe de la gp120. Pour finir, le CD4 induit un mouvement de la gp120 pour provoquer une rotation vers l'extérieur

de chaque monomère gp120 ce qui révèle partiellement la tige de la gp41 [103]. Un modèle récent suggère que les interactions CD4-gp120 font en sorte que la molécule CD4 se replie comme une charnière entre ses deuxième et troisième domaines de type immunoglobuline. Ce repli rapproche grandement les membranes virales et cellulaires et contribue à limiter d'avantage l'exposition du site de liaison des corécepteurs aux anticorps [75]. Tous ces réarrangements conduisent à l'accessibilité du site de liaison aux corécepteurs [103].

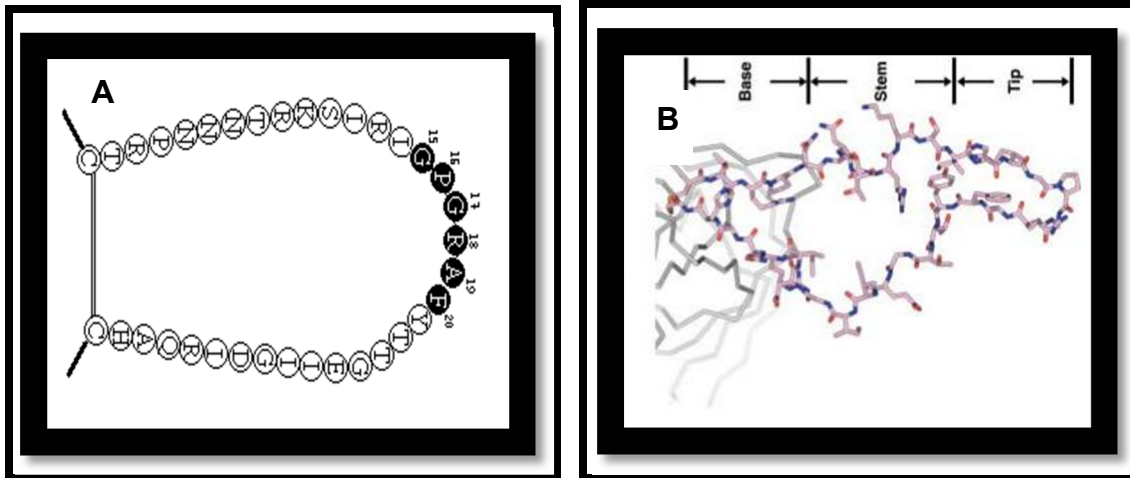
1.4.2 Les interactions de la gp120 avec les corécepteurs

Bien que le VIH-1 puisse utiliser plusieurs récepteurs pour l'entrée cellulaire dans des modèles *in vitro*, seulement deux récepteurs de chimiokines sont importants pour l'entrée *in vivo*: le récepteur CXCR4 (initialement désigné fusine) et le récepteur CCR5. Ce sont tous deux des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à la protéine G. Chacun dispose d'une extrémité N-terminale extracellulaire, trois boucles extracellulaires (LCE), trois boucles intracellulaires et une queue cytoplasmique C-terminale [103]. Ces structures seront décrites plus en détail dans le chapitre suivant.

Comme décrit au paragraphe précédent, l'exposition des sites de liaison aux corécepteurs commence avec la liaison du CD4 et l'induction d'un mouvement des boucles V1/V2 pour exposer la boucle V3. La boucle V3 est fortement glycosillée et hypervariable, mais possède un motif conservé Glycine-Proline-Glycine à son sommet. Elle est constituée en moyenne de 35 aa (Figure 11 A) et sa composition varie selon les isolats viraux. Sa structure peut être subdivisée en trois régions: une base conservée qui fait partie du domaine externe, une tige flexible qui s'étend loin du reste de la protéine et une couronne dont le sommet (apex) est en forme

d'épingle à cheveux (Figure 11 B). Elle forme une boucle grâce à un pont disulfure entre les cystéines aux positions 296 et 331.

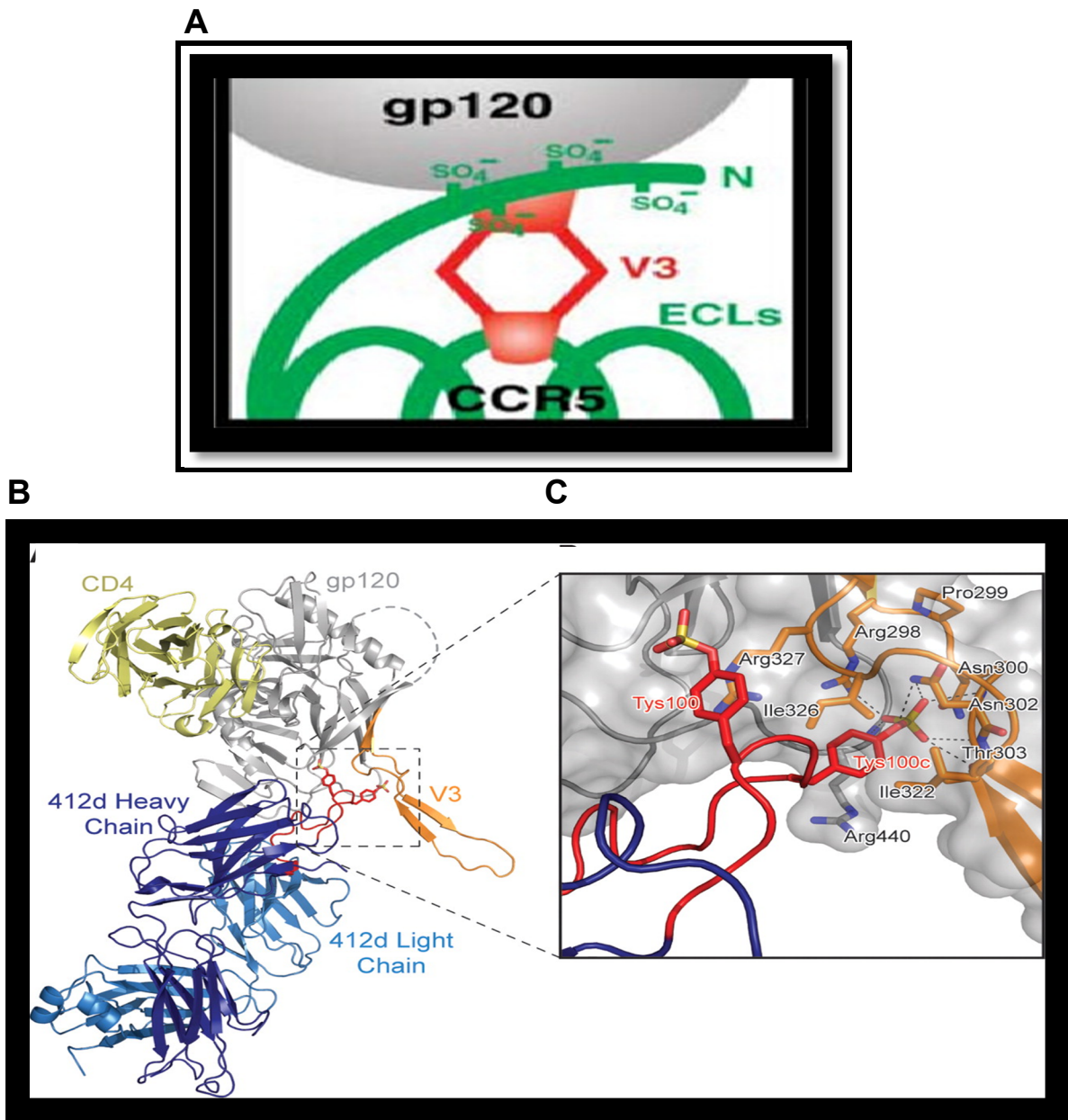
Figure 11. Structure de la boucle V3



A. Séquence consensus des aa de la boucle V3. B. Structure tertiaire de la boucle V3 montrant ses trois régions structurales, la base (base), la tige (steam) et couronne donc l'apex (tip) est en forme d'épingle à cheveux . Reproduit avec permission [60].

Un modèle d'interaction de la glycoprotéine gp120 avec le corécepteur CCR5 a été proposé grâce au cœur de la structure spatiale de la gp120 comprenant la boucle V3 liée à la molécule CD4 ainsi qu'à l'anticorps neutralisant X5 (dont le rôle est de relier l'épitope CD4i (CD4 induit). L'apex de la boucle V3 est dirigé vers la membrane de la cellule cible , il dépasse de 30 Å la base de la gp120 permettant à la boucle V3 d'agir comme un « crochet moléculaire » et de lier la partie ECL2 de CCR5 ainsi que les régions conservées du feuillet de liaison (*bridging sheet*. La tige et la base de V3 vont interagir avec les tyrosines sulfatées de la partie N-terminale de CCR5 (Figure 12 A) [60]. L'extrémité N-terminale de CCR5 comporte quatre résidus sulfotyrosines aux positions 3, 10, 14, et 15; le résidu en position 15 étant le seul indispensable. Cette extrémité comprend aussi des résidus acides qui facilitent la liaison aux sites de l'Env chargés négativement (Figure 12 B-C) [103].

Figure 12. Modèle d'interaction de la boucle V3 avec le corécepteur CCR5



L'apex de la boucle V3 est lié la partie ECL2 de CCR5 ainsi que les régions conservées du feuillet de liaison (*bridging sheet*). La tige et la base de V3 vont interagir avec les tyrosines sulfatées de la partie N-terminale de CCR5. Reproduit avec permission [60]. B. Les interactions de la boucle V3 de la gp120 (sa) avec la partie N terminale du corécepteur CCR5 (violet) C. Détail de ces interactions; un code couleur est indiqué, en saumon, les atomes de carbone; en rouge, les atomes d'oxygène; en bleu foncé, les atomes d'azote et en orange, les ponts disulfures. Reproduit avec permission [104].

1.4.3 Différents mécanismes d'entrée du VIH dans la cellule

1.4.3.1 Entrée du VIH par endocytose

Le phénomène d'endocytose est caractérisé par l'internalisation des molécules de la surface de la cellule vers des compartiments intracellulaires. Elle peut s'effectuer grâce à plusieurs mécanismes : la phagocytose, la pinocytose et l'endocytose médiée par récepteurs. Ces voies diffèrent au niveau de plusieurs propriétés telles que la taille vésiculaire et les mécanismes de régulation [105].

La phagocytose est un mécanisme qui permet l'ingestion de particules solides de diamètre supérieur ou égal à 5 μm , telles que des bactéries, des parasites, des champignons, des corps étrangers, des cellules tumorales ou encore des corps apoptotiques à éliminer de l'organisme. Ce moyen de défense de notre système immunitaire est non spécifique. La phagocytose implique la reconnaissance et la liaison des particules par des récepteurs comme le récepteur aux fragments Fc des immunoglobulines et le récepteur du complément CR3i. Elle est exécutée par des phagocytes professionnels tels que les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques. Le processus se déroule en trois étapes : l'adhésion, l'ingestion puis la digestion du matériel phagocyté. La phagocytose est une première ligne de défense de notre organisme contre les infections et joue également un rôle clé dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative par la libération de cytokines pro-inflammatoires ce qui a pour conséquence d'attirer d'autres cellules nécessaires à la réponse immunitaire [106].

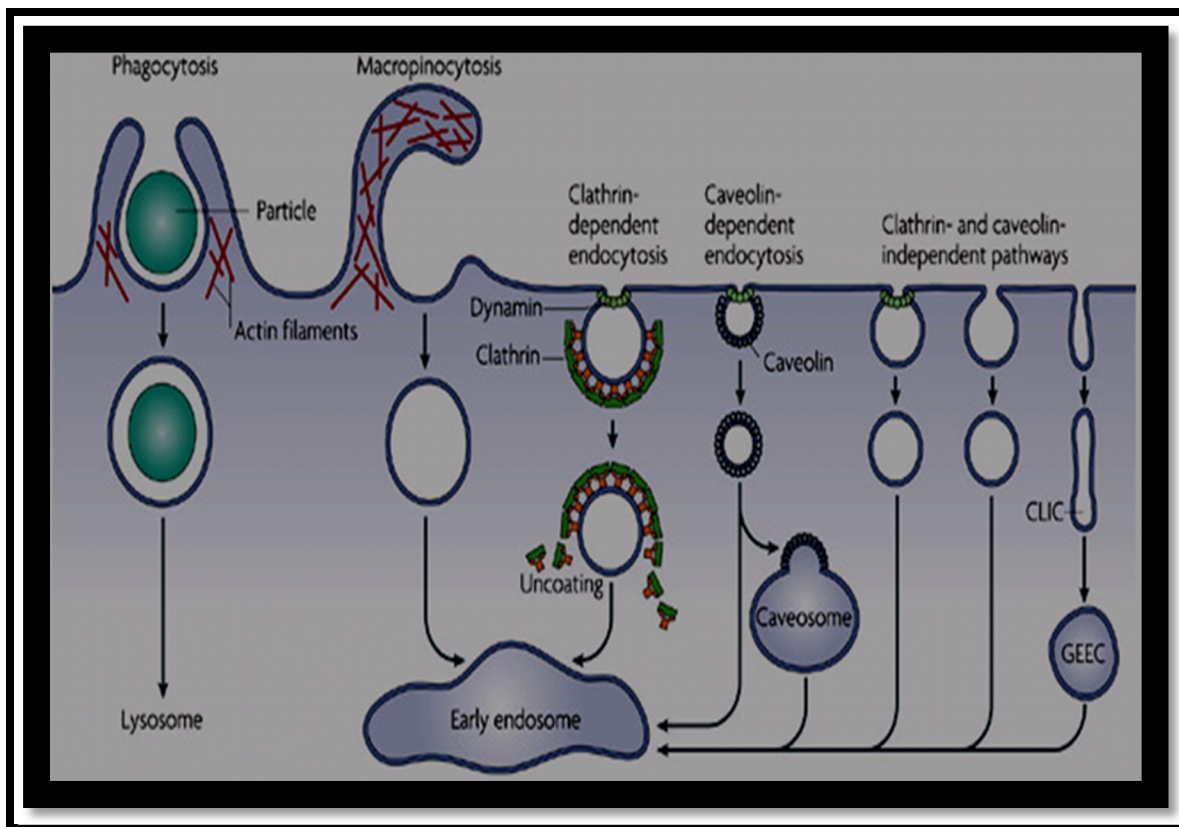
La pinocytose est un processus par lequel les cellules internalisent de grandes quantités de liquides extracellulaire. Elle ne requiert pas la présence de récepteurs cellulaires [107]. Figure

13. La pinocytose est divisée en micropinocytose et macropinocytose. La taille des vésicules lors de la micropinocytose est inférieure à $0.1\mu\text{m}$ et dans le cas de la macropinocytose est supérieure à $0.2\mu\text{m}$ [108]. La macropinocytose est un processus dépendant de l'actine à partir de laquelle se forment des invaginations de la membrane qui donnent lieu à de grandes vacuoles appelés macropinosomes. La macropinocytose est importante dans de nombreux processus physiologiques. C'est un mécanisme très actif dans les macrophages et les cellules dendritiques où il est une voie majeure pour la capture d'antigènes. Une fois formés, les macropinosomes subissent un processus de maturation, puis de fusion avec les lysosomes et finalement de fusion avec la membrane plasmique afin de recycler leur contenu à l'extérieur de la cellule [109].

Deux voies principales d'endocytose médiée par récepteurs ont été identifiées: la voie classique qui est une endocytose médiée par la clathrine et la voie non classique qui est indépendante de la clathrine, laquelle est associée à des radeaux lipidiques [110]. L'endocytose médiée par la clathrine est le mécanisme le mieux caractérisé. Au cours de ce processus, des récepteurs spécifiques sont reconnus par la protéine adaptatrice 2, cela provoque la polymérisation de la clathrine et la formation d'une vésicule contenant le récepteur de façon interne. Lors de l'étape suivante, la dynamine provoque la scission de la vésicule de la membrane cellulaire. Lorsque le pH de la vésicule commence à s'acidifier, la clathrine est retirée et le récepteur est recyclé vers la membrane. Les endosomes vont fusionner avec le lysosome permettant l'hydrolyse complète du matériel endocyté.

L'endocytose dépendante de la clathrine est importante dans le transport intracellulaire des protéines extracellulaires et des protéines plasmatiques. Elle est également importante pour le trafic intracellulaire au niveau du réseau trans-Golgi et les endosomes [111]. L'endocytose indépendante de la clathrine est impliquée dans plusieurs processus biologiques, y compris la médiation de l'entrée du virus dans les cellules hôtes, l'internalisation des protéines ancrées par glycophosphatidyl inositol et la régulation de certaines cascades de signalisation [112]. Parmi l'endocytose indépendante de la clathrine, l'endocytose médiée par cavéoles et une de plus importantes [113-115].

Figure 13. L'entrée par Endocytose.



L'ingestion de grosses particules est faite par phagocytose, alors que l'ingestion des fluides se produit par pinocytose. Reproduit avec permission [107].

Plusieurs études ont démontré que le VIH-1 utilise l'endocytose pour entrer dans certains types cellulaires, par exemple les lymphocytes T CD4, les monocytes, les macrophages [116, 117] ou encore les cellules dendritiques [118].

Le VIH-1 utilise deux mécanismes d'endocytose pour pénétrer dans les lymphocytes T CD4 l'endocytose médiée par clathrine et l'endocytose médiée par cavéoles [119]. La queue cytoplasmique du récepteur CD4 contient un motif dileucine, qui est un signal utilisé par le mécanisme d'endocytose médiée par clathrine [120-122]. Le blocage de l'acidification des endosomes peut augmenter l'infection par le VIH-1 en empêchant la dégradation du virus dans les lysosomes [123]. L'inhibition de l'endocytose médiée par la clathrine réduit l'efficacité de la fusion entre les cellules et le VIH et par conséquent l'infection cellulaire [117]. Concernant les macrophages, le mécanisme utilisé est la macropinocytose [116, 117], lors duquel les virions sont absorbés dans des vésicules en même temps que de grandes quantités de liquide extracellulaire. Les cellules dendritiques quant à elles internalisent le VIH-1 en utilisant la molécule DC-SIGN. Ce récepteur agit en tant que molécule d'adhésion pour le déclenchement de l'endocytose. La queue intracytoplasmique contient deux motifs d'internalisation: le site de liaison consensus YXX et une molécule adaptatrice qui déclenche l'internalisation des motifs dileucine et les vésicules endosomales conduisant à la dégradation par le lysosome [118].

1.4.3.2 L'entrée du VIH par le transfert de cellule à cellule

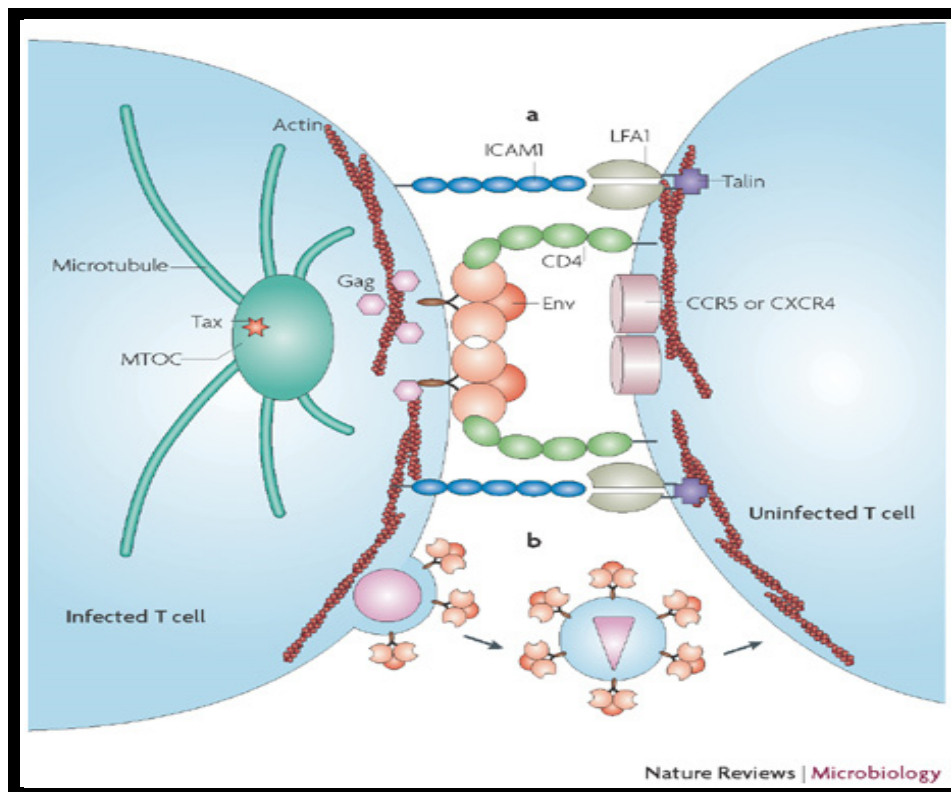
Les rétrovirus sont capables d'utiliser des synapses immunologiques existantes pour se propager directement de cellule à cellule. Ils peuvent également favoriser l'adhérence entre les cellules infectées et non infectées qui normalement ne forment pas de contacts synaptiques. [124]. En réponse aux antigènes appropriés présentés par une cellule présentatrice d'antigène (CPA), les cellules T se polarisent, formant une structure à l'interface de la cellule T et de la CPA dénommée synapse immunologique (SI). Les récepteurs membranaires et les molécules de signalisation s'assemblent en une structure bien définie appelée le SMAC pour « Supra Molecular Activation Cluster » qui est divisé en trois zones concentriques différenciées, la zone centrale appelée cSMAC pour « central supra molecular activation cluster », la zone périphérique pSMAC pour « peripheral supra molecular activation cluster » et la zone distale dSMAC pour « distal supra molecular activation cluster » [125]. Le cSMAC englobe du côté de la cellule T, le récepteur des cellules T (TCR)/CD3 qui est associé à des récepteurs de co-stimulation (CD28), aux tyrosines kinases (Lck et ZAP-70), sérine kinases [protéine kinase C (PKC θ)] et les molécules adaptatrices (LAT, SLP76). Du côté de la cellule présentatrice d'antigènes le cSMAC expose le peptide présenté dans le contexte du MHC. Le pSMAC comprend des molécules d'adhésion, telles que LFA-1 et ICAM-1, ainsi que des protéines du cytosquelette telles que l'actine et la taline de chaque côté de la synapse [126]. Enfin, le pSMAC inclut des protéines de membranes composées de grands ectodomaines comme le CD43 et le CD45 [125].

Les récepteurs de chimiokines CXCR4 et CCR5 sont recrutés et s'accumulent à la SI par un mécanisme de signalisation du récepteur de chimiokines *via* une voie indépendante G α_i . Le recrutement des ces récepteurs résulte en l'attraction plus forte des cellules T et des CPA, la

réduction de la sensibilité des cellules T à des gradients chimiotactiques, et des niveaux plus élevés de prolifération des lymphocytes T et de production d'IFN [127].

La propagation directe de cellule à cellule du VIH-1 prend essentiellement place grâce à des structures de contact induites spécialisées appelées synapses virologiques (SV) qui agissent comme des points chauds ou «hot spots» de la transmission du virus (Figure 14). La SV a été nommée ainsi en raison de leur ressemblance avec la SI. Le terme SV a été créé pour décrire une architecture de récepteur membranaire spécifique qui évolue suite à un contact intime entre un lymphocyte T infecté par le VIH-1 et une cellule T cible non infectée. La propagation de cellule à cellule du VIH-1 au niveau des synapses est une caractéristique généralisée de la diffusion virale. La SV a été décrite entre les lymphocytes T CD4 infectés et non infectés, entre les macrophages et cellules T CD4 infectés et entre les cellules dendritiques exposées aux virus et cellules T CD4 [128].

Figure 14. La synapse virologique.



Reproduit avec permission de [129]. À l'interface entre les cellules T infectée et non infectée, la protéine d'enveloppe sur la cellule effectrice et le CD4 et les corécepteurs sur la cellule cible sont recrutés et concentrés.

En plus des mécanismes synaptiques, la propagation virale de cellule à cellule peut avoir lieu par des mécanismes alternatifs grâce à des filopodes ou des nanotubes [130-132]. Les filopodes sont des extensions de la membrane plasmique soutenues par des filaments d'actine. Ils sont minces (0,1-0,3 μm) et en présentent une forme de doigt [131]. Le VIH-1 peut être unidirectionnellement transporté à la surface de ces structures et les utiliser pour sa transmission de cellule à cellule et sa diffusion [124]. Leur rôle est important dans plusieurs processus cellulaires, y compris la chemomigration, la croissance des cônes nerveux et la formation de contacts cellule-cellule lors de la cicatrisation [131].

La transmission intercellulaire du VIH-1 entre les cellules T a également été observée le long de projections cellulaires appelés nanotubes membranaires. Ces nanotubes diffèrent des filopodes dans leur formation qui semble passive et peuvent être jusqu'à 10 fois plus long. [132].

L'effet des inhibiteurs d'entrée sur l'entrée du VIH-1 par endocytose est un sujet très controversé. Les agents qui bloquent la liaison du virus aux cellules T CD4+, comme par exemple les anticorps monoclonaux anti-CD4+ et la protéine recombinante CD4-IgG2, empêchent le transfert de virus de cellules infectées à des cellules non infectées [133, 134]. Inversement, des agents peuvent cibler une étape ultérieure dans le cycle viral, par exemple l'interaction gp120-CD4 par BMS-806, des antagonistes du corécepteur, des anticorps neutralisants, ou même des inhibiteurs de la transcriptase inverse, ne bloquent pas le transfert du VIH-1 aux compartiments intracellulaires des cellules CD4+ T cibles [134, 135]. L'inhibiteur de fusion enfuvirtide ne présente aucun effet mesurable sur le transfert par la synapse virologique, ce qui suggère que l'absorption du virus dans les cellules cibles ne déclenche pas obligatoirement la fusion des membranes cellulaires et virales [134]. Il a été démontré que les inhibiteurs de CCR5 inhibent la formation de syncytia entre une cellule CD4+ infectée et une cellule CD4+ non infectée, ce qui a été proposé comme une des causes de perte des lymphocytes T CD4+ chez des patients infectés) [109]. Dans un modèle *in vitro* utilisant des cellules dérivées de tumeurs trophoblastiques, BeWo, les inhibiteurs de CCR5, TAK779 et SCH-350581 bloquent efficacement le transfert de virus R5 à travers la monocouche BeWo. Toutefois, ils sont moins efficaces pour bloquer la transmission d'un virus libre à une cellule non infectée [106].

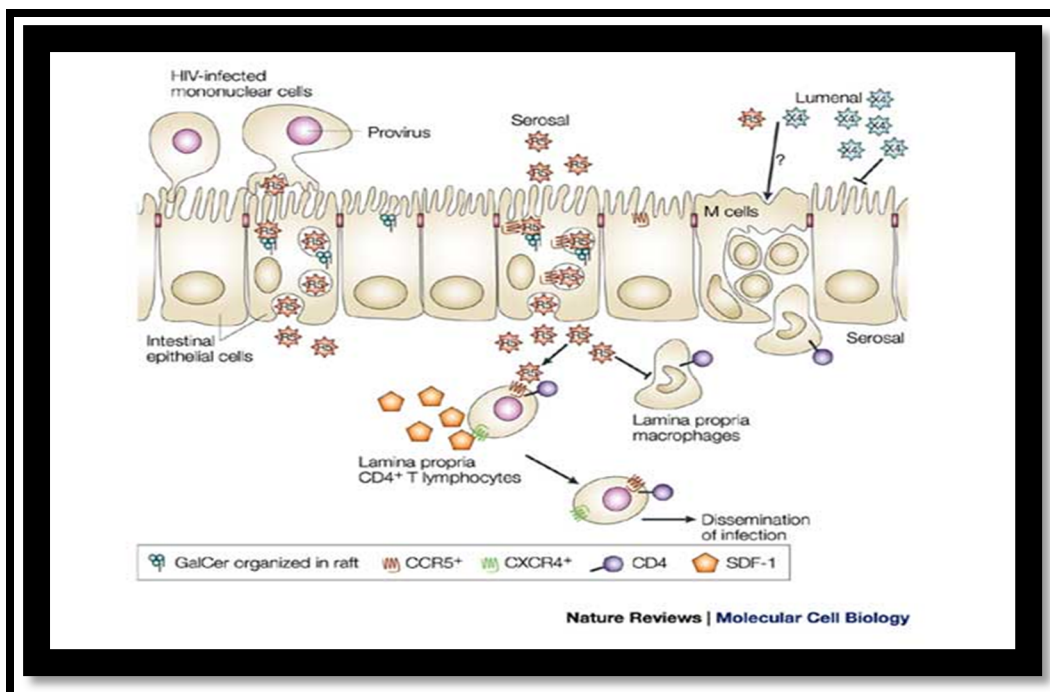
1.4.3.3 L'entrée du VIH par transcytose.

Le VIH-1 a également la possibilité de passer d'un environnement à l'autre par transcytose (Figure 15) [136]. La transcytose est un mécanisme de transport cellulaire qui permet au virus de transiter du côté apical d'une cellule polarisée vers son côté basal. Une des caractéristiques de la transcytose est que le passager transcytosé reste dans des vésicules entourées d'une membrane qui empêche tout contact avec le cytosol de la cellule traversée. Le passager n'est pas modifié par son transit transcellulaire et ressort intact au pôle opposé de son entrée [8].

En l'absence de perturbations dans la muqueuse provoquées par des traumatismes, les voies d'entrée du VIH-1 dans la lamina propria sont les cellules épithéliales, cellules M ainsi que les cellules dendritiques. Les cellules épithéliales forment une monocouche de cellules connectées de manière hermétique par des jonctions serrées. La structure formée est étanche aux macromolécules, cellules ou pathogènes, entre la lumière de la muqueuse et le milieu intérieur. Les cellules M (pour l'anglais microfolds) sont présentes dans l'intestin grêle et le rectum, mais pas dans la muqueuse génitale [137]. Ces cellules présentent morphologiquement une absence de bordure en brosse dans leur membrane apicale, ainsi qu'une très petite distance entre les pôles muqueux ou apical faisant face à la lumière de la muqueuse. La membrane basolatérale fait face au milieu intérieur, elle est convexe et forme une structure similaire à une poche dans laquelle viennent se loger des lymphocytes T CD4⁺ et des macrophages. La transcytose permet aux particules virales de se déplacer dans des environnements riches en cellules immunitaires comme les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes T CD4 effecteurs [138-140].

Dans l'intestin grêle, les cellules épithéliales CCR5+ endocytent les virus R5 libres à la surface luminale par un mécanisme médié par le récepteur CCR5 ou récepteur galactosyl céramide qui est présent dans des microdomaines des radeaux lipidiques. Les cellules épithéliales n'expriment pas le CXCR4, ce qui expliquerait en partie la transmission préférentielle des souches R5 à travers les couches épithéliales lors de la transmission de l'infection au niveau des muqueuses. Le VIH-1 transporté à travers la barrière épithéliale jusqu'à la lamina propria peut infecter les cellules cibles incluant les lymphocytes T CD4+, les macrophages et les cellules dendritiques ce qui facilite la dissémination de l'infection [141].

Figure 15 L'infection des cellules épithéliales par le VIH



Reproduit avec permission [141]

1.5 Chimiokines et récepteurs de chimiokines.

Les chimiokines sont constituées d'environ 50 peptides. À ce jour 20 récepteurs ont été identifiés chez l'homme [142]. Les chimiokines sont des cytokines chimiotactiques (~ 8-14 kDa) impliquées dans divers processus : la migration des cellules immunitaires inflammatoires du système vasculaire vers le site d'inflammation, la phagocytose, la sécrétion de cytokines ainsi que l'activation des cellules et la prolifération [143-145]. Elles ont une homologie de séquence nucléotidiques de 20% à 95%. Traditionnellement, elles ont été regroupées en quatre sous-familles, CXC (chimiokines α), CC (chimiokines β), CX3C (chimiokines δ) et C (chimiokines γ), selon la position des deux premières cystéines trouvées proche de l'extrémité NH₂. [144, 146, 147].

Les CC chimiokines constituent la plus grande sous-famille avec 28 chimiokines identifiées à partir d'espèces de mammifères [148, 149]. Elles médient la chimiotaxie des cellules mononucléaires. Chez les neutrophiles le signal chimiotactique est assuré par les chimiokines CXC [149]. Les CC chimiokines recrutent les cellules sanguines comme les monocytes et les lymphocytes. Elles sont impliquées dans la régulation de l'angiogenèse, le remodelage vasculaire ainsi que dans le trafic cellulaire [147].

Une autre classification générale des chimiokines est basée sur des critères fonctionnels: les chimiokines inflammatoires sont exprimées par des leucocytes circulants et d'autres cellules lors de l'activation, alors que les chimiokines homéostatiques sont constitutivement exprimées. Cependant, certaines chimiokines se répartissent dans les deux catégories en fonction du contexte biologique ou d'un état pathologique [150].

Toutes les chimiokines ont une structure similaire, malgré leur diversité génomique [151]. Elles possèdent quatre résidus cystéine conservés liés par des liaisons disulfure.. Il y a une apparente redondance dans le système, parce que beaucoup de chimiokines se lient aux multiples récepteurs d'une même classe, et plus qu'un récepteur peut interagir avec les chimiokines [152]. Les chimiokines exercent leurs activités biologiques à travers la liaison avec des récepteurs à sept domaines transmembranaires et l'activation en aval des voies de signalisation intracellulaire [144].

En 2000, dans une tentative de clarifier la nomenclature complexe des chimiokines, les Docteurs Zlotnik et Yoshie ont mis au point une nomenclature dans laquelle chaque ligand et son récepteur sont identifiés par sa sous-famille avec un numéro d'identification. L'adoption de ce système a été recommandée par le sous-comité de nomenclature de chimiokines de l'Union Internationale des Sociétés d'Immunologie [148, 150, 153].

Tableau 1. Les récepteurs de chimiokines et leurs ligands.

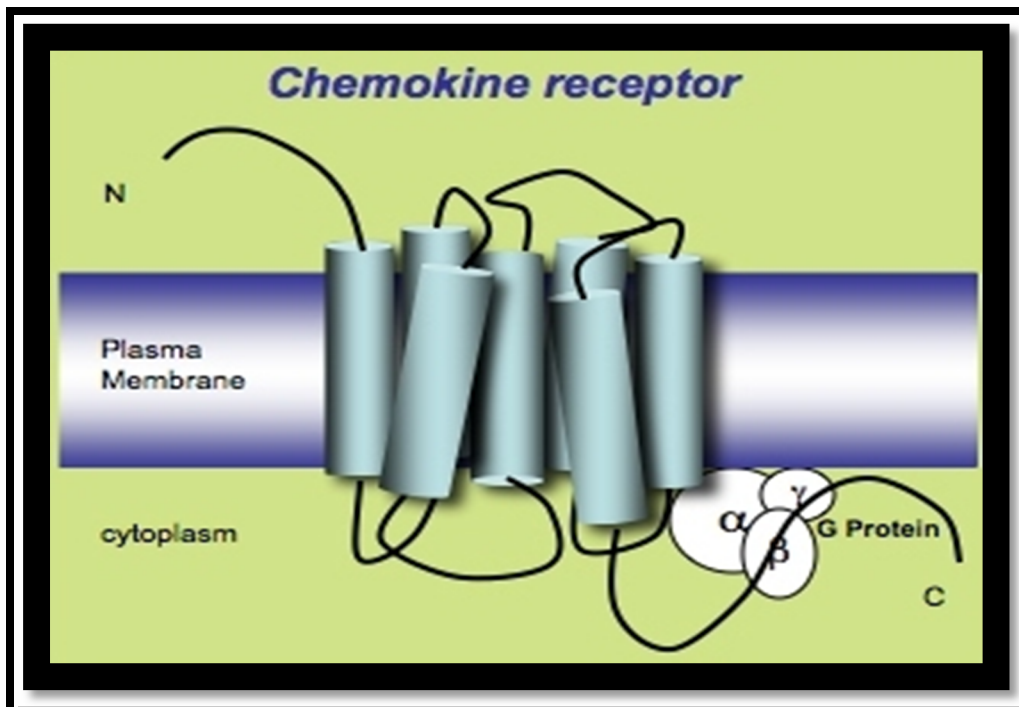
Récepteur	Ligand
CCR1	CCL3,CCL5,CCL7,CCL13,CCL14,CCL15,CCL16,CCL23
CCR2	CCL2,CCL7,CCL8,CCL13,CCL16
CCR3	CCL5,CCL7,CCL8,CCL11,CCL13,CCL15,CCL16,CCL24,CCL26,CCL28
CCR4	CCL17,CCL22
CCR5	CCL3,CCL4,CCL5,CCL8,CCL11,CCL14,CCL16
CCR6	CCL20
CCR7	CCL19,CCL21
CCR8	CCL1
CCR9	CCL25
CCR10	CCL27,CCL28
CXCR1	CXCL6,CXCL7,CXCL8
CXCR2	CXCL1,CXCL2,CXCL3,CXCL5,CXCL6,CXCL7,CXCL8
CXCR3-A	CXCL9,CXCL10,CXCL11
CXCR3-B	CXCL4,CXCL9,CXCL10,CXCL11
CXCR4	CXCL12
CXCR5	CXCL13
CXCR6	CXCL16
CXCR7	CXCL12
XCR1	XCL1,XCL2
CX3CR1	CX3CL1
CCX-CKR	CCL19,CCL21,CCL25
D6	CCL2,CCL3L1,CCL4,CCL5,CCL7,CCL8,CCL11,CCL13,CCL14,CCL17,CCL22
DARC/Duffy	CCL2,CCL7,CCL8,CCL11,CCL13,CCL14,CCL16,CCL17,CXCL1,CXCL5, CXCL6,CXCL7,CXCL8,CXCL9,CXCL11,CXCL13

Adapté de [150].

1.5.1. Structure des récepteurs de chimiokines

Les récepteurs de chimiokines sont des membres de la classe A de la famille "Rhodopsin like" [154]. Ce sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à la protéine G. Leurs caractéristiques les plus communes sont la présence d'un domaine court N terminal extracellulaire et une queue cytoplasmique C terminale. Le domaine C terminal contient les résidus sérine et thréonine, qui sont phosphorylés lors de l'activation du récepteur et de la transduction du signal. Les première et deuxième boucles extracellulaires du récepteur sont reliées par des ponts disulfures. La deuxième boucle extracellulaire contient également une séquence conservée de neuf aa (DRYLAIVHA) qui est importante pour l'interaction de la protéine G (Figure 16) [155].

Figure 16: La structure des récepteurs de chimiokines.



Adapté à partir de la page web: <http://www.york.ac.uk/cii/research/immunology>. 16 Janvier 2012.

Chaque récepteur est désigné par le nom de la sous-famille des chimiokines (C, CC, CXC, CX3C) suivie de la lettre "R" (pour "récepteur") et un nombre «n» en fonction de l'ordre chronologique dans lequel il a été identifié. Ainsi, les récepteurs sont nommés CXCRn, CCRn, CX3Rn et XCRn [153]. (Tableau 1).

1.6. Les corécepteurs du VIH -1 et le tropisme

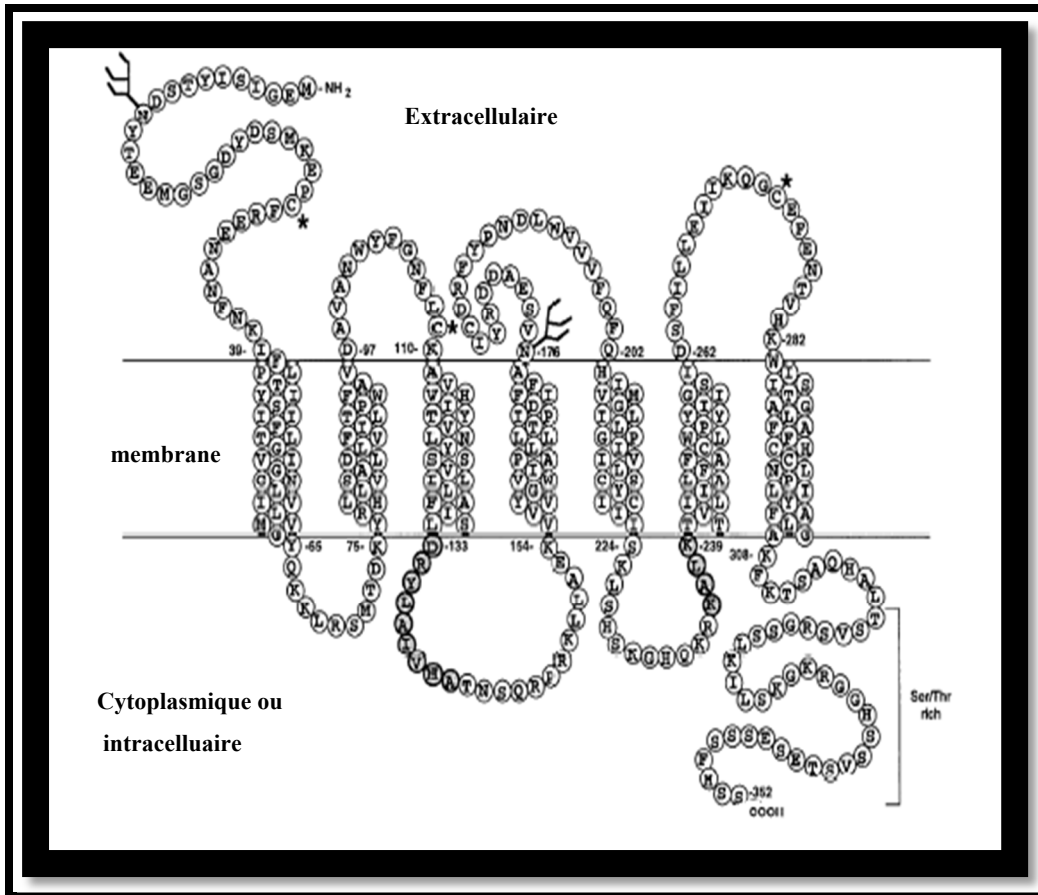
Bien que la liaison au récepteur CD4 soit nécessaire, elle n'est pas suffisante pour l'entrée du VIH-1 dans la cellule [137, 138]. En 1996, le groupe de Berger a été le premier à identifier le corécepteur du VIH-1 pour l'entrée des souches T-tropique de VIH-1 alors désigné "fusine" [156].

1.6.1. Le récepteur de chimiokines CXC-4 (CXCR4)

Le CXCR4 (Fusine) a tout d'abord été cloné par Loetscher *et al.* en 1994 et a reçu à cette occasion l'acronyme LESTR [145]. Plus tard, il a été rebaptisé CXCR4, car il est un ligand naturel du CXCL12 ou facteur cellulaire dérivé des cellules stromales 1 (SDF1) [157]. CXCR4 est une protéine de 352 aa structurellement apparentée aux récepteurs des chimiokines appartenant à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à la protéine G (GPCR) (Figure 17). Il a une ample distribution dans les tissus et est présent à la surface cellulaire de la plupart des populations de leucocytes; il est fortement exprimé sur les lymphocytes T naïfs, sur les cellules B et à un faible niveau sur les monocytes [158]. Il est également présent à des niveaux plus élevés que les autres récepteurs des chimiokines dans les cellules épithéliales et endothéliales intestinales et pulmonaires [159]. Dans le cerveau, le récepteur CXCR4 est localisé dans l'endothélium de la barrière hémato-encéphalique, dans les

microglies, les neurones et les astrocytes. Il joue un rôle dans la prolifération cellulaire et la migration de ces cellules [160].

Figure 17. Représentation schématique de la séquence CXCR4.



Représentation schématique du récepteur de chimiokine CXCR4, (Fusine). Les deux sites potentiels de N-glycosylation sont également représentés par analogie avec d'autres récepteurs de chimiokines. Les résidus de cystéine dans les boucles extracellulaires 1 et 2 forment un pont disulfure. Le premier pont disulfure se forme entre les cystéines 109 et 186 et le deuxième entre une cystéine du domaine amino-terminal en position 28 et une cystéine de la troisième boucle extracellulaire en position 274, ils sont représentés ici par un astérisque. Reproduit avec permission [146].

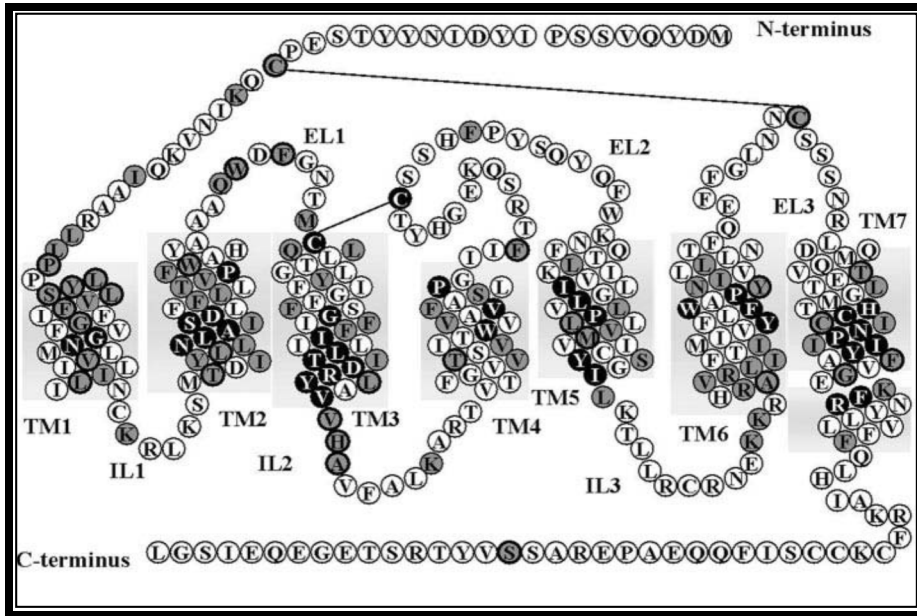
Peu de temps après l'identification de CXCR4, le corécepteur CCR5 a également été confirmé comme un corécepteur pour l'entrée des souches de VIH-1 M-tropique [161, 162].

1.6.2. Le récepteur de chimiokines CC- 5 (CCR5)

Le récepteur de chimiokines CC-5 (CCR5) a été découvert en 1996 par Samson *et al.* [163]. Il est composé de 352 aa pour une masse moléculaire de 40.6 kDa. Il partage 71% d'identité de séquence avec le récepteur CCR2, la plupart des divergences étant situées au niveau des domaines extracellulaires [164-166]. Il est composé de sept domaines transmembranaires hydrophobes avec un domaine N-terminal extracellulaire, trois boucles extracellulaires (ECL1, ECL2 et ECL3), trois boucles intracellulaires et une queue C-terminale cytoplasmique qui contient des motifs structuraux essentiels pour la signalisation, la désensibilisation et le trafic de récepteur (Figure 18) [167]. Le CCR5 contient une séquence DRYLAVHA conservée dans la deuxième boucle intracellulaire, qui a été impliquée dans l'interaction avec la protéine G [166]. La boucle extracellulaire 2 (ECL2) est essentielle pour la liaison avec une haute affinité de la protéine inflammatoire de macrophage-1 (MIP-1 α , MIP-1 β ainsi qu'avec la protéine RANTES. La boucle ECL2 joue un rôle important dans l'entrée du VIH-1 [168]. Il agit comme un récepteur pour les CC-chimiokines CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) et CCL5 (RANTES) [169, 170]. CCL3, CCL4 et CCL5 se lient efficacement au CCR5 et sont des agonistes complets, alors que CCL7, CCL8 et CCL13 se lient de manière moins efficace et présentent des capacités différentes d'activation du récepteur. MCP-3/CCL7 se lie à CCR5 sans induire de signal et par conséquent a été suggéré comme un antagoniste naturel [171, 172]. Le récepteur CCR5 est exprimé dans le système immunitaire, où il se retrouve dans les cellules T mémoires CD4+, les cellules T mémoires CCR5+ ayant une fréquence relativement élevée dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT). Les sous-types cellulaires qui expriment les plus hauts niveaux de CCR5 sont les CD4+CCR4+CCR6+, les CXCR3+CCR6+, les cellules T mémoires CCR6+CCR5^{high}, les

macrophages dérivés de monocytes, les cellules dendritiques et les monocytes du sang périphérique CD16+, principalement CD14+CD16+ [98].

Figure 18. Représentation schématique du corécepteur CCR5.



Les rectangles gris représentent les résidus des régions TM1 à TM7. Les ponts disulfures se forment entre les cystéines 20 et 269 et entre les cystéines 101 et 178. Ils sont représentés par des lignes reliant ces cystéines. Les cercles gris indiquent les résidus conservés. Les cercles noirs indiquent les résidus hautement conservés dans la famille rhodopsine des GPCR. Reproduit avec permission [167].

1.6.3. La délétion de CCR5 et ses conséquences

Le gène CCR5 est situé sur le chromosome 3p21.3-p24 humain dans le groupe de gènes des récepteurs de chimiokines et contient trois exons qui s'étendent sur une région d'environ 6 kb [173]. Certains polymorphismes de ce gène ont été décrits. La suppression de 32 pb (mutation $\Delta 32$) dans l'exon 3 modifie le cadre de lecture ouvert de CCR5 et il en résulte une protéine tronquée non fonctionnelle [174] retenue dans le réticulum endoplasmique donc non exprimée à

la surface des cellules. Les individus homozygotes ($\Delta 32/\Delta 32$) pour cette mutation (fréquence de 0,5 à 1% dans la population caucasienne) sont protégés contre l'infection par le VIH concernant des souches M-tropiques (R5) VIH-1, mais peuvent être infectés par les souches T-tropiques. Les individus hétérozygotes, quant à eux, ne sont pas résistants à l'infection, mais l'évolution de l'infection vers le stade SIDA est plus lente. Cette association a été trouvée dans la plupart des cohortes dans le monde [175-177]. Certaines études ont suggéré que les individus hétérozygotes pourraient être partiellement protégés contre l'infection par le VIH mais sans confirmation. Les hétérozygotes peuvent représenter jusqu'à 10% dans certaines populations [178].

Récemment, la guérison fonctionnelle d'un patient infecté par le VIH et atteint de leucémie myéloïde aiguë traitée par une greffe de moëlle osseuse utilisant des cellules provenant d'un patient homozygote CCR5 Δ 32 a généré beaucoup d'intérêt quant à la possibilité d'éradiquer l'infection virale [179, 180]. La généralisation de cette approche demeure problématique. En effet, la morbidité et la mortalité associées à une transplantation de cellules souches hématopoïétiques, et la faible probabilité de trouver un donneur de cellules souches CCR5 Δ 32 homozygote tout en ayant des HLA identiques pour greffer des cellules souches à grande échelle a amené les chercheurs à poursuivre d'autres voies d'inactivation du CCR5 [181]. Deux autres techniques ont été utilisées pour diminuer l'expression du CCR5 dans les lymphocytes T CD4+ ou dans les précurseurs hématopoïétiques CD24+. L'interférence de l'ARN (RNA interférence) ou RNAi, qui interfèrent avec l'ARN messager complémentaire des cellules dans lesquelles ils sont introduits, le dégradant et provoquant ainsi l'inactivation de la protéine correspondante. Une autre possibilité est l'utilisation des nucléases type doigts de zinc, de

l'anglais zinc finger (ZF) qui utilisent des enzymes de la classe des ZN nucléases, chaque doigt de zinc reconnaissant trois nucléotides spécifiques. Elles permettent de découper l'ADN du gène du corécepteur CCR5 de façon précise et de l'inactiver dans des cellules progénitrices hématopoïétiques humaines, leur conférant ainsi une résistance au VIH. Cette technique a été récemment expérimentée sur un modèle de souris [182].

Il est aussi connu que les patients homozygotes $\Delta 32$ sont plus susceptibles de présenter des formes symptomatiques d'infection à flavivirus comme le virus du Nil occidental (West Nile Virus) que les individus hétérozygotes. Cette délétion a de plus un rôle protecteur dans la polyarthrite rhumatoïde et contre l'infarctus du myocarde [183].

Au niveau expérimental cette délétion a été associée à une réponse cellulaire et inflammatoire diminuée dans des infections aiguës au virus herpès simplex (HSV), à *Cryptococcus neoformans*, *Toxoplasma gondii* et *Trypanosoma cruzi* dû à la diminution de la production d'IL-12 et IFN- γ . Un effet athéroprotecteur a été également observé possiblement secondaire à une diminution de l'accumulation de macrophages dans la plaque d'athérome, à un plus grand nombre de cellules progénitrices endothéliales et à un taux plus faible de cytokines/chimiokines proathérogènes [91]. La délétion $\Delta 32$ a aussi été associée à l'augmentation du taux de survie des receveurs d'allogreffe rénale [184]

1.6.4. Les corécepteurs alternatifs du VIH-1

Depuis la découverte de CCR5 et CXCR4 comme les principaux corécepteurs du VIH-1, un large éventail de corécepteurs alternatifs pouvant soutenir l'entrée virale ont été identifiés. La liste est

longue et comprend CCR1, CCR2b, CCR3, CCR4, CCR6, CCR8, APJ, CXCR6 (BONZO/Str133 GPR1, GPR15 (BOB), CX3CR1, CMKLR1 (ChemR23), CXCR3 ou CXCR7 (RDC1). Récemment des populations primaires de lymphocytes T CCR4 β CCR6-et-CCR4 CCR6 β ont été démontrées comme très permissives pour la réplication du VIH-1. CCR8 a été démontré comme corécepteur pour une proportion importante des isolats primaires VIH-1 et VIH-2 [185]. Le récepteur de chimiokines CXCR7 a été associé à la transmission verticale du VIH-1 [186]. Le VIH-1, en présence de la mutation GPEK au niveau du site apical de la boucle V3, peut infecter une lignée cellulaire co-exprimant GPR15, APJ et FPRL1 [98, 187]. Toutefois CCR5 et CXCR4 constituent les principaux corécepteurs *in vivo* [188].

1.6.5. Le tropisme du VIH-1

Avant la découverte des corécepteurs du VIH, trois systèmes de classification étaient en usage. Le premier définissait les isolats primaires comme des souches M-tropiques ou T-tropiques. Cependant, ce système masque le fait que tous les isolats primaires se répliquent dans des lymphocytes T CD4 + primaires activés [189]. Le deuxième système classifiait les isolats comme inducteurs de syncytium (SI) ou non inducteurs de syncytium (NSI) sur la base de leur capacité à former des syncytia dans les cellules MT-2 exprimant CXCR4, mais pas CCR5 [190]. Cependant, les virus NSI peuvent facilement former des syncytia avec les cellules CCR5+. Le troisième système définissait quant à lui les virus comme lent/faible (SL) ou rapide/élevée (RH) en fonction de leur cinétique de croissance en culture [191].

L'identification de certains récepteurs de chimiokines en tant que corécepteurs pour l'entrée du VIH-1 dans les cellules hôtes a permis aux chercheurs de développer un nouveau système plus précis pour identifier les propriétés phénotypiques des souches virales. Le principal déterminant du tropisme de VIH-1 est régi par l'expression des corécepteurs CCR5, CXCR4 ou les deux. Des nombreux isolats primaires T-tropiques peuvent utiliser les deux corécepteurs. Une nomenclature basée sur le corécepteur utilisé propose que les isolats qui utilisent le CCR5, mais pas le CXCR4 soient appelés virus R5 alors que les virus utilisant CXCR4, mais pas le CCR5 sont désignés virus X4. Finalement les isolats qui peuvent utiliser les deux corécepteurs avec une efficacité comparable sont appelés souches à tropisme double, souches bitropiques ou encore R5X4 [189]. Un même échantillon peut contenir des virus R5 et X4, il est alors appelé échantillon à tropisme mixte. Si les tests ne peuvent pas déterminer s'il s'agit d'un échantillon à

tropisme mixte ou des souches à tropisme double, les échantillons sont classifiés comme virus à tropisme D/ M (double / mixte) [192-194].

1.6.6. Le tropisme au cours de l'infection par le VIH.

Les souches R5 sont transmises plus efficacement que les souches X4 [195]. La prédominance des souches virales R5 au cours de l'infection aiguë est indépendante de la voie de transmission du VIH [196]. De nombreux mécanismes ont été proposés pour expliquer la transmission préférentielle des souches virales R5. Parmi ceux-ci, on trouve le rôle des muqueuses comme barrière pour filtrer les souches virales X4 ou encore des réponses immunitaires humorales et cellulaires spécifiques qui peuvent inhiber la réplication virale des souches X4 plus efficacement [196, 197].

Les muqueuses du tractus gastro-intestinal, du rectum et de l'endocol de l'utérus sont recouvertes par un épithélium simple monostratifié composé par une monocouche de cellules épithéliales connectées de manière étanche avec des jonctions serrées. Cette structure forme une barrière aux macromolécules, cellules ou pathogènes [198]. Ces muqueuses sont riches en lymphocytes T CD4+, CCR5+, en cellules dendritiques, en macrophages et en moindre quantité en cellules CXCR4+ [108, 199]. Les cellules dendritiques immatures de l'épithélium expriment dix fois plus CCR5 que CXCR4 [200]. Les cellules dendritiques de Langerhans ont des niveaux détectables de CCR5 tandis que le CXCR4 n'est en général pas détectable [201]. Les cellules épithéliales intestinales expriment seulement CCR5 et pas CXCR4 [202]. Un autre facteur pouvant expliquer l'infection préférentielle par des virus R5 est la présence de grandes concentrations de SDF-1 dans la lumière intestinale, le ligand naturel de CXCR4, lequel pourrait

supprimer la transmission des virus X4. L'expression abondante de CCR5 au niveau des muqueuses comparée à celle de CXCR4, pourrait également expliquer la transmission préférentielle des souches R5 [203]. Les souches X4 sont associées à une diminution accélérée du nombre de lymphocytes T CD4+ et à la progression plus rapide de la maladie [196, 197].

La prévalence des souches R5, X4 et D/M varie considérablement selon le stade de la maladie. Chez les patients chroniquement infectés par le VIH, mais naïfs au traitement antirétroviral, les souches R5 sont présentes dans 80-90% des cas alors que les souches D/M et X4 sont plus rares. Chez les patients traités, les souches D/M ou X4 sont plus fréquentes. Un pourcentage plus faible (50-55%) de souches R5 a été trouvé dans l'analyse des échantillons de référence des deux essais cliniques évaluant un inhibiteur d'entrée, l'enfuvirtide. Quant à eux, les progressseurs lents maintiennent des souches de virus à tropisme exclusivement R5 [197].

1.6.7. Approches génotypiques et phénotypiques pour déterminer le tropisme.

Des approches phénotypiques et génotypiques sont couramment utilisées afin de déterminer le tropisme viral. Les tests phénotypiques sont basés sur la technologie de virus recombinants. Le gène *env* du VIH-1 est amplifié à partir d'échantillons de plasma ou de culture cellulaire afin de générer des virus recombinants. Les virus recombinants sont ensuite utilisés pour infecter des lignées de cellules exprimant des récepteurs spécifiques CD4 et CCR5 ou CXCR4 [84]. La plupart des tests phénotypiques utilisent des lignées de cellules de gliomes humains par exemple U87, U373 ou NP-2, qui ont été transduites de façon stable avec des vecteurs exprimant CD4 et un ou plusieurs corécepteurs. Une autre lignée cellulaire indicatrice fréquemment utilisée est GHOST, qui dérive de cellules d'ostéosarcome humain et porte le CD4+, ainsi qu'un gène du virus VIH-1-GFP inducible par Tat [204].

Le gène rapporteur luciférase, de la luciole *Photinus pyralis*, est un des gènes les plus couramment utilisés [205]. Ce gène est habituellement cloné dans un vecteur d'expression en aval d'un promoteur d'intérêt. En présence de la luciférine d'O₂, de Mg²⁺ et d'ATP, la luciférase est capable de générer un produit fluorescent, l'oxyluciférine, lequel peut être quantifié facilement par la mesure de la lumière libérée. Lorsque les substrats sont ajoutés en excès il se produit un éclair de lumière qui est proportionnelle à la quantité de luciférase présente dans la réaction. L'émission de lumière se désintègre rapidement. La luciférase de luciole émet de la lumière jaune-vert d'une longueur d'onde de 560 nm à un pH de 7,5 et 8,5 [206].

Un autre gène rapporteur couramment utilisé est le gène de la protéine fluorescente verte de l'anglais green fluorescent protein (GFP) de la méduse *Aequorea victoria* [207]. La GFP émet

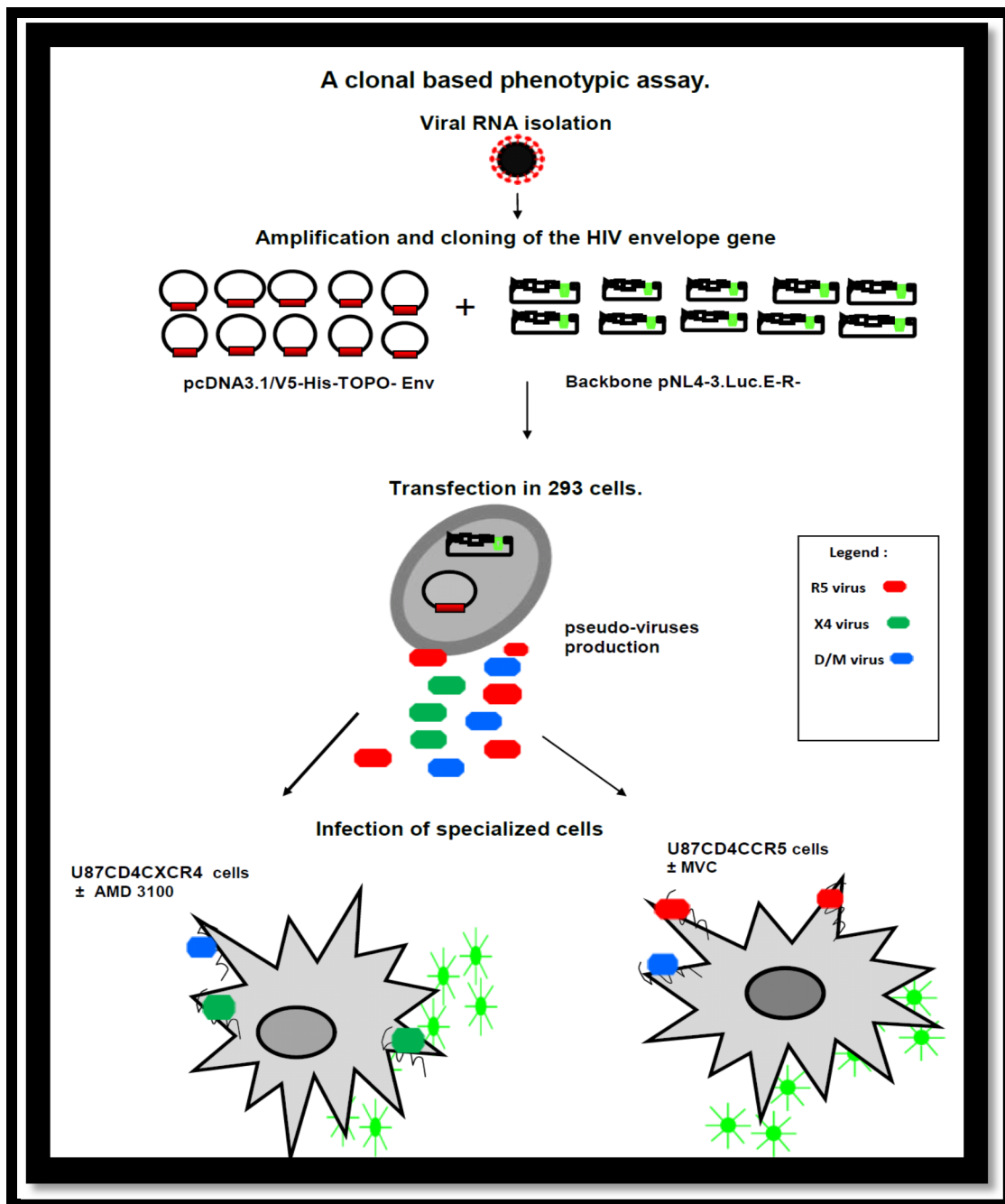
une lumière fluorescente verte d'une longueur d'onde d'émission maximale de 508 nm. Il existe différentes variantes de la GFP émettant de la fluorescence à différentes longueurs d'onde. Le gène GFP peut être utilisé comme un rapporteur intrinsèque intracellulaire de protéines cible [208]. Parmi d'autres gènes rapporteurs on trouve le gène LacZ de la β -galactosidase et le gène *gus* de la β -glucuronidase. Leurs expressions sont détectables par une coloration bleue des cellules en présence de X-Gal ou X-Gluc respectivement [207].

Les tests phénotypiques utilisant des isolats primaires du VIH ou des virus recombinants sont considérés comme tests de référence (gold standard) pour l'évaluation du tropisme du VIH-1. Ils ont les inconvénients de leur complexité, leur coût et nécessitent des installations spéciales ainsi qu'une certaine expertise technique, ce qui les rend difficiles à utiliser en routine pour le diagnostic clinique [209]. Actuellement, le test Trofile® [193] de LabCorp, précédemment Monogram Biosciences à San Francisco en Californie, est parmi les rares tests phénotypiques disponibles sur le marché pour déterminer le tropisme et donc est le plus largement utilisé dans le monde [209]. Dans cet essai, les gènes d'*env* complets sont amplifiés à partir des échantillons de plasma des patients et clonés dans le vecteur d'expression pCXAS-PXMX. La cotransfection des vecteurs pCXAS-PXMX et le vecteur génomique de VIH-1 RTV1.F-LUCp.CNDO Δ U3 (qui possède une cassette luciférase insérée dans une région délétée du gène *env*) produit des pseudovirus contenant des gènes *env* de pleine longueur. Le tropisme du corécepteur (X4, R5 ou DM) est déterminé en mesurant l'activité luciférase après un cycle d'infection dans les cellules U87CD4CCR5+ ou U87CD4CXCR4+ en présence et en absence des inhibiteurs de CXCR4 et CCR5 respectivement [193]. La Figure 19 décrit le test de tropisme optimisé par notre laboratoire publié dans Journal of Virological Methods par Asin-Milan et collaborateurs [210]. En 2008, un test avec une sensibilité accrue Trofile®-ESTA a été développé pour améliorer la détection des

niveaux de X4 et permet de détecter 0,3% de ces variants avec une sensibilité de 100%. La performance des deux tests est équivalente [193, 211]. Trofile® DNA est maintenant utilisé pour les patients ayant une charge virale indétectable. Contrairement au test standard Trofile®, qui utilise l'ARN viral extrait du plasma des patients avec une charge virale ≥ 1000 copies/ml, le test Trofile ® DNA utilise l'ADN viral extrait des cellules. Une fois l'ADN extrait Trofile ® DNA fonctionne sur la même plate-forme validée cliniquement que le test Trofile ® [212, 213].

Trofile® est la méthode la plus largement utilisée pour déterminer le tropisme phénotypique mais d'autres méthodes existent comme par exemple Phenoscript Env™, Phenox-R et Virco [84], le test de tropisme de l'université de Toulouse (TTT ou Toulouse Tropic Test) [183] ou encore le test tropiTest de l'Instituto de Salud Carlos III en Espagne [214]. Leurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau 2.

Figure 19. Illustration du test de tropisme.



Cette figure décrit le test de tropisme optimisé par notre laboratoire. Le gène env est amplifié à partir du plasma des patients puis cloné dans le vecteur d'expression pcDNA3.1D/V5HisTOPO. La cotransfection des vecteurs pcDNA3.1D/V5HisTOPO-ENV et pNL4-3.Luc.E-R- dans les cellules 293T résulte en des pseudovirus avec lesquels les cellules U87CD4 CCR5 et U87CD4CXCR4+ sont infectées. Le tropisme du corécepteur (X4, R5 ou DM) est déterminé en mesurant l'activité luciférase après un cycle d'infection en présence ou en absence des inhibiteurs de CXCR4 et CCR5 respectivement. Dans cette figure on observe la production de lumière dans les cellules U87CD4CCR5+ pour les virus à tropisme R5 et les virus dual tropiques (bi-tropiques ou R5/X4). Les virus à tropisme X4 et les virus R5/X4 provoquent la production de la lumière dans les cellules U87CD4CXCR4+.

Tableau 2. Caractéristiques techniques des tests de tropisme phénotypiques.

Test	Insert	Vecteur d'expression	Système	Vecteur génomique	Cellules	Gène rapporteur	Cellules cibles	Détection de variants X4.	Référence
Trofile	gp160	pCXAS	Pseudo-virus	RTV1.F - LUCp.C NDOΔ U3	293T	Luc	U87CD4 CXCR4+ U87CD4 CCR5+	TROFILE 10% ESTA 0.3%	[193, 211].
Pheno script Env™	V1-V3	—	Virus recombinants	pNL43 ΔEnv	293T	Lac Z	U373MG CD4CXCR4+ U373MG CD4 CCR5+	5-10%	[215]
Pheno x-R	V1-V3	—	Virus recombinants	pNL43 ΔEnv	Hela	Lac Z	SX22 HelaCCR5+ SX22 HelaCXCR4+	1%	[216]
Virco	gp120 (NH2-V4)	—	Virus recombinants	hXB2D pHXB2D-ΔNH2V 4eGFP	293T	EGFP	U87CD4 CXCR4+ U87CD4 CCR5+	< 10%	[217]
Toulouse Tropic Test (TTT)	gp120 + ectodomaine gp41	—	Virus recombinants	pNL43 ΔEnv	293T	Luc	U87CD4 CXCR4+ U87CD4 CCR5+	0.5%	[183]
test tropiTest	gp160	—	Virus recombinants	pNL-lacZ/env-Ren	293T	Luc	U87CD4 CXCR4+ U87CD4 CCR5+	1%	[214]
Test non commercial	gp160	pcDNA 3.3-TOPO	Pseudo-virus	pNL4-3.Luc.R-E	293T	Luc	U87CD4 CXCR4+ U87CD4 CCR5+	1%	[218]

Les tests de tropisme génotypiques sont moins complexes, les délais sont plus rapides, et à cause de l'augmentation de la disponibilité des installations de séquençage d'acides nucléiques, ils peuvent être aujourd'hui effectués dans les laboratoires cliniques de routine [219]. Ils sont généralement basés sur le séquençage de la boucle V3 de l'Env et analysés en utilisant des algorithmes bio-informatiques pour déduire l'utilisation de corécepteur [220].

Il existe différentes règles et outils génotypiques basés sur la séquence des aa de la région d'Env V3 de la gp120 du VIH-1, qui est le déterminant majeur de l'utilisation du corécepteur. Les premières méthodes génotypiques utilisées sont des règles très simples, telles que la règle 11/25, basée sur la présence de chaînes latérales basiques dans les résidus 11 ou 25 sur la boucle V3 des souches X4. L'absence de R ou K dans ces positions est associée à un tropisme R5 [221]. Cette règle a une sensibilité de 30-40% avec une spécificité d'environ 80-90% [222]. Des modifications de cette règle ont été proposées, la règle 11/24//25. Cette règle attribue un tropisme X4 quand le virus possède des aa basiques aux positions 11, 24 et 25, dans le cas contraire le virus est considéré comme R5 [223].

La règle de la charge nette est une règle simple qui permet d'estimer la charge nette globale de V3 selon la formule $(K + R) - (D + E)$ où la lettre K représente la charge nette pour la lysine, R pour l'arginine, D représente l'acide aspartique et E représente l'acide glutamique. Lorsqu'on utilise cette règle et que les résultats sont supérieurs ou égaux à 5, le virus est classé comme X4, dans le cas contraire le virus est classé comme R5. Une règle alternative comprend l'acide aminé histidine (H) et utilise la formule $(K + R + H) - (D + E)$. La charge de séquences V3 est basée sur le fait que l'arginine et la lysine ont une charge de 1, l'histidine de 0,1 et les acides aspartique et glutamique de -1 [224, 225].

Des outils bio-informatiques pour l'interprétation du tropisme sont disponibles *via* Internet: Wetcat, WebPSSM ou geno2pheno [corécepteur]. Les trois systèmes sont axés sur la région V3 de l'Env et tiennent compte seulement de la séquence des aa. Wetcat est un service web développé par l'Université de Californie disponible à l'adresse

<http://genomiac2.ucsd.edu:8080/wetcat/v3.htm> [226]. Le tropisme viral est estimé en utilisant les séquences de V3 et il s'appuie sur les prévisions d'un ensemble de séquences de référence de la boucle V3 dont 168 sont de tropisme R5, 103 sont X4 et 21 sont de tropisme X4/R5 ou D/M [222].

WebPSSM a été développé par l'Université de Washington. Il est disponible à l'adresse <http://ubik.microbiol.washington.edu/computing/pssm> [227-229]. Le programme utilise le PSSM comme méthode statistique d'analyse des séquences pour détecter des distributions non aléatoires des aa à des sites adjacents associés aux groupes de séquences déterminées de manière empirique [227]. L'alignement de la séquence étudiée en format FASTA est complété par le serveur en utilisant l'algorithme Smith-Waterman et différentes matrices R5X4 ou SINSI [222]. Les matrices peuvent être utilisées pour les virus de sous-type B, alors que pour le sous-type C uniquement la matrice SINSI peut être utilisée [220, 221]. [227, 228]. Un score peut être attribué à une séquence: plus le score est élevé, plus la séquence ressemble étroitement à celles des virus X4 connus [227]. Selon la matrice utilisée pour effectuer des prédictions, les séquences V3 peuvent être classées comme R5 lorsque le score est inférieur au seuil R5 (-6.96 R5X4 et -5.4 pour la matrice SINSI) [84, 222].

Geno2phenoreceptor a été développé par les chercheurs de l'Université de Cologne et l'Institut Max Planck en Allemagne [230, 231]. Les prédictions sont basées sur la méthode statistique SVM et sont réalisées à partir de séquences de nucléotides ou d'acides aminés en format FASTA. Il est disponible sur la page Web <http://www.geno2pheno.org>. La dernière version du Geno2phenoreceptor a la possibilité d'inclure des paramètres cliniques supplémentaires tels que la charge virale, le taux de cellules CD4 et CD8 ainsi que le génotype [84].

Fortinbras PSSM est une autre méthode publique de génotypage du corécepteur du VIH basée sur des matrices de notation propres à la position (PSSM), développé par le développeur original de PSSM et disponible à <http://fortinbras.us> [206].

Les approches de séquençage de nouvelle génération ont une sensibilité beaucoup plus élevée que les tests génotypiques de première génération et peuvent détecter les variants du VIH-1 minoritaires à des niveaux beaucoup plus faibles. La 454a été la première plate-forme adaptée du séquençage massif pour déterminer le tropisme du VIH-1 [222]. Cette technologie a été développée par 454 Life Science-Roche Co. (<http://www.454.com>). à Brandford, CT aux États-Unis. Ce programme est basé sur la convergence de deux principes fondamentaux: la PCR émulsion et le pyroséquençage [232]. L'ADN génomique est isolé, fragmenté et lié à des adaptateurs puis séparé en simples brins. Les fragments sont liés à des billes dans des conditions qui favorisent la liaison d'un seul fragment par bille. Les billes sont ensuite isolées et compartimentées dans des gouttelettes d'un mélange de réaction PCR et d'émulsion dans huile. L'amplification par PCR a lieu à l'intérieur de chaque gouttelette. Ainsi, chaque bille porte dix millions d'exemplaires d'une matrice unique d'ADN. L'émulsion est séparée, les brins d'ADN sont dénaturés et les billes portant des matrices d'ADN simple brin sont enrichies et déposées dans des puits d'une plaque contenant des enzymes de séquençage [233]. L'incorporation des nucléotides génère des pyrophosphates inorganiques (PPi), lesquels sont convertis en ATP par la sulfurylase. La luciférase utilise l'ATP pour convertir la luciférine en oxyluciférine et produire de la lumière [232, 233]. Ces technologies présentent toutefois certaines limites, entre autres, leur coût, la nécessité d'entreposer de grandes quantités de données et l'expertise analytique nécessaire pour les interpréter [222]. Ces technologies progressent à grande vitesse, d'autres plate-formes de séquençage ont été développées et sont plus performantes [234].

1.7. Traitements du VIH.

1.7.1. Les médicaments antirétroviraux.

Depuis 1996, la multi-thérapie est devenue le traitement standard pour traiter les personnes infectées par le VIH [235]. L'introduction du traitement antirétroviral hautement actif (HAART) a permis une augmentation spectaculaire du taux de survie des patients infectés [236]. L'objectif principal de la multi-thérapie est d'atteindre des niveaux plasmatiques d'ARN inférieurs à 50 copies/ml (ou seuil détectable), afin d'éviter la destruction du système immunitaire et l'évolution de la maladie vers la phase SIDA [237]. Les efforts pour un traitement curatif du VIH ont été, jusqu'à présent, inefficaces.

Les antirétroviraux (ARV) bloquent une des étapes cruciales du cycle viral du VIH-1. Selon leur mode d'action pharmacologique, ils peuvent être divisés en quatre catégories: (1) Les inhibiteurs de la transcriptase inverse (ITI), lesquels sont divisés en inhibiteurs nucléosidiques (INTI) et inhibiteurs non nucléosidiques (INNTI); (2) les inhibiteurs de la protéase (IP); (3) les inhibiteurs de l'intégrase (IN) et (4) les inhibiteurs d'entrée.

1.7.1.2 Les inhibiteurs d'entrée du VIH.

L'entrée virale représente actuellement l'une des cibles les plus attrayantes pour la recherche de nouveaux médicaments afin de traiter l'infection par le VIH. Telles que décrites ci-dessus, les principales étapes du processus d'entrée virale sont (i) la liaison de la gp120 virale avec le récepteur CD4 des cellules T CD4+, (ii) la liaison de la gp120 virale aux corécepteurs soit CCR5 ou CXCR4 et finalement (iii) la fusion des membranes virale et cellulaire. Les inhibiteurs d'entrée ciblent chacune de ces étapes empêchant ainsi le virus d'entrer dans les cellules [238].

1.7.1. 2. 1. Les inhibiteurs de CD4 et les inhibiteurs de la liaison CD4-gp120

Plusieurs molécules peuvent inhiber la liaison CD4-gp120. Elles possèdent des structures et des mécanismes d'action différents [238].

PRO 542 (CD4-IgG2), est une protéine recombinante de type fusion, soluble, similaire à un anticorps. Il s'agit d'une IgG2 humaine chez laquelle les domaines D1 et D2 de CD4 humains remplacent les parties Fv des deux chaînes lourdes et légères. Elle reconnaît des épitopes discontinus qui chevauchent le site de liaison de CD4 sur la gp 120 du VIH-1 et se lie à celle-ci [238]. De modestes réductions dans les niveaux plasmatiques d'ARN du VIH-1 ont été observées dans un essai de phase 1-2 de PRO 542 chez des patients présentant un stade de la maladie avancé du VIH. Aucune étude supplémentaire de PRO 542 actuellement en cours [99].

Ibalizumab (anciennement TNX-355 ou Hu5A8) est un anticorps monoclonal d'origine murine humanisé qui se lie au second domaine (C2) de la molécule CD4. Il n'inhibe pas la liaison CD4-gp120 et il semble exercer son effet antiviral par des changements de conformation post-liaison qui empêchent le CD4-gp120 lié d'interagir avec les corécepteurs CCR5 ou CXCR4 [239]. C'est un puissant inhibiteur du VIH-1 *in vitro* et est synergique lorsqu'il est combiné avec un anticorps contre la gp120 ou l'inhibiteur de fusion Enfuvirtide. Ibalizumab ne semble pas interférer avec les fonctions immunologiques qui impliquent la présentation des antigènes. Des études de phase 1 ont montré une activité prometteuse, avec une réduction de 1,5 log₁₀ des taux plasmatiques d'ARN du VIH-1 entre 14 et 21 jours après une dose unique, cependant une résistance est apparue après 9 semaines d'administration. Une étude de phase 2 a montré que cet anticorps

monoclonal couplé à un traitement de base optimisé entraîne une réduction significativement plus importante de l'ARN plasmatique du VIH par rapport au traitement de base seulement.[99, 238, 239].

Les petites molécules inhibitrices qui bloquent l'interaction gp120-CD4 sont plus prometteuses. La molécule prototypique BMS-806, a une puissante activité *in vitro* contre le sous-type B du VIH-1, mais est moins active contre les autres sous-types et inactive contre le VIH-2 [99]. Le composé se lie à une région spécifique à l'intérieur de la poche de liaison de CD4 sur la gp120. Une preuve de concept de son activité antivirale a été démontrée par une étude avec la molécule BMS-488043 qui a réduit l'ARN plasmatique du VIH-1 à 1 log₁₀ chez des sujets naïfs au traitement antiviral. Cependant, une prise de doses relativement élevées étaient nécessaires (1800 mg) ainsi ce composé n'est plus en cours de production. Des études *in vitro* menées avec BMS-806 ont montré que les aa de la gp120 impliqués dans sa résistance sont ceux entourant la cavité Phe-43 et le canal qui s'étend à partir de cette cavité vers le domaine intérieur. Des changements des résidus W112, T257, S375, F382, M426, M434 et M475 dans la gp120 ont été observés chez les souches résistantes au BMS-806 [238].

Le composé cyclotriazadisulfonamide (CADA) est une nouvelle classe d'inhibiteur d'entrée du VIH-1 qui cible spécifiquement la molécule CD4 [240]. L'activité *in vitro* anti-VIH de CADA a été corrélée à sa capacité de réguler négativement l'expression du récepteur CD4 à la surface cellulaire. Le composé est actif contre une variété d'isolats cliniques appartenant aux sous-types du VIH-1 A, B, C, D, F, G, H, AE et O [241, 242].

1.7.1.2. 2. Les inhibiteurs de fusion.

L'enfuvirtide (Fuzeon, ENF, T-20) est un peptide synthétique de 36 aa correspondant aux résidus 127 à 162 de l'ectodomaine de la gp41 extracellulaire qui imite un fragment HR2 de la gp41. Sa liaison à la région HR1 perturbe l'interaction avec HR2 et bloque la formation de la structure en faisceau à six hélices et interrompt par conséquent la réaction de fusion [243]. L'efficacité clinique de l'enfuvirtide a été démontrée dans deux études de phase III [étude TORO] chez les patients traités. L'enfuvirtide a été approuvé pour le traitement de l'infection par le VIH en 2003 [238, 244, 245]. L'utilité clinique de ce produit est limitée par sa voie d'administration injectable, avec des effets secondaires locaux importants au site d'injection.

T-1249 représente une deuxième génération d'inhibiteurs de fusion. Cette molécule est un peptide synthétique de 39 aa et comme l'enfuvirtide, il est basé sur la séquence HR2. Cependant, il chevauche aussi la région HR1. Il est actif contre les souches VIH-1, VIH-2 et VIS. Le développement clinique de ce médicament a été interrompu à cause des problèmes de formulation [244] .

1.7.1.2.3. Les inhibiteurs de CCR5.

Les inhibiteurs de CCR5 sont divisés en trois groupes en fonction de leur mécanisme d'action. Les grosses molécules, telles que PRO-140, ou des molécules ayant une taille moyenne, comme Met-RANTES et AOP-RANTES qui sont des ligands naturels de CCR5, rendent le CCR5 inaccessible en le recouvrant. Il existe aussi plusieurs petites molécules inhibitrices dirigées contre le CCR5 telles que TAK-779, TAK-220, TAK-652, l'aplaviroc, le maraviroc, AK602, SCH31125 (SCH-C) et le vicriviroc. [238, 246].

PRO-140 est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le CCR5 qui est actuellement disponible uniquement pour l'administration parentérale [247]. Il se lie aux régions extracellulaires hydrophiles sur CCR5 et inhibe l'entrée du virus par un mécanisme compétitif. En effet, il inhibe l'entrée du VIH sans empêcher la signalisation de chimiokines et donc ne bloque pas l'activité naturelle de CCR5, contrairement aux petites molécules antagonistes, qui affectent la signalisation et régulent négativement le CCR5. La différence au niveau des sites de liaison et du mécanisme d'action entre PRO-140 et les petites molécules inhibitrices de CCR5 par voie orale supporte la possibilité de synergie. Plusieurs autres études ont démontré l'efficacité du PRO-140 *in vitro* et *in vivo* [247, 248].

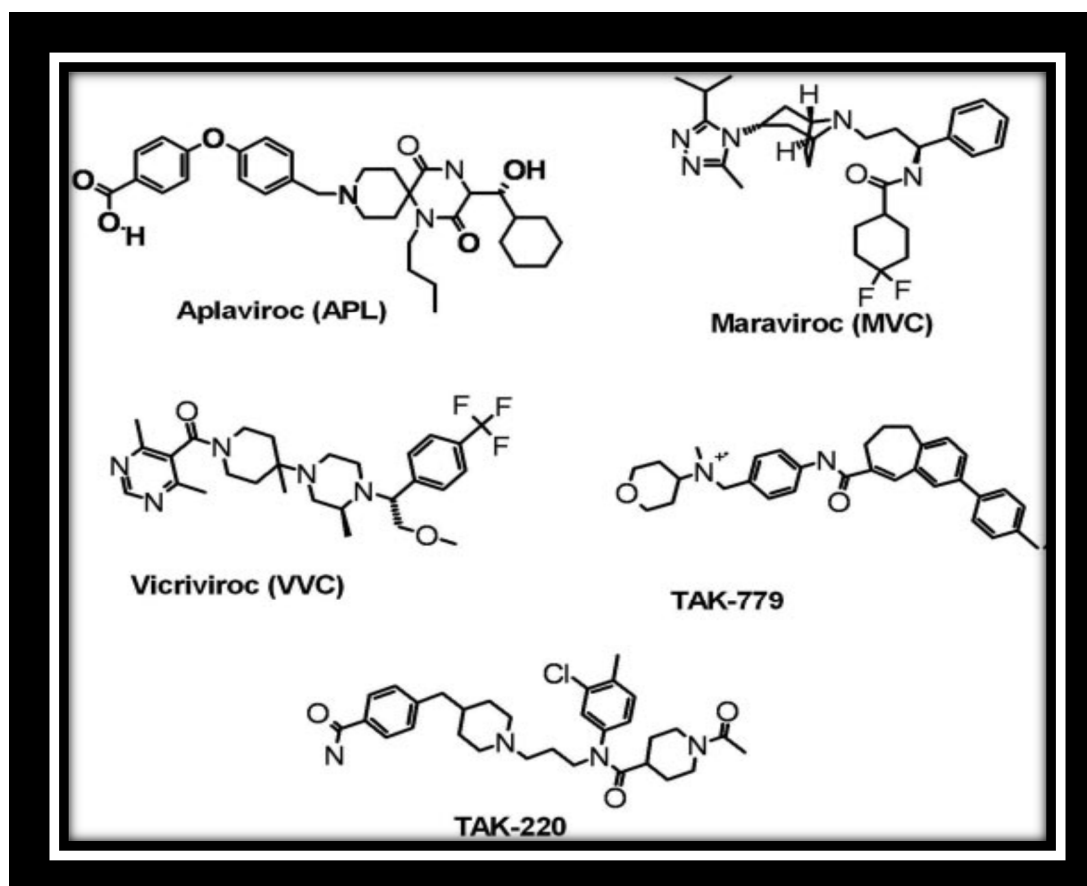
Met-RANTES et aminooxypentane-RANTES (AOP-RANTES) sont deux protéines de RANTES modifiées dans la partie amino-terminale. CCL5 ou RANTES est une protéine de 9 kDa, une CC-chimiokine qui agit comme un facteur chimiotactique et un agent d'activation pour plusieurs cellules du système immunitaire, telles que les monocytes, les lymphocytes T et les éosinophiles. Il joue aussi un rôle dans certaines maladies inflammatoires, telles que

l'endotoxémie et la polyarthrite rhumatoïde. RANTES se lie à un certain nombre de récepteurs de chimiokines, comme CCR1, CCR3, CCR4 et CCR5. D'autres CC-chimiokines, tels que MIP-1 α et MIP-1 β , peuvent compétitionner pour la liaison à chacun des récepteurs mentionnés. Met-RANTES est un dérivé de RANTES, dans lequel un résidu méthionine précède la séquence des aa normale et AOP-RANTES résulte du couplage chimique d'une chaîne alkyle à cinq carbones de la sérine amino-terminale oxydée. Ils sont des puissants inhibiteurs de l'infection à VIH-1 des souches R5 [249].

1.7.1.2.4 Les petites molécules inhibitrices de CCR5.

Les petites molécules inhibitrices de CCR5 (Figure 20) forment une nouvelle classe de médicaments pour le traitement du VIH-1 [250]. Ces molécules agissent au niveau cellulaire et ciblent l'entrée virale [263,264]. Ces composés agissent en se liant à l'intérieur d'une cavité située dans la poche formée par la partie transmembranaire (TM) de CCR5. Cela crée une déstabilisation du récepteur vers une conformation que le VIH-1 ne peut pas reconnaître de manière efficace. En empêchant la liaison au CCR5, les petites molécules avortent la fusion et interrompent le cycle de réplication du VIH-1. Des études de mutagenèse de CCR5 révèlent que plusieurs résidus clés se trouvant dans le domaine TM sont requis pour le fonctionnement des petites molécules antagonistes CCR5 afin de bloquer l'entrée du VIH [248].

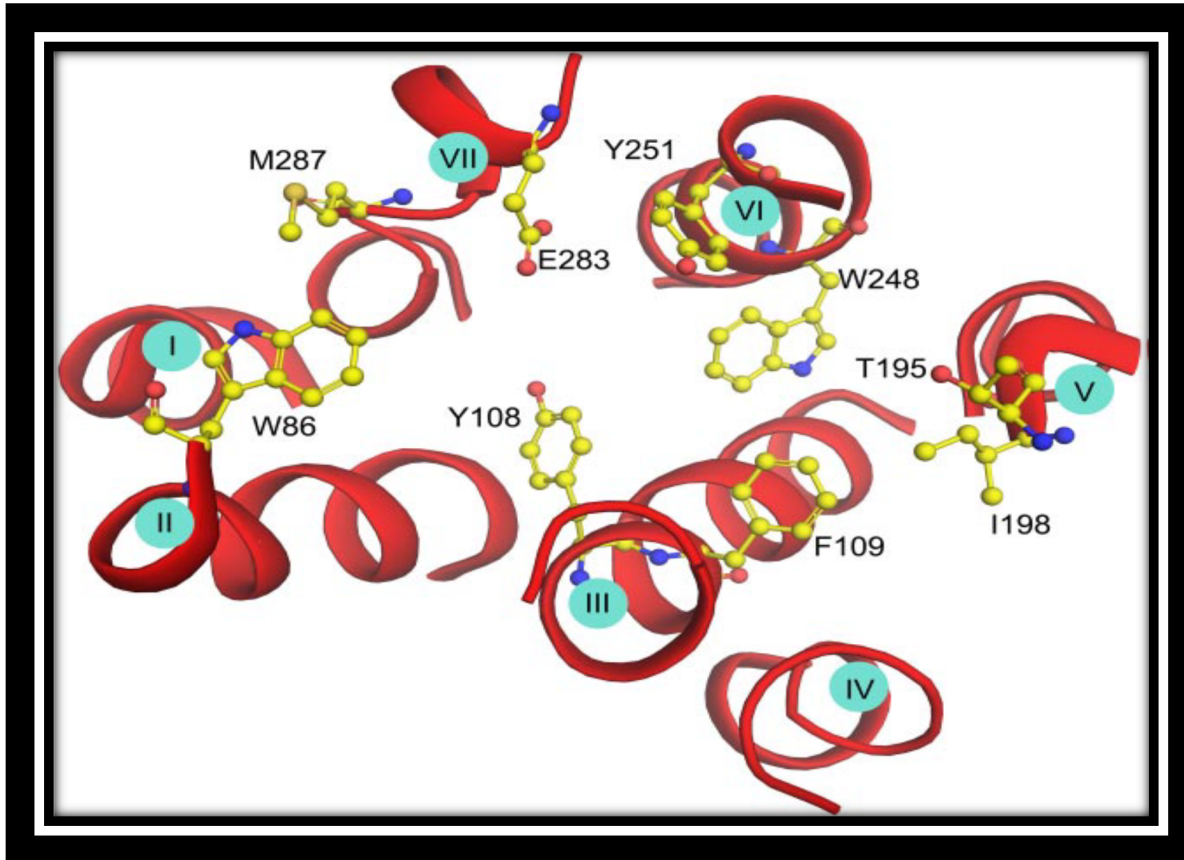
Figure 20. Structures chimiques des inhibiteurs du CCR5: aplaviroc, maraviroc, vicriviroc, TAK-779, et TAK-220.



Reproduit avec la permission de [251].

Les résidus clés qui entourent la poche de liaison sont Trp86, Tyr108, Phe109, Thr195, Ile198, Trp248, Tyr251, Glu283 et Met287. Certains d'entre eux sont présentés dans la Figure 21. Bien que tous les inhibiteurs partagent un site de liaison commun, la nature des interactions spécifiques à l'intérieur de la poche est assez unique à chacune des molécules [251].

Figure 21. Site de liaison partagé par les petites molécules inhibitrices de CCR5 au sein du corécepteur CCR5.



Le site de liaison au CCR5, seulement la région transmembranaire à l'extrémité extracellulaire est représenté ici. Les résidus clés (Trp86, Tyr108, Phe109, Thr195, Ile198, Trp248, Tyr251, Glu283 et Met287) qui entourent la poche de liaison sont identifiés. Les hélices TM sont de couleur rouge et nommés de I à VII. Reproduit avec la permission de [251].

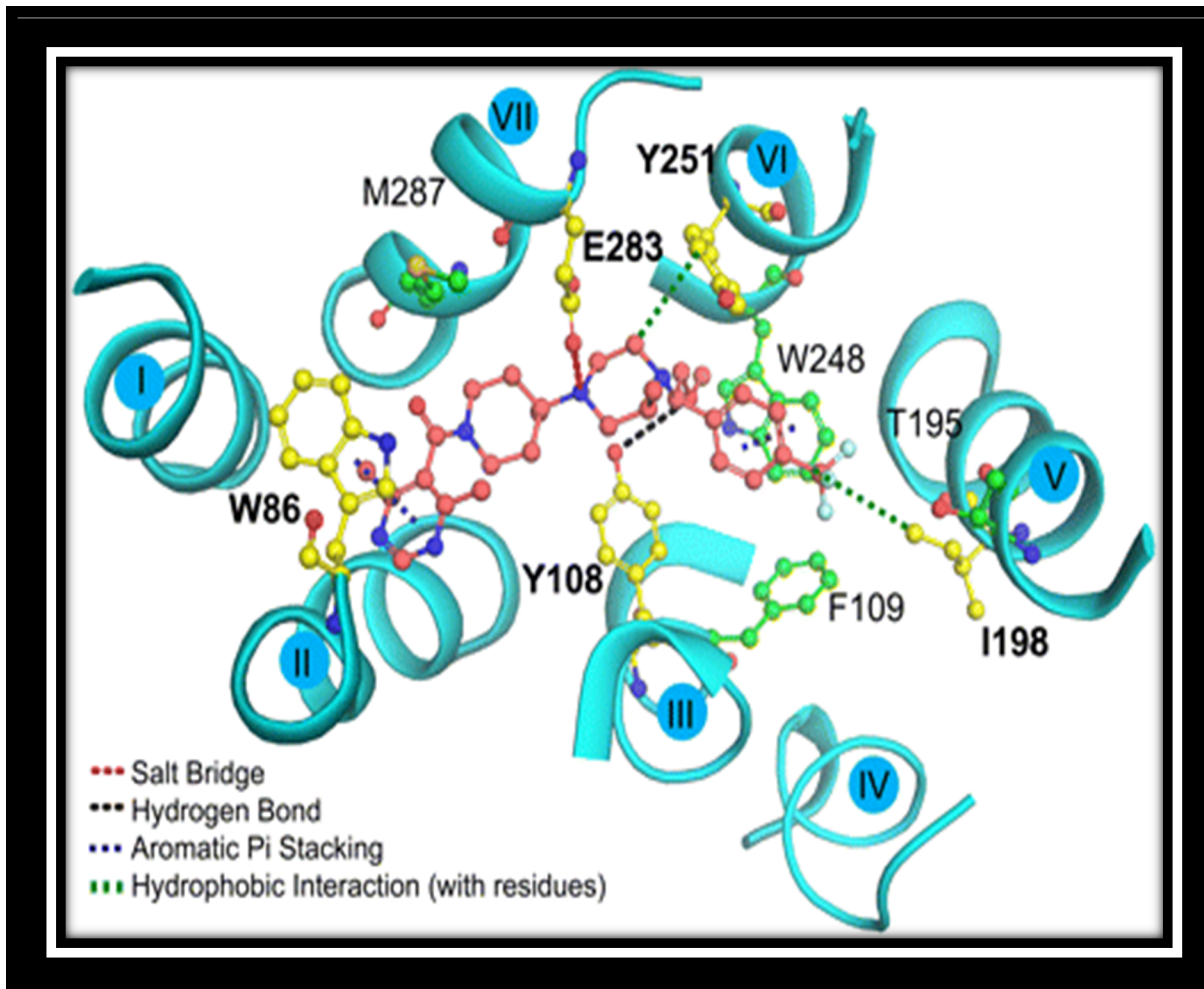
TAK-779 est un anilide d'ammonium quaternaire, produit par la compagnie Takeda Chemical Industries. Elle a été la première petite molécule inhibitrice de CCR5 identifiée (Figure20) [252]. Toutefois, son développement a été stoppé en raison de sa faible disponibilité par voie orale. TAK-779 possède des interactions avec Trp86, Glu283, Phe109, Trp248, Tyr251 et Ile198. Il est le seul inhibiteur de CCR5 qui interagit fortement avec Trp248. Le résidu Tyr108 n'interagit pas

avec TAK-779 [251]. TAK-220 et TAK 652, sont des structures filles de TAK 779, elles sont actuellement en essais cliniques [251, 253, 254].

Le Cenicriviroc (TAK-652, TBR-652) est un médicament expérimental pour le traitement de l'infection par le VIH. Il s'agit d'un inhibiteur des corécepteurs CCR5 et CCR2. L'inhibition de CCR2 peut avoir un effet anti-inflammatoire [9, 255]. Une étude clinique contrôlée randomisée, à double aveugle a été réalisée en 2010 pour évaluer son activité antivirale, sa sécurité et sa tolérabilité. Les patients infectés par le VIH qui ont utilisé le cénicriviroc ont présenté des réductions significatives de leur charge virale, cet effet persistant jusqu'à deux semaines après l'arrêt du traitement [255]. Des données de phase IIb présentées à la conférence sur les rétrovirus et les infections opportunistes (CROI) 2013 ont montré des taux de suppression virale de 76% pour les patients prenant 100 mg de Cénicriviroc, 73% avec 200 mg de Cénicriviroc, et 71% avec l'Efavirenz. Les taux de non-réponse étaient plus élevés avec le Cénicriviroc, ce qui pourrait être dû en grande partie à l'abandon du traitement [255, 256].

L'Aplaviroc (APL), anciennement GSK 873140, est une dikétopipérazine inhibitrice de CCR5 (Figure 20). L'Aplaviroc a montré son activité antivirale avec des toxicités minimales pendant des études en monothérapie à court terme avec des diminutions moyennes dans la virémie plasmatique de 2 logs. Cependant, en octobre 2005, GlaxoSmithKline a annoncé l'arrêt du développement clinique du médicament en raison de l'apparition d'événements inattendus tels qu'une hépatotoxicité grave [246]. L'APL a des interactions fortes avec Trp86, Glu283, Phe109, Thr195, et Ile198 [251].

Figure 22. Les résidus de CCR5 impliqués dans l'interaction avec vicriviroc

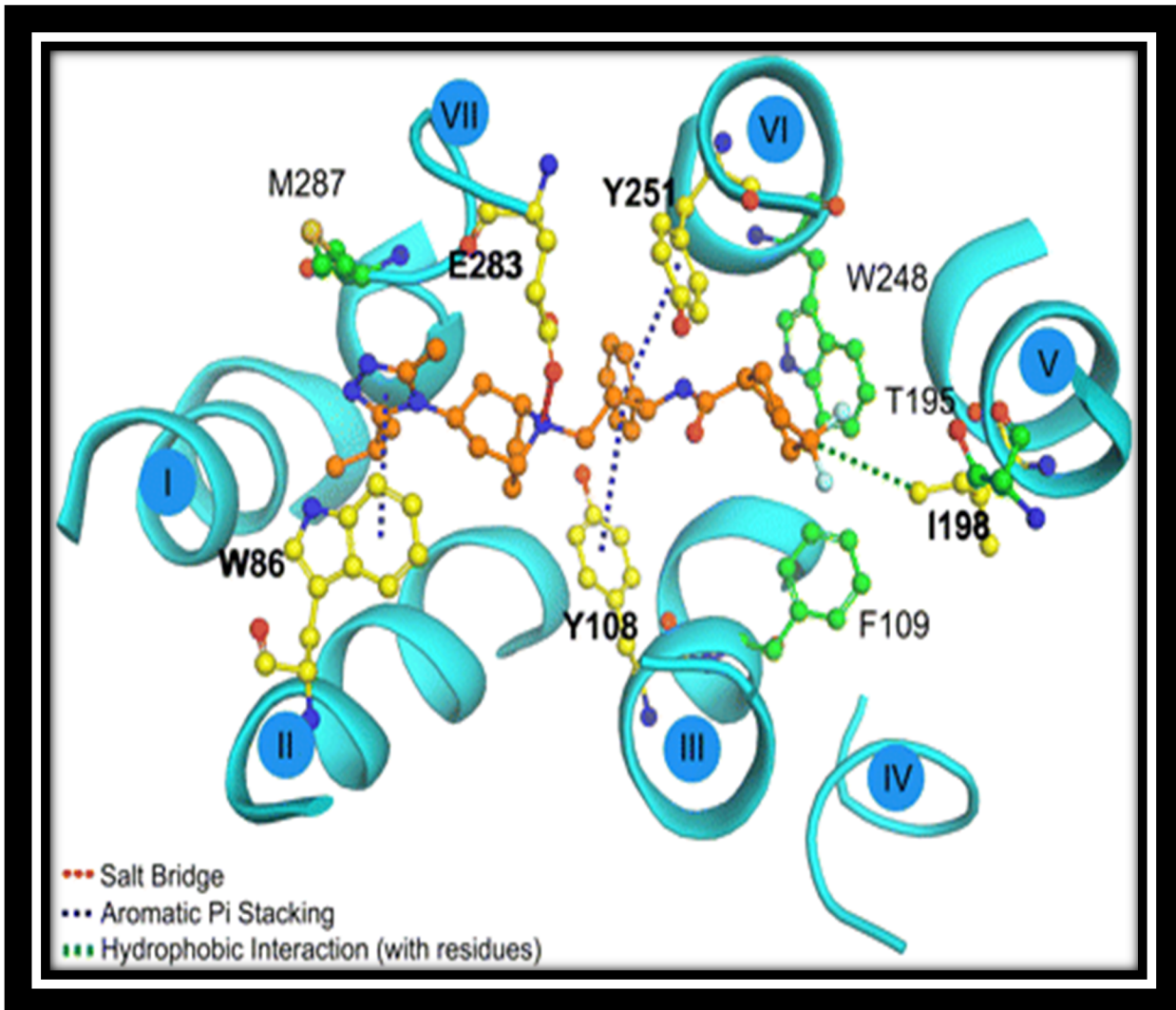


Reproduit avec permission de [251].

Le Vicriviroc (VCV) [257] précédemment nommé SCH 417690 ou SCH-D (Figure 22) [258], est une petite molécule inhibitrice de CCR5 en investigation qui bloque l'entrée du virus VIH-1 à tropisme R5, efficace à des concentrations nanomolaires. Il est hautement spécifique pour le corécepteur CCR5 des primates, et a une excellente biodisponibilité orale. Il présente une activité antivirale à large spectre contre une grande diversité d'isolats avec des valeurs d'EC50

moyennes comprises entre 0,04 et 2,3 nM. [259]. Les interactions clés du VVC sont avec Tyr108 sur TM3, Tyr251 sur TM6, Glu283 sur TM7 et Ile198 sur TM5 (Figure 22) [248].

Figure 23. Les résidus de CCR5 impliqués dans l'interaction avec le maraviroc.



Reproduit avec permission de [251]

Le Maraviroc (MVC, Selzentry, ou Celsentri) [260] (Figure 23), initialement désigné UK-427,857 est un inhibiteur allostérique du récepteur de chimiokines CCR5, il est utilisé dans le traitement de l'infection à VIH à tropisme R5. Il a été le premier inhibiteur de CCR5 sur le marché et le seul

inhibiteur d'entrée par voie orale approuvé à ce jour pour le traitement de l'infection par le VIH chez les patients adultes naïfs aux antirétroviraux ainsi que chez les patients déjà traités [270]. Le MVC inhibe la liaison et les événements de signalisation intracellulaire des ligands naturels de CCR5 comme le C-C motif ligand 3 (CCL3, MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) et CCL5 (RANTES) et la redistribution du calcium intracellulaire [261] Il a une puissante activité antivirale à des concentrations nanomolaires (2nmol/L) et une occupation de longue durée du corécepteur CCR5. Les données pharmacocinétiques suggèrent que l'absorption du médicament est rapide avec une concentration maximale entre 1 à 4 h. Le MVC est un substrat du cytochrome P450 (CYP3A4) et de la glycoprotéine P. La posologie doit être ajustée lors de l'administration concomitante du MVC avec les inhibiteurs du CYP3A4, tels que certains IINNTI, les inhibiteurs de la protéase, ou des inducteurs tels que les INNTI ou chez les patients présentant une insuffisance rénale [262]. Le MVC a des interactions fortes avec Trp86, Glu283, Tyr108, Tyr251 et Ile198 (Figure 25) [251].

1.7.1.2.5. Les inhibiteurs de CXCR4.

Le Perixafor (AMD3100) a été le premier agent de faible poids moléculaire anti-VIH ciblant un corécepteur CXCR4 découvert [262]. Sa puissante activité antivirale contre des souches X4 a été confirmée dans différentes études *in vitro* et *in vivo* [238]. L'AMD3100 a permis l'inhibition des souches de VIH-1 et VIH-2 à des concentrations nanomolaires [262]. Son développement comme traitement antirétroviral a été interrompu compte-tenu d'effets secondaires importants et d'activité limitée aux souches X4 [263, 264]. Toutefois, lors des premiers essais cliniques (phase I) d'AMD3100, pour le traitement du VIH, une leucocytose importante a été observé. En effet, AMD3100 augmente le nombre de cellules souches hématopoïétiques CD34+ dans le sang

périphérique. En combinaison avec le facteur stimulateur des colonies des granulocytes (G-CSF) l'AMD3100 a permis une augmentation des cellules progénitrices, et ce plus qu'en utilisant le G-CSF seul [284]. L'entreprise pharmaceutique détenant ce composé a réorienté l'utilisation clinique de AMD3100, maintenant appelé Mozobil™ vers la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse dans la circulation sanguine pour la transplantation chez des patients atteints de tumeurs malignes hématologiques [243, 261,285-291].

Des études ultérieures ont identifié quelques dérivés de l'AMD3100 qui présentent une activité antivirale puissante. L'un de ces composés, AMD070, montre une bonne biodisponibilité orale et semble être bien toléré [265-267], mais son développement a été suspendu en raison de changements histologiques au niveau du foie et de l'hépatotoxicité chez des animaux [262].

KRH-1636 est un autre antagoniste de CXCR4 puissant et sélectif qui a une activité antivirale similaire à AMD3100 contre les souches à tropisme X4. Des études menées chez le rat ont montré que ce médicament ne peut pas être développé en tant qu'agent anti-VIH-1 en raison de sa mauvaise biodisponibilité par voie orale [268, 269].

KRH-3955 est un dérivé de KRH-1636 qui est biodisponible lorsqu'il est administré par voie orale avec une activité anti-VIH-1[268] beaucoup plus puissante qu'AMD3100 et KRH-1636 [269], il a été développé par une combinaison de modifications chimiques. Ce composé est un puissant inhibiteur de la réplication de souches de VIH-1 à tropisme X4. Il est également actif contre des virus de VIH-1 recombinants à tropisme X4 contenant des mutations de résistance aux INTI, aux IP et à l'Enfuvirtide. Il inhibe à la fois la liaison de SDF-1 α et au corécepteur CXCR4 ainsi que la

signalisation intracellulaire via le récepteur, il s'agit d'un nouvel agent prometteur pour l'infection au VIH-1[268].

Des nouveaux antagonistes de CXCR4 (AMD070 2e, 2k, 3a et 4a) ont été identifiés en modifiant la molécule AMD070. Ces molécules sont des antagonistes inhibiteurs de la signalisation de calcium induites par SDF-1 et sont de puissants inhibiteurs de la réplication virale. Selon les données provenant des études pharmacocinétiques, ces composés sont en études de toxicologie chez les rongeurs [270].

1.7.1.2.6 Vaccins et anticorps neutralisants ciblant l'enveloppe du VIH-1.

L'énorme diversité du VIH-1 au niveau mondial constitue l'un des plus grands défis pour le développement d'un vaccin efficace. Des récentes recherches ont souligné l'importance des anticorps spécifiques ciblant l'Env du VIH-1 et le contrôle virologique par médiation de lymphocytes T CD8+ mais la stratégie optimale pour affronter la diversité de séquence du VIH-1 demeure inconnue. [271]. Plusieurs stratégies traditionnelles pour la vaccination contre le VIH ont été tentées à ce jour : vaccin avec virus inactivé, vaccin vivant atténué [210], les candidats de vaccins sous forme de protéines structurales en forme native ou dénaturisée, pseudo-virions (virus-like particles: VLP), vaccins sous-unitaires à base de protéines, vaccins recombinants peptides simples, vaccins à ADN plasmidique et vaccins vivants recombinants utilisant des vecteurs viraux ou bactériens qui favorisent l'induction de réponses immunitaires cellulaires [271-273].

Les résultats prometteurs de l'essai clinique de phase III (RV144) mené en Thaïlande en 2009 avec le vaccin vivant recombinant ALVAC-HIV ® (vCP1521) et stimulé après avec VaxGen gp120 B/E (AIDSVAX ® B/E) ont révélé une efficacité de 31.2% en terme de prévention des infections. Cet essai a donné un nouvel espoir de trouver un vaccin anti-VIH [274].

Historiquement, les premières tentatives de vaccination avec des antigènes à base de l'Env du VIH-1 ont utilisé la gp120 monomérique. Les réponses humorales qui ont été obtenues étaient relativement faibles et les anticorps neutralisants étaient dirigés contre un spectre très limité de souches virales sensibles, lesquelles ne représentent pas la majorité des souches circulants. Malgré les efforts de plus de deux décennies, les immunogènes à base de la boucle V3 n'ont pas réussi à induire une réponse d'anticorps neutralisants robuste. L'explication la plus probable est que la boucle V3 n'est pas bien exposée dans la conformation de l'Env de VIH-1 non liée au CD4. Les analyses de liaison de l'anticorps chez les animaux immunisés avec de la gp120 monomérique ont révélé une forte liaison à la gp120 monomérique mais très faible liaison à l'Env trimérique [275].

Des mutations au niveau de l'enveloppe pourrait causer des changements structuraux de l'structure tertiaire de l'enveloppe qui exposeraient des épitopes de neutralisation qui ne sont pas normalement exposés dans l'structure native. Les anticorps monoclonaux sert pour étudier l'impact des mutations sur la structure tertiaire de l'enveloppe [133].

Dans une étude d'association entre la résistance virale aux anticorps neutralisants à large spectre et le tropisme virale Pfeifer et collaborateurs ont trouvé une association statistiquement significative entre la résistance virale aux anticorps PG9, PG16 et le tropisme X4. L'analyse des

virus traités avec l'anticorps PGT128 a indiqué que certains anticorps peuvent conduire une population virale vers le développement du tropisme CXCR4. Ces résultats ont mis en évidence l'importance de tenir compte d'un biais de l'utilisation de corécepteur dans l'analyse de l'efficacité d'un vaccin contre le VIH et dans l'utilisation passive des anticorps comme approche thérapeutique [276].

Plusieurs anticorps monoclonaux neutralisants de large spectre bNmAbs, de l'anglais broadly Neutralizing monoclonal Antibodies, ayant une activité de neutralisation puissante contre un grand nombre de souches virales ont été isolés récemment. Certains de ces anticorps neutralisent jusqu'à 90% des souches circulantes, ce qui témoigne d'une grande conservation des épitopes des différentes souches [277].

Certains anticorps sont dirigés contre le site de liaison de CD4 (CD4bs) de la gp120. L'anticorps monoclonal b12 empêche la fixation de la gp120 sur le CD4. Cet anticorps possède une région CDRH3 inhabituellement longue en forme de doigt qui lui permet d'obstruer la cavité du site de liaison au CD4. Récemment de nouveaux anticorps monoclonaux humains neutralisants à large spectre, dirigés contre le site de liaison au CD4, ont été isolés à partir de donneurs VIH-1 positifs. Il s'agit des anticorps VRC01, VRC02, VRC03 et NIH45-46. VRC01 est capable de neutraliser environ 90% du virus VIH-1 circulant et peut induire des changements conformationnels dans le monomère de la gp 120 similaires à ceux induits par le CD4 [278]. L'analyse de l'interaction de VRC01 avec la gp120 montre qu'il couvre 98% du site cible comprenant 1 089 Å² du domaine externe de gp120, environ 50% de plus que la surface utilisée par le CD4 730 Å². La surface de contact de VRC01 est essentiellement limitée au domaine externe et évite les zones de flexibilité conformationnelle [250]. NIH45-46 est une variante plus

puissante du VRC01 isolé du même donneur. Cependant, cet anticorps comprend une insertion de résidus dans les quatre CDRH3 acquis par hypermutation somatique. La surface de liaison primaire est le domaine extérieur, y compris la boucle de liaison au CD4, la boucle D, et la boucle V5. La différence la plus notable entre VRC01 et NIH45-46 est l'insertion de quatre résidus (résidus 99a-99d) au niveau de CDRH3 [279].

L'anticorps monoclonal largement neutralisant, HGN194, est dirigé contre le site de liaison au corécepteur de la gp120 (corécepteur CCR5 ou CXCR4). Il reconnaît un épitope linéaire conservé dans la région variable V3 situé au sein du domaine d'interaction avec CCR5 ou CXCR4. Le site de liaison au corécepteur est très immunogène, cependant il est exposé de façon transitoire, lors de la fusion des membranes virale et cellulaire, après la liaison de la gp120 au CD4, ce qui limite fortement son accessibilité [280].

Certains anticorps neutralisants à large spectre comme 4E10, 2F5 et Z13 ciblent des épitopes au niveau de la gp41 [281]. L'anticorps 2F5 possède une forte activité neutralisante contre une grande quantité d'isolats primaires du VIH-1. L'épitope ciblé est une séquence de six acides aminés (ELDKWA) située près de l'extrémité C-terminale de l'ectodomaine de la gp41, à proximité du domaine transmembranaire. Ce segment de la gp41 représente une des rares régions du complexe de glycoprotéine de l'enveloppe accessible aux anticorps. La séquence ELDKWA est assez bien conservée parmi les souches de VIH-1 [281]. Plus tard, NEQELLELDKWASLWN a été identifiée comme un épitope fonctionnel reconnu par un anticorps neutralisant également compatible avec les structures et les fonctions de 2F5 [282]. L'anticorps 4E10 est capable de neutraliser une gamme extrêmement large d'isolats primaires chez pratiquement tous les sous-types. Son épitope NWFDIT est situé sur l'ectodomaine de la

gp41[283]. L'anticorps humain Z13 est dirigé contre des épitopes adjacents hautement conservés dans le MPER de la sous-unité gp41 de la glycoprotéine d'Env [284].

Un anticorps monoclonal humain largement neutralisant, l'anticorps 2G12, qui reconnaît un épitope conformationnel impliquant des N-glycanes relativement conservés a été identifié à partir des cellules mononucléées du sang périphérique de sujets VIH-1 positifs asymptomatiques, à cause de sa structure inhabituelle lui permettant une interaction de plus forte affinité qu'un anticorps classique [216].

Deux anticorps monoclonaux neutralisants de large spectre, le PG9 et le PG16, lesquels reconnaissent un épitope exprimé exclusivement sur la glycoprotéine d'enveloppe trimérique, ont été générés à partir de lymphocytes B d'un donneur africain dont le sérum contenait des anticorps neutralisants à large spectre [285-287].

La caractérisation de ces anticorps largement neutralisants dans les sérums de sujets infectés est importante pour connaître leur structure afin d'orienter la conception d'immunogènes potentiels pour le développement de vaccins présentant les épitopes majeurs de neutralisation [288]

1.7.1.2.7 Les inhibiteurs de CCR5 comme candidats dans le développement de microbicides et autres stratégies de type prophylaxie pré-exposition (PrEP)

La PrEP consiste à administrer des antirétroviraux à des individus à haut risque d'infection par le VIH dans le but d'empêcher l'infection. Les médicaments utilisés pour la PrEP peuvent être administrés par différentes voies : orale, gel rectal/vaginal (généralement appelés microbicides) ou par injection [184]. La combinaison de Ténofovir et d'Emtricitabine (Truvada) a été approuvée aux États Unis et au Canada pour les hommes homosexuels et les hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes (HSH) [95] ainsi que pour les hommes et les femmes hétérosexuels qui sont à haut risque de transmission sexuelle du VIH [93]. Des études sont en cours pour évaluer de nouveaux schémas d'administration et de nouveaux antirétroviraux à longue action.

Les microbicides sont des médicaments topiques intravaginaux et intrarectaux conçus pour diminuer les risques de transmission du VIH lors de rapports sexuels. Les microbicides peuvent être formulés sous forme de gels semi-solides, de crèmes vaginales, de films ou de tablettes [289]. Un microbicide idéal doit être non seulement efficace, sécuritaire et convivial mais également abordable dans les pays à ressources limitées [213]. Le succès ou l'échec d'un microbicide est déterminé par la pharmaco-cinétique du produit, l'activité antivirale et la toxicité potentielle du produit. Les concentrations du produit varient de façon importante dans le tractus génital après l'administration orale. Par exemple, la concentration de MVC dans le liquide cervico-vaginal est presque deux fois plus élevée que son niveau plasmatique supportant son utilisation comme microbicide [290].

Cinq types de microbicides topiques ont été évalués à ce jour. On peut les catégoriser en fonction de leur mode et le site d'action : 1- les microbicides à base de surfactants perturbateurs de membrane 2- les microbicides protecteurs de milieu, 3- les microbicides utilisant des antirétroviraux agissant après l'entrée du VIH chez les cellules hôtes, 4- les microbicides composés d'inhibiteurs d'entrée du VIH et 5- les microbicides avec des mécanismes d'action inconnu. Les premières études de microbicides basés sur les surfactants comme le Nonoxyl 9 ont été décevantes, démontrant une augmentation du risque d'infection probablement associée à la toxicité des produits [289].

Le ténofovir, a été le premier médicament antirétroviral à démontrer sa capacité comme microbicide dans des modèles animaux en prophylaxie pré et post-exposition contre la transmission sexuelle du VIH-1. Il a par la suite été évalué en tant que microbicide vaginal lors d'essais cliniques. Une preuve de concept de l'efficacité du ténofovir en gel microbicide pour prévenir l'infection par le VIH a été établie par l'étude CAPRISA 004 qui a montré une protection de l'ordre de 39%. L'étude VOICE MTN-003, qui a testé l'utilisation de trois différentes stratégies de prévention du VIH chez les femmes : le gel de ténofovir 1%, le ténofovir oral et le TDF/FTC, n'a pas montré de problèmes de sécurité liés à l'utilisation des trois produits testés. Toutefois, des résultats préliminaires ont montré qu'aucun produit n'était efficace par rapport aux placebos pour réduire le risque d'infection. À cause des grandes quantités de données recueillies lors de cette étude les résultats des analyses seront disponibles dans les prochains mois [289]. Deux autres essais cliniques sont en cours, l'étude FACTS sur le gel ténofovir 1 % ainsi qu'une étude qui teste l'innocuité d'un anneau vaginal à base de dapivirine [291].

Les inhibiteurs d'entrée sont des candidats potentiellement intéressants pour l'utilisation sous forme de microbicides. Des polymères qui bloquent l'attachement et la fusion des membranes virales et cellulaires sont à l'étude. Grâce à leur charge négative, les polymères anioniques interagissent avec les protéines d'enveloppe virale et interfèrent avec la fixation du virus aux cellules cibles [289]. Le composé CMPD167 à base de cyclopentane protège les macaques dans un modèle d'infection vaginale par le virus à tropisme R5 SHIV-162P3 et agit en synergie avec d'autres inhibiteurs [292].

L'inhibiteur de CCR5 MVC a été évalué comme microbicide vaginal dans un modèle d'infection de macaques rhésus avec des virus R5 (SHIV-162P3). Les résultats montrent une protection dose-dépendante [293]. MD3100 et TAK779 offrent quant à eux une protection incomplète. L'inclusion de l'anticorps b12 et l'IgG2 anti-CD4 qui ciblent la gp120 réduit l'infection des cellules T et des cellules dendritiques de plus de 95 % dans des cultures cellulaires [289].

C52L, un peptide inhibiteur de la fusion virale médiée par gp41, est un inhibiteur puissant de l'infection virale et reste actif contre des souches de VIH-1 résistantes. Son efficacité a été confirmée contre le VIS [294]. Un inhibiteur de fusion, la cyanovirine-N, une lectine purifiée à partir d'une cyanobactérie qui inactive irréversiblement diverses souches de VIH a été évalué dans des essais cliniques de Phase I comme microbicide topique [295]. La cyanovirine-N inhibe la liaison de la gp120 au CD4, au corécepteur CCR5 et la fusion membranaire entre la cellule hôte et le VIH. Elle contient deux sites de liaison d'hydrate de carbone d'affinités différentes qui se lient sélectivement avec une affinité nanomolaire pour les structures de mannose man8 D1D3 et Man9. La cyanovirine-N se lie à la glycoprotéine d'enveloppe virale gp120 du VIH-1 avec une affinité nanomolaire, et la liaison est médiée par ces mêmes interactions de l'oligomannose

[288]. Différentes formulations de cyanovirine-N, comprenant celles exprimées par les lactobacilles, sont en cours de développement [296]. Le carraghénane, un polysaccharide sulfaté est un microbicide vaginal dérivé d'une algue rouge. Il bloque l'infection des cellules épithéliales du col utérin et des macrophages. Les résultats suggèrent qu'il est sécuritaire mais son efficacité est mise en doute, le nombre d'infections se produit à un niveau similaire que dans le groupe placebo [297] .

Le PRO2000 est un polymère sulfoné qui lie la gp120, le CD4 et le corécepteur CXCR4 sur la surface cellulaire et interfère avec l'entrée du VIH. Il possède une activité *in vitro* contre les souches à tropisme X4 et R5 du VIH [297]. Une autre approche prometteuse est l'utilisation d'inhibiteurs d'entrée dendrimères comme microbicides. Les dendrimères sont des macromolécules hautement ramifiées synthétisées à partir d'un noyau polyfonctionnel, avec des branches intérieures et des groupes de surface adaptés à des objectifs spécifiques [289, 298].

1.8. Résistance aux médicaments contre le VIH-1

Malheureusement, le VIH-1 ne peut être éradiqué par la thérapie en raison de l'existence des réservoirs viraux [299]. Les patients qui reçoivent une multithérapie doivent donc rester sous traitement tout le long de leur vie et faire face aux effets secondaires et à l'émergence des virus résistants [300].

La résistance du VIH-1 aux antirétroviraux est définie comme la capacité du virus à se répliquer malgré la présence d'un médicament antirétroviral. Elle résulte de la présence de mutations dans le génome viral [263]. Des mutations sont sélectionnées au niveau des gènes codant les

protéines cibles des antirétroviraux comme la transcriptase inverse (TI), la protéase (PR), l'intégrase (IN) ou la gp41. Les protéines modifiées deviennent résistantes aux antirétroviraux concernés [301].

Les raisons possibles de l'échec virologique d'un traitement antirétroviral sont les taux plasmatiques sous-optimaux ou inadéquats de médicaments, la non adhérence aux médicaments (en raison d'un certain nombre de facteurs), les interactions médicamenteuses négatives, la résistance préexistante aux médicaments et la résistance acquise aux médicaments [302].

La barrière génétique à la résistance est définie par le nombre de mutations nécessaire pour que le virus surmonte la pression sélective d'un médicament et devienne résistant à celui-ci. Les régimes thérapeutiques avec une haute barrière génétique à la résistance nécessitent un plus grand nombre de mutations pour rendre le traitement inefficace. Les régimes thérapeutiques avec une faible barrière génétique à la résistance sont ceux qui nécessitent moins de mutations critiques pour rendre le traitement inefficace. A titre d'exemple, les régimes contenant trois inhibiteurs de la transcriptase inverse : abacavir [ABC], lamivudine [3TC], et ténofovir [TDF], et didanosine [ddI], 3TC et TDF ont été associés à des échecs précoces compte-tenu de l'impact de la mutation M184V sur l'efficacité du 3TC [303].

La résistance peut être classée comme résistance primaire qui est définie comme étant la résistance observée chez les individus infectés par le VIH nouvellement diagnostiqués et naïfs de traitement chez qui la résistance est due à la transmission d'une souche de VIH-1

pharmacorésistante. La résistance secondaire est définie comme la résistance émergente chez les personnes recevant déjà un traitement [301].

La résistance naturelle indique l'absence de sensibilité d'un virus aux antirétroviraux, comme c'est le cas des INNTI qui n'ont pas d'activité sur le groupe O du VIH-1 et sur le VIH-2. Ils sont des porteurs naturels d'un polymorphisme, T181C/I (tyrosine→cystéine/isoleucine) ou T188L (tyrosine→Leucine) qui résulte en résistance naturelle aux INNTI [304].

La résistance croisée est définie comme la résistance aux médicaments auxquels le virus n'a jamais été exposé. Elle est le résultat des mutations qui ont été sélectionnées par l'utilisation d'un autre médicament. Elle est en général limitée aux molécules au sein d'une classe d'agents antirétroviraux. Toutes les classes de médicaments sont concernées [301].

Comme pour toutes les classes d'antirétroviraux, le VIH-1 peut également développer une résistance aux petites molécules inhibitrices de CCR5 [305].

1.8.1 Résistance aux inhibiteurs de CCR5

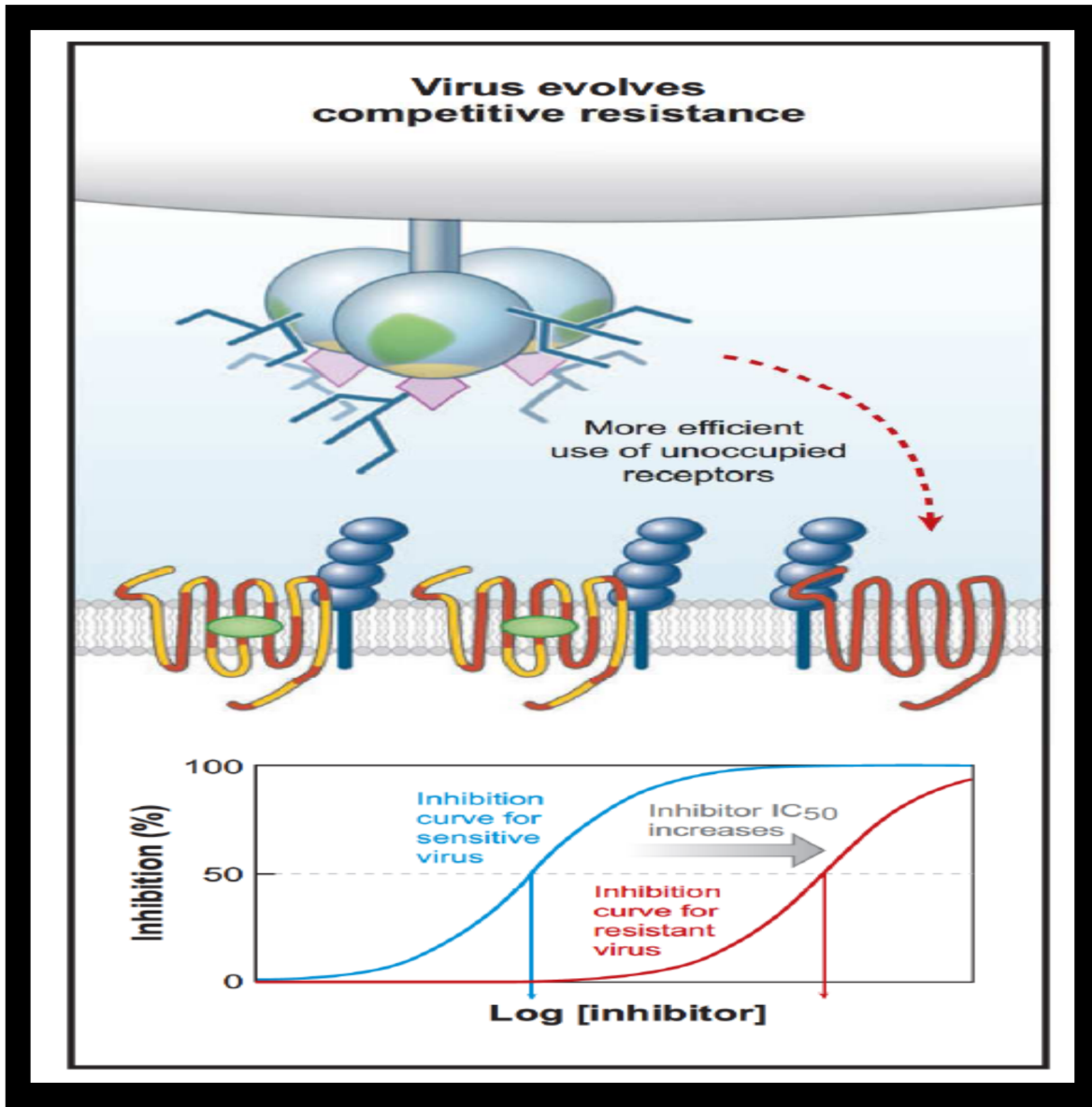
1.8.1.1 Résistance aux inhibiteurs de CCR5 *in vitro*

Le mode le plus intuitif de résistance à un inhibiteur CCR5 serait d'évoluer vers l'utilisation d'un corécepteur alternatif se manifestant par le changement de tropisme R5 vers X4. Cependant, quand un isolat primaire R5 est soumis à la pression de sélection d'un inhibiteur de CCR5 dans des cellules primaires, les virus résistants gardent habituellement le phénotype R5 même lorsque le CXCR4 est disponible en abondance. L'explication la plus plausible de ce résultat

paradoxal est que les variantes transitoires vers l'acquisition du phénotype CXCR4 ont une capacité répliquative inférieure au virus de départ et/ou sont plus sensibles au médicament de sélection utilisé [305]. À ce jour, les données sur la résistance aux inhibiteurs de CCR5 démontrent davantage des mécanismes de résistance qui n'impliquent pas de changement de tropisme soit la résistance compétitive et la résistance non compétitive par analogie avec l'inhibition enzymatique compétitive et non compétitive. L'action d'un antagoniste compétitif est réversible et peut être surmontée en augmentant la dose de l'agoniste. L'agoniste et l'antagoniste se lient au même site sur le récepteur [202]. Cela permet d'obtenir une courbe dose-réponse qui se déplace vers la droite. Le plateau maximal d'inhibition reste inchangé (MPI). Le degré de déplacement de la courbe vers la droite est lié à l'affinité de l'antagoniste et à la dose utilisée. Quand la dose est élevée, plus d'agoniste est nécessaire pour vaincre la réponse. Dans le cas où l'antagoniste a plus d'affinité il y a plus de décalage de la courbe (l'affinité est la force de l'interaction antagoniste-récepteur) et donc plus d'agoniste est nécessaire pour bloquer cette interaction. Dans le cas des inhibiteurs de CCR5, la résistance compétitive découle d'une augmentation d'affinité pour le CCR5 ou de l'acquisition d'une cinétique de fusion plus rapide après l'engagement du CCR5. [192]. Elle se traduit par une augmentation de l'IC50 de l'inhibiteur (Figure 24).

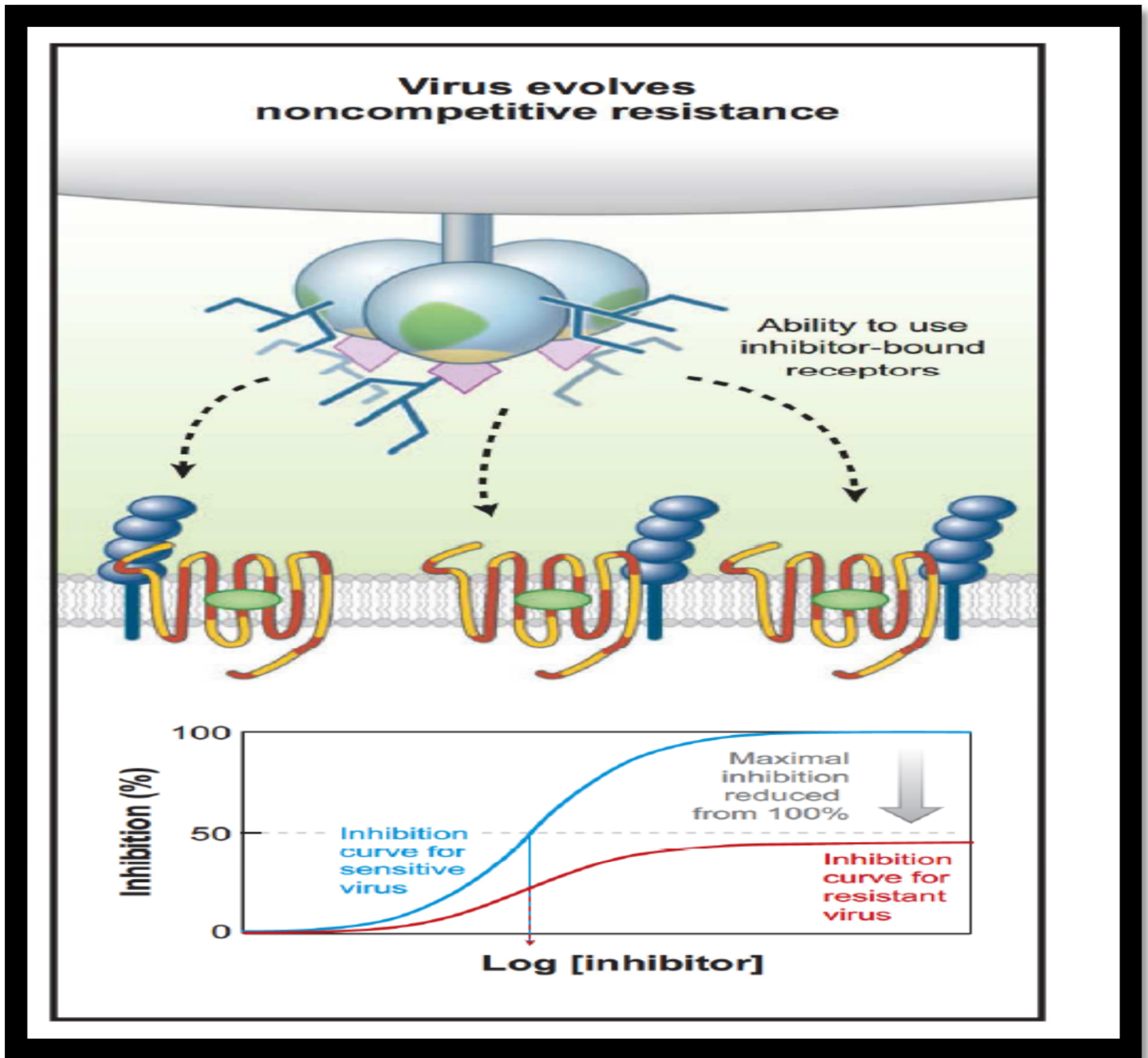
Figure 24. Résistance aux inhibiteurs du corécepteur CCR5.

La résistance compétitive.



Les changements dans la structure Env permettent au virus de faire un usage plus efficace des récepteurs inoccupés. Des concentrations plus élevées d'inhibiteur sont indispensables pour atteindre les niveaux d'occupation du récepteur nécessaires pour l'inhibition. Cela a pour effet d'augmenter la valeur IC_{50} de l'inhibiteur, l'inhibition maximale est toujours possible. Reproduit avec la permission de [192].

Figure 25. Résistance aux inhibiteurs de corécepteurs.
La résistance non compétitive.



Des changements dans l'env permettent au virus d'utiliser des récepteurs occupés mais avec une efficacité moindre que les récepteurs inoccupés. Cela a pour effet de réduire l'inhibition maximale de 100%. La valeur d'IC50 est inchangée. Reproduit avec la permission de [192].

Dans le cas de la résistance non compétitive (Figure 25), les antagonistes non compétitifs ou allostériques se lient sur le récepteur dans un site différent du site de l'agoniste. L'action d'un antagoniste non compétitif ne peut pas être surmontée par l'augmentation de la dose d'agoniste parce que les sites de liaison agonistes et antagonistes sont différents, donc l'agoniste ne déplacera pas la molécule d'antagoniste. Cet effet donne une courbe dose-réponse qui ne se déplace pas vers la droite [201, 202].

Les valeurs d'IC50 d'un inhibiteur sont équivalentes à celles du virus sensible. La résistance est mise en évidence par la détermination du plateau des courbes d'inhibition du virus en dessous de 100 % d'inhibition. L'ampleur de la réduction de la hauteur du plateau peut être quantifiée comme le pourcentage d'inhibition maximale (MPI ou maximal percentage of inhibition). Dans le cas des inhibiteurs de CCR5 ce reflète la capacité de la gp120 à reconnaître la conformation du CCR5 liée à l'inhibiteur. Par exemple, le MPI peut être élevé (> 80 %) ce qui signifie une capacité relativement inefficace de la gp 120 à utiliser le corécepteur CCR5 lié à l'inhibiteur. Un MPI faible (< 20 %) signifie la capacité relativement efficace de la gp120 à utiliser le CCR5 lié à l'inhibiteur [18]. Il est peu probable que ce type de résistance émerge suite à la pression sélective d'un inhibiteur compétitif . Il semblerait plus probable pour les inhibiteurs allostériques qui induisent des conformations CCR5, qui ne sont généralement pas compatibles avec l'activité du corécepteur [192]. Il existe deux types d'inhibitions compétitives (pure et mixte). Dans la pure la liaison de l'inhibiteur n'as pas d'effect sur la liaison du agoniste, mais dans la mixte la liaison de l'inhibiteur au récepteur peut causer un changement de conformation qui répercute sur le site de l'agoniste. Cette dernière est la plus fréquente [200].

Génotypiquement la résistance a été associée à une variété de mutations d'acides aminés tout le long du gène *env* qui impliquent le plus souvent la boucle V3, mais dont l'effet sur la sensibilité aux médicaments dépend du squelette d'Env dans lequel ils sont introduits. Quand l'isolat CC1/85 et l'isolat RU570 du sous-type G ont été cultivés en présence de maraviroc, une résistance complète est survenue après 16 et 18 passages, respectivement. Les changements dans V3 expliquaient la résistance des deux virus : les substitutions A316T et I323V ont affecté le phénotype de CC1/85, et une délétion de trois résidus (Δ QAI au niveau des résidus 315-317) était responsable de la résistance pour RU570 [306]. Lors d'une étude de résistance avec la molécule AD101, un précurseur de vicriviroc, quatre changements d'acides aminés ont été cartographiés dans la boucle V3 de la gp120 : le polymorphisme H308P a rapidement été sélectionné, puis trois substitutions *de novo* (K305R, A316V, et G321E) ont eu lieu successivement et étaient suffisantes pour conférer une résistance complète [305].

Au niveau moléculaire, le modèle actuel suggère que la gp120 se lie à CCR5 sur deux sites distincts : le feuillet de liaison et les résidus sur la tige et à la base de V3 lient la tyrosine-sulfaté N-terminale de CCR5. La couronne de V3 interagit avec la région extracellulaire 2 ECL2 de CCR5 [307]. Les inhibiteurs de CCR5 peuvent affecter principalement la conformation ECL2, et les virus résistants deviennent plus dépendants de l'interaction avec l'extrémité N-terminale de CCR5. Des changements de séquence d'*env* des variants résistants pourraient directement ou indirectement modifier la conformation de la boucle V3, de sorte que sa couronne n'a plus besoin d'interagir avec la région ECL2 de CCR5 pour médier l'infection [305].

Le principal mécanisme de résistance au MVC et au VCV semble être la capacité du virus à utiliser le corécepteur CCR5 indépendamment de sa liaison au maraviroc à la suite de la

sélection de plusieurs mutations dans la boucle V3 de la gp120 [261, 308]. Ceci rend le virus plus dépendant de l'extrémité N-terminale de CCR5 [309] par rapport aux virus présentant des mutations dans d'autres régions de la gp120 ou gp41 qui ont aussi été décrits [310, 311]. Aucune résistance croisée n'a été documentée parmi les inhibiteurs de CCR5 [269, 312].

1.8.1.2. Résistance aux inhibiteurs de CCR5 *in vivo*.

Dans une étude de phase 3 d'un traitement avec le MVC et un traitement de base optimisé (TBO) chez des patients traités avec seulement des virus R5 présents au début de l'étude (MOTIVATE 1 et 2), des virus X4 ou D/M ont été détectés chez 76/133 (~ 57%) des sujets qui ont échoué au traitement, comparativement à seulement 6/95 (~ 6%) qui ont échoué au TBO plus le placebo [313]. Dans un essai de phase 3 chez des sujets naïfs au traitement (MERIT), les virus X4 ont été détectés à l'échec virologique dans 10/35 (31%) des participants recevant le maraviroc en tant que traitement de première intention [54, 314].

L'émergence de la résistance au VCV a été évaluée dans une étude de phase 2 chez des sujets naïfs au traitement (P03802) et des sujets expérimentés au traitement (ACTG5211 et P03672/VICTOR-E1) [315, 316]. Dans l'essai ACTG5211, seulement un sujet a développé de la résistance au VCV pendant le traitement, et l'isolat résistant possédait plusieurs changements dans la boucle V3. Toutefois, ces changements ont été associés à une perte de la capacité répliquative du virus. Les virus susceptibles au VCV ont réapparu après l'arrêt du traitement. Dans les essais cliniques P03802 et P03672, les virus de 4 et 5 sujets ont développé la résistance phénotypique au VCV, respectivement et ce malgré le fait que l'étude P03802 fut arrêtée prématurément en raison d'un taux d'échec élevé dans les groupes à faible dose. L'analyse des

virus des 4 sujets de P03802 n'a pas réussi à identifier des mutations dans la gp160 associée à la résistance au VCV [317].

1.8.2 Résistance aux inhibiteurs de CXCR4.

La résistance aux inhibiteurs de CXCR4 est moins bien documentée que la résistance aux inhibiteurs de CCR5. Des mutations dans la boucle V3 de la gp120 et dans d'autres régions de la gp120 de VIH-1 (V1, V2 et V4) ont été associées à la résistance aux inhibiteurs de CXCR4 [318-320], y compris une suppression de cinq acides aminés dans le domaine V4 [238].

1.8.3 Résistance aux inhibiteurs de fusion

Le mécanisme de résistance à l'enfuvirtide (T20) est associé à l'apparition de mutations dans sa partie HR1 au niveau des acides aminés 36 à 45. Ces mutations empêchent la liaison de la molécule. Elles incluent: Q40H/K/P/T, N42D/T, N43D/K/S, N42T+N43S, L44M et L45M [205].

1.8.4 Évaluation de la résistance

La résistance à un médicament est le résultat de mutations au niveau d'un nombre limité de positions dans le gène codant pour la protéine ciblée par le médicament d'intérêt. En raison de l'énorme quantité de données disponibles sur les mutations donnant lieu à une résistance, il est possible de déduire le niveau de résistance phénotypique qui est la mesure directe de la sensibilité des virus directement par la culture du virus en présence de concentrations

croissantes de la molécule d'intérêt. Les lignes directrices québécoises ainsi que celles du département américain de services et de santé et sociaux (DHHS), de la société internationale de SIDA et les directives européennes recommandent d'effectuer un test de résistance à différents moments du suivi: en primo-infection, avant l'initiation du traitement, lors d'un échec thérapeutique, dans le cas d'une femme enceinte avec virémie, etc. [285-287].

La méthode phénotypique analyse l'inhibition de la réplication virale en présence de concentrations croissantes du médicament générant ainsi une courbe dose-réponse sigmoïdale qui représente la concentration de la molécule qui inhibe la réplication virale de 50 % (IC50). L'IC50 d'un médicament ne traduit pas l'activité *in vivo* du médicament parce que l'inoculum du virus et les cellules utilisées dans un test phénotypique souvent ne reflètent pas les conditions *in vivo*. Les tests de sensibilité phénotypique déterminent l'activité antivirale d'un médicament par rapport à la souche sauvage [280, 285].

Trois tests phénotypiques commerciaux sont disponibles: PhenoSense de Monogram Biosciences, Antivirogram de Virco et Phenoscript de Eurofilm. Le test PhenoSense mesure directement la sensibilité des virus des patients aux inhibiteurs de transcriptase inverse et de protéase. Tout d'abord les gènes *gag* et *pol* sont amplifiés

à partir d'un échantillon de plasma du patient. Le segment est cloné dans un vecteur viral avec le gène rapporteur luciférase. Les virus recombinants sont transfectés dans des cellules et les particules virales sont recueillies après la transfection et utilisées pour infecter des cellules cibles. Des dilutions sériées des inhibiteurs de TI et PR sont ajoutées à l'étape de l'infection. La sensibilité aux médicaments est mesurée en comparant l'activité de luciférase produite en présence et en l'absence de la drogue. Les virus sensibles produisent des faibles niveaux

d'activité de luciférase en présence des inhibiteurs de la TI et PR, alors que les virus présentant une sensibilité réduite à ces médicaments produisent des niveaux plus élevés d'activité luciférase. Le principal avantage des tests phénotypiques est qu'ils mesurent directement la sensibilité aux médicaments et offrent l'avantage important de mesurer les effets cumulatifs des mutations complexes. Leur évaluation ne dépend pas des algorithmes ou des bases de données. Ils sont capables de démontrer les effets de combinaisons complexes de mutations. Les principales limites des tests de phénotypage sont la longue durée d'obtention des résultats et les coûts [280].

Une autre méthode pour mesurer la résistance aux médicaments est le test génotypique qui est fondé sur l'analyse des séquences des gènes viraux (protéase, transcriptase inverse, intégrase, et enveloppe) ciblés par la thérapie. La détermination du génotype est l'approche standard pour évaluer la résistance en clinique. La séquence des acides aminés est comparée soit à la séquence d'une souche de type sauvage ou d'une séquence d'acides aminés consensus de type sauvage. Les différences entre la séquence d'un isolat clinique et la séquence de type sauvage de référence génèrent une liste de mutations. Chaque mutation est désignée par une lettre de l'acide aminé de type sauvage, suivie de la position de l'acide aminé, suivie par la lettre de la mutation présente dans la séquence. Par exemple, la mutation de la TI M184V indique qu'il y a une Valine (V) au lieu d'une méthionine (M) à la position 184 du virus séquencé. Parce que le séquençage direct est réalisé sur une population de virus, il n'est pas rare de détecter plus d'un acide aminé à une position. Par exemple la notation M184M/V veut dire que M et V ont toutes deux été détectées à la position 184. Il y a une dizaine de systèmes d'interprétation du profil mutationnel couramment utilisés. D'autres méthodes utilisées aujourd'hui sont le pyroséquençage lequel permet de séquencer les populations minoritaires de quasi-espèces

virales et la PCR allèle spécifique laquelle est utilisée pour la recherche de mutations ponctuelles [280].

Le phénotypage virtuel est une intégration des deux premières approches. Le virus à analyser est séquencé et les mutations sont identifiées et comparées à une base de données génotypique/phénotypique composée de virus préalablement séquencés pour lesquels le phénotype est connu. Les résultats du phénotype virtuel sont rendus comme une estimation calculée d'un phénotype théorique. La fiabilité de cette méthode est mise en doute quand le profil génotypique est rare [280, 288].

1.9 Interactions médicamenteuses.

Les médicaments produisent des effets thérapeutiques par différents mécanismes, par exemple en interagissant avec les enzymes intracellulaires, la synthèse protéique ou nucléique, le transport membranaire et/ou les récepteurs cellulaires. Un récepteur cellulaire est une protéine de surface ou intracellulaire qui va reconnaître une molécule de manière spécifique et permettre sa fixation. Cette molécule est appelée ligand. La liaison ligand-récepteur va provoquer un signal biologique lequel sera transmis à l'intérieur de la cellule par un mécanisme de transduction [321].

Lorsque un ligand se fixe sur un récepteur, il peut l'activer (agoniste) ou le bloquer (antagoniste) [322]. Un agoniste est un médicament qui se lie à un récepteur et produit une réponse fonctionnelle. Un antagoniste bloque l'effet d'un agoniste [323].

La combinaison des médicaments antirétroviraux a eu des nombreuses avancées dans le traitement contre le VIH pendant la dernière décennie. Elle a eu un grand impact sur la réduction de la morbidité et de la mortalité des personnes infectés. L'objectif de la combinaison des antirétroviraux est la suppression à long terme des niveaux d'ARN du VIH-1 plasmatique en dessous de 50 copies/ml chez les patients infectés par le VIH. La suppression virale est nécessaire pour contrôler l'évolution de la résistance aux médicaments, réduire l'activation immunitaire chronique, ainsi que la morbidité et la mortalité chez les patients. Elle permet aussi de réduire la transmission du virus résistant aux médicaments [324] .

L'utilisation de combinaison de molécules permet de viser des cibles multiples, plusieurs sous-populations virales ou cellulaires, ou plusieurs maladies simultanément. L'utilisation de médicaments ayant des mécanismes d'action différents permet de traiter les malades plus efficacement. A cause des avantages thérapeutiques, les combinaisons de médicaments ont été largement utilisées et sont devenues le premier choix pour le traitement des maladies comme le cancer et le SIDA [325].

Les interactions médicamenteuses peuvent être favorables ou défavorables. Elles peuvent altérer la pharmacocinétique ou la pharmacodynamique [326-328]. Les interactions affectant la pharmacocinétique peuvent être classées en interactions affectant l'absorption, la distribution et le métabolisme des médicaments. Les interactions affectant la pharmacodynamique comprennent des altérations dans la réponse pharmacologique des médicaments sans aucun changement dans les concentrations de médicaments. Lorsque deux ou plus médicaments sont utilisés en même temps l'effet pharmacologique peut être antagoniste, additif ou synergique [326-328].

Un effet antagoniste est observé quand l'effet de l'association des médicaments est inférieure aux effets individuels des médicaments. L'effet synergique est manifesté quand l'effet de l'association des médicaments est supérieure aux effets individuels des médicaments. L'effet aditif est obtenue quand l'effet de l'association des médicaments est égale aux effets individuels des médicaments.[325, 329].

Parmi les méthodes utilisées pour évaluer quantitativement les effets des interactions médicamenteuses on trouve la méthode de l'isobogramme, la méthode non linéaire, et l'index de combinaison (IC) [325, 330].

Nous avons utilisé dans nos travaux la méthode de l'IC décrite par Chou-Talalay sur la base de l'effet de drogues multiples. Cette méthode est basée sur l'équation de "l'effet médian", qui découle du principe de la loi d'action de masse. L'équation générale englobe les équations de Michaelis-Menten, de Hill, de Henderson-Hasselbalch, et de Scatchard de la biochimie et de la biophysique. Le modèle de l'effet médian décrit la relation dose-effet d'un médicament. Il prend la forme de l'équation $f_a/f_u = (D/D_m)^m$. Dans cette équation f_a est la fraction de la liaison (ou d'une infection) inhibée par un médicament, f_u est la fraction qui n'est pas inhibée, D est la dose de médicament, m un coefficient qui indique la forme de la courbe dose-réponse ($m = 1$ si la forme de la courbe est hyperbolique, $m < 1$ si est sigmoïde et $m > 1$ si est sigmoïde négative. D_m est la dose du médicament nécessaire pour obtenir un effet de 50% (par exemple l' IC50, [234, 331].

L'équation d'effet médian pour un seul médicament peut être étendue à de multiples médicaments, par exemple, une combinaison de deux médicaments. Dans un système du lorsque $m = 1$, nous obtenons la formule [234, 332] :

$(fa)_{1,2}/(fu)_{1,2} = fa_1/fu_1 + fa_2/fu_2 = (D_1/Dm_1)^m + (D_2/Dm_2)^m$ et lorsque $m \neq 1$, alors nous obtenons:

$$[(fa)_{1,2}/(fu)_{1,2}]^{1/m} = [fa_1/fu_1 + fa_2/fu_2]^{1/m} = (D_1/Dm_1) + (D_2/Dm_2)$$

Ces deux équations sont utilisées si les deux médicaments partagent des mécanismes d'action similaires (mutually non-exclusive). Si les deux médicaments ont des mécanismes d'action complètement différents (mutually exclusive), nous utilisons l'équation suivante [333]:

$$[(fa)_{1,2}/(fu)_{1,2}]^{1/m} = (D_1/Dm_1) + (D_2/Dm_2) + (D_1)(D_2)/(Dm_1)(Dm_2)$$

L'index de combinaison (IC) résultant de cette méthode sert à quantifier le degré d'interaction entre les médicaments en utilisant l'équation suivante : $IC = D_1/D_{x1} + D_2/D_{x2}$. Dans cette équation D_1 et D_2 sont les concentrations des médicaments 1 et 2 qui combinés produisent une inhibition de $x\%$, D_{x1} et D_{x2} sont les concentrations des 1 et 2 qui produisent le même effet d'inhibition de $x\%$. La valeur de l'index de combinaison ne précise pas la nature de l'interaction. Il offre une définition quantitative de l'effet additif ($IC = 1$), synergique ($IC < 1$), et antagoniste ($IC > 1$) [325, 329]. Cette méthode peut être utilisée grâce à des algorithmes automatisés comme CalcuSyn [334] et CompuSyn pour déterminer ces effets [335].

Nous avons utilisés CalcuSyn, ce logiciel peut facilement être intégré à d'autres logiciels. Les données peuvent être traitées à la fois pour les combinaisons de médicaments qui ont un rapport

constant ou non constant de médicaments. CalcuSyn représente automatiquement les données et produit des rapports donnant des statistiques et des sommaires sur tous les médicaments ainsi que l'analyse détaillée des interactions médicamenteuses. [234, 325].

1.9.1 Les combinaisons des inhibiteurs de CCR5 avec d'autres antirétroviraux.

Les inhibiteurs de CCR5 sont un groupe des médicaments destinés à être utilisés en association avec des antirétroviraux d'autres classes pour des raisons différentes. D'abord leur puissance intrinsèque démontrée dans les essais de monothérapie, leur quasi-blocage de la réplication virale et leur manque d'activité sur les souches X4. La combinaison de plusieurs classes limitera la sélection de souches résistantes [91]. La synergie a été observée avec les inhibiteurs de la transcriptase inverse, de la protéase [336], l'inhibiteur de fusion enfuvirtide [337] et avec l'anticorps monoclonal PRO140 qui se lie au CCR5 [336-338].

1.9.2 Les combinaisons d'inhibiteurs de CCR5.

Des combinaisons des inhibiteurs de CCR5 ont été rapportées dans la littérature. Nakata et collaborateurs ont étudié la combinaison d'AVC, TAK 779 et SCH-C. Ils ont observé un antagonisme lorsqu'ils combinaient SCH-C avec AVC et une synergie lorsque AVC était combiné avec TAK779 [339].

Murga et collaborateurs ont observé une puissante synergie en combinant l'anticorps monoclonal anti CCR5, PRO 140 avec MVC, VVC et TAK -779. Dans la même étude ils ont observé un effet additif en combinant MVC et VCV [338].

Notre groupe a trouvé une synergie entre SCH-C et AOP-RANTES ainsi qu'entre SCH-C et l'inhibiteur de fusion T-20 contre une large variété d'isolats cliniques R5 [337]. Dans une autre étude on a aussi constaté une synergie en combinant TAK- 220 et l'inhibiteur de fusion T -20 en présence de toutes les souches virales R5 testées à chaque concentration inhibitrice utilisée [336].

Hypothèse

de

Recherche

2. Hypothèse de recherche.

Le virus du VIH-1 est capable de développer une résistance aux inhibiteurs de CCR5 en utilisant deux voies importantes. La première est la sélection de populations minoritaires X4 préexistantes au début du traitement et la deuxième est la sélection de souches capables d'utiliser le corécepteur CCR5 pour l'entrée dans la cellule, en présence de l'inhibiteur. Dans ce modèle, des mutations au niveau de la boucle V3 provoquent une inhibition non compétitive ou allostérique. Cette inhibition est caractérisée par une réduction du pourcentage d'inhibition maximale (MPI ou «maximal percentage inhibition») qui reflète la capacité du virus à se lier au CCR5 occupé par l'inhibiteur. Un nombre limité d'études a également démontré que la résistance au MVC pouvait s'établir par un mécanisme compétitif caractérisé par des changements dans l'IC50. La boucle V3 est le déterminant principal du tropisme du VIH-1 et des changements d'acides aminés dans cette boucle affectent clairement la sensibilité aux inhibiteurs de CCR5. Toutefois, des changements d'acides aminés à l'extérieur de V3 contribuent également à la résistance à cette classe de molécules.

Dans ce contexte, nous avons formulé l'hypothèse que les mutations associées à la résistance identifiées dans plusieurs domaines de gp160 ont le potentiel d'altérer la structure quaternaire de l'enveloppe permettant aux souches résistantes l'utilisation du corécepteur CCR5 lié à l'inhibiteur. Nous prévoyons que la variabilité de l'enveloppe de différents isolats peut affecter les interactions entre deux inhibiteurs de CCR5 variant de la synergie à l'antagonisme, dépendamment des médicaments et des souches virales utilisés.

Dans le contexte de l'utilisation des inhibiteurs de CCR5 au sein de plusieurs régimes d'antirétroviraux, et leur potentiel d'utilisation comme microbicides, il est important de comprendre

les mécanismes de résistance à cette classe de médicament ainsi que les interactions prévisibles lors de l'utilisation en combinaison avec d'autres antirétroviraux afin de mieux les intégrer à l'arsenal thérapeutique.

Nous proposons trois objectifs pour tester notre hypothèse.

Objectifs

3. Objectifs

Objectif général:

Caractériser les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de CCR5 et déterminer leur rôle dans l'arsenal thérapeutique contre le VIH.

Objectifs spécifiques:

- Développer un test phénotypique pour la détermination du tropisme du VIH-1 et la détermination de la résistance phénotypique
- Caractériser les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de CCR5 de manière à éclaircir les changements induits par la pression de sélection de ces inhibiteurs et leurs implications dans la modification du tropisme viral.
- Caractériser les interactions *in vitro* des inhibiteurs de CCR5 afin d'évaluer s'ils peuvent être utilisés ensemble à l'intérieur d'un même régime thérapeutique ou de façon séquentielle.

Résultats

4. Résultats

4.1 Article 1. Ce travail a été publié dans le journal : Journal of Virological Methods. L'article est présenté ici dans sa version publiée [210]. **Journal of Virological Methods 204 (2014) 53-61**

Performance of a clonal-based HIV-1 tropism phenotypic assay

Odalis Asin-Milan ^{a,b}, Yi Wei ^a, Mohamed Sylla ^{a, b}, Farida Vaisheva ^c, Annie Chamberland ^{a,b},
Cécile L. Tremblay ^{a,b,d,*}

^aCentre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM), Montréal, Canada.

^bDepartment of Microbiology, Infectiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Canada

^c Department of Pharmacology, McGill University, Canada

^d Laboratoire de Santé Publique du Québec, Institut National de Santé Publique du Québec, Canada

Abstract

Adequate determination of HIV-1 tropism is important in clinical and research settings. Genotypic and phenotypic approaches to evaluate tropism have been described. Phenotypic assays are widely used to determine HIV-1 tropism because of their sensitivity to detect minor CXCR4-using variants (X4). However they cannot differentiate mixed quasi-species of R5 and X4 viruses from dual-tropic viruses. We describe here a clonal-based HIV-1 tropism phenotypic assay. Env-pseudo-typed viruses were produced by co- transfection of the env expression plasmid pcDNA3.1/V5HisTOPO and a backbone vector pNL4-3.Luc.E-R- that expresses the entire HIV-1 genome except for env and vpr in 293T cell cultures. Co-receptor use was tested by infecting U87.CD4.CCR5+ and U87.CD4.CXCR4+ cells in the presence or absence of co-receptor inhibitors, using 10 clones from each sample. The ability of the assay to detect minor variants in a viral population was assessed by mixing X4 and R5 clones using different ratios. Both R5 and X4 minority variants were detected when present at greater than 0.4% in a mixture of envelope populations. This assay can be useful in both clinical and research laboratories

Keywords: Tropism Luciferase assay Pseudovirus HIV Viral tropism Coreceptor usage CCR5 CXCR4

Corresponding author Dr Cecile Tremblay

1. Introduction

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) co-receptor tropism refers to the ability of the virus to enter host cells using either the CCR5 or CXCR4 co-receptors named R5 and X4 viruses, respectively (Westby and van der Ryst, 2005). Viruses that can use either CXCR4 or CCR5 are classified as dual-tropic or R5X4 viruses (Berger et al., 1998; Iwamoto et al., 2010; Moore et al., 2004). R5 and X4 viral quasi-species can coexist in a patient's plasma and are classified as mixed-tropic samples (Vandamme et al., 2011). CCR5 inhibitors are increasingly used for HIV treatment and are only active against R5 viruses. Maraviroc (MVC) is the first and only CCR5 inhibitor to be approved by the FDA in 2007 in treatment-experienced patients and in 2009 as a first-line drug in combination with others antiretrovirals. Current HIV treatment guidelines recommend HIV tropism testing when the use of a CCR5 inhibitor is considered (Guidelines, 2013; Rachlis et al., 2010; Vandekerckhove et al., 2011a). Several genotypic and phenotypic approaches to evaluate tropism have been described (Rose et al., 2009). Genotypic assays use information obtained from sequencing HIV envelope third variable (V3) region to predict viral tropism using various bioinformatic tools and algorithms (Fouchier et al., 1992; Resch and Swanstrom, 2001; Jensen et al., 2003; Pillai et al., 2003; Poveda et al., 2010). Next-generation sequencing provides increased sensitivity to detect minority variants. (Archer et al., 2009), but is still not widely used in clinical practice because of costs and the expertise needed (Poveda et al., 2012). Genotypic methods have shown good correlation with phenotypic tests. Although the predictive value of interpretative algorithms continues to improve, not all the genetic determinants of co-receptor usage reside in the V3 region, therefore affecting their ability to adequately predict tropism (Van Baelen et al., 2007; Vandekerckhove et al., 2011b). Furthermore, databases mostly comprise V3 loop sequences from subtypes B and C

viruses and most algorithms lack subtype-specific rules (Mulinge et al., 2013). Phenotypic assays are useful to determine HIV tropism to improve genotypic algorithms and to assess R5 viral resistance to CCR5 antagonists. Phenotypic recombinant assays are the gold standard tests to determine HIV-1 tropism because they have better sensitivity to detect minor X4 variants in various HIV-1 subtypes (Raymond and Izopet, 2012). Currently, the enhanced version of Trofile assay (Trofile-ES) from LabCorp, South San Francisco, CA is one of the most used phenotypic assays for determining co-receptor usage in clinical settings. It can detect X4 virus at 0.3% of virus population (Reeves et al., 2009). It uses env sequences obtained from plasma to construct pseudo-typed viruses, which are then used to infect human cell lines that stably express CD4 with either CXCR4 or CCR5 (Whitcomb et al., 2007). This assay has some limitations, such as its high cost, relative long turn-around time, limited availability, and the need for a viral load >1000 HIV RNA copies/ml (Gonzalez-Serna et al., 2010; Poveda and Soriano, 2010; Pfeifer and Lengauer, 2012). Also, it cannot distinguish between truly dual-tropic viruses and mixtures of R5- and X4-tropic viruses (Moyle et al., 2009) and sometimes generates non-reportable results (Genebat et al., 2009; Poveda et al., 2010). There is a need to improve current tropism assays not only to better predict treatment response to CCR5 inhibitors but also to monitor the emergence of drug resistance to this class of antiretrovirals. Clinical resistance to CCR5 inhibitors can evolve through two major pathways. Minority X4 populations present prior to the initiation of therapy can emerge under selective pressure (Westby et al., 2006; Gulick et al., 2007; Landovitz et al., 2008; Demarest et al., 2009; Kitrinou et al., 2009; Tsibris et al., 2009; Cooper et al., 2010; Roche et al., 2013). Alternately, resistant viruses can continue to use CCR5 despite the presence of the inhibitor. As viral resistance to CCR5 inhibitors usually results in cross-resistance to other investigational drugs in the same class (Tilton et al., 2010), a sensitive

phenotypic assay to detect minority X4 variants is important to support the development of new co-receptor inhibitors (Wilkin et al., 2007; Landovitz et al., 2008; Hardy et al., 2010; McNicholas et al., 2010, 2011). It is essential to better understand the role of tropism in HIV pathogenesis (Moyle et al., 2005; Hoffmann, 2007; Seclen et al., 2010; Ataher et al., 2012; Ng et al., 2013). We have developed a single-cycle assay based on clonal amplification of HIV-1 env gp 160 from HIV-infected individual's plasma. This assay is sensitive and detects R5 and X4 minority populations in 100% of the mixtures when they are present at a frequency of 0.4% or greater. It can be useful in both clinical and research laboratories.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines

Human kidney epithelial 293T cells and U87 cells were cultured in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 U of penicillin/ml, 0.1 mg of streptomycin/ml. For U87.CD4.CXCR4+ and U87.CD4.CCR5+ cells (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program Bethesda, Maryland, USA), 300 µg of G418 (Geneticin; GibcoBRL) per ml was added to the culture. Cells were maintained at 37 °C and 5% CO₂.

2.2. Reference viruses

HIV R5-tropic viruses (BAL and CC1/85), X4 tropic virus (IIIB) and the backbone vector pNL4-3.Luc.E-R- were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. Dual tropic virus (85.6) was kindly donated by Dr. Petronela Ancuta.

2.3. Patients

Plasma samples from 31 HIV-1 subtype B chronically infected patients experiencing treatment failure with non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor or protease inhibitor based regimens and naïve to CCR5 inhibitors, with viral load (VL) >500 copies/ml (determined with the Roche Amplicor HIV-1 Monitor test), were obtained from subjects attending HIV clinics in Montreal: Clinique L'Actuel, Clinique du Quartier Latin, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. We also used samples 6 harboring viruses from non-B subtypes, 1 AGG subtype, 2 CRF02_AG, 1 AK and 2 AGK subtype. This study was approved by the CRCHUM ethics' review committee.

2.4. Viral RNA isolation

HIV-1 RNA was extracted from patient's plasma and culture supernatants with QIAmp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). The samples were concentrated 3 times to obtain a final volume of 50 µl and stored at -80 °C for later use.

2.5. Amplification of the HIV envelope gene

Full-length gp160 was amplified. RNA was added as template to a polymerase chain reaction (PCR) master mix containing SuperScript III RT/Platinum Taq HiFi mix, 20 µM of forward and reverse primers: SG3-up: 5'-TACAGTGCAGGGGAAAGAATAA-3' and SG3-lo: 5'-AGACCCAGTACAGGCRARAAGC-3'. Amplification conditions were as follows: an initial 1 h cycle at 50 °C, followed by 2 min cycle at 94 °C for denaturation; 35 cycles with three steps (15 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, 5 min at 72 °C); and a final extension cycles for 10 min at 70 °C, 10 min at 4 °C and 10 min at 12 °C. The PCR products were then submitted to a nested PCR using 20 µM forward and reverse primers Env-up: 5'-

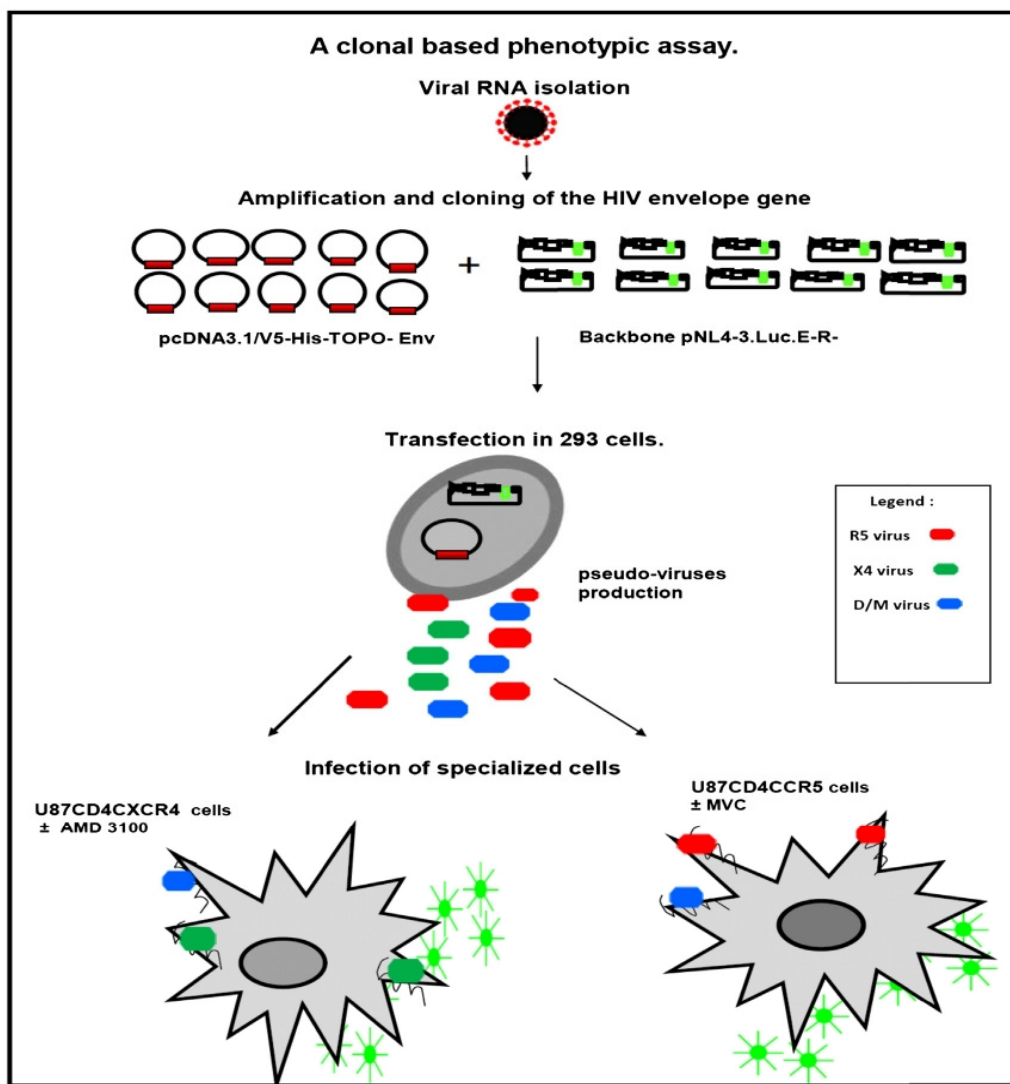
GTTTCTTTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG-3 and Env-lo: 5 -
GTTTCTTCCAGTCCCCCCTTTTCTTTTAAAAAG-3 . The amplification conditions in this step were: an initial 2 min cycle at 94 °C, 30 cycles with three steps (15 s at 94 °C, 30 s at 56 °C, 3 min at 72 °C) and a final extension cycles for 7 min at 72 °C, 10 min at 4 °C and 10 min 12 °C. PCR products were migrated on a 1% agarose gel to confirm the presence of a 3000 bp band then purified using QIAprep Spin Miniprep Kit 50 (QIAGEN). Positive (HIV-1 positive sample, a Laboratory adapted BAL virus) and negative controls containing the PCR mixture without the template DNA were used. All constructs were sequenced prior to transfection. Sequencing was performed at Génome Québec (McGill University and Genome Quebec Innovation Centre, Montreal, Quebec, Canada) using 12 primers covering env. Sequences were analyzed using Sequencer 4.7 from Gene Codes Corporation software, Ann Arbor, MI and aligned using Clustal W version 1.83 followed by manual alignment editing using BioEdit version 7.0.4.1.

2.6. Cloning of the HIV envelope gene

The Env PCR products of the HIV-1 R5-tropic viruses CC1/85, BAL, X4 tropic virus IIIB, dual tropic virus 85.6 and patients' samples were cloned using an env expression plasmid pcDNA3.1D/V5HisTOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA). Env- pseudotyped viruses were produced by co-transfection of the env expression plasmid and a backbone vector pNL4-3.Luc.E-R- that expresses the entire HIV-1 genome except for env and vpr, as described previously (Connor et al., 1996; Singh et al., 2009). The env expression plasmid and pNL4-3.Luc.E-R- DNAs were co-transfected into 30% confluent 293T cell cultures 48 h after transfection (Fig. 1). The supernatants were harvested, filtered through a 45- m-pore-size sterile filter (Millipore Corp, Bedford, MA), supplemented with additional fetal bovine serum to a final concentration of 20%,

and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ if not used immediately. HIV-1 p24 concentrations in pseudo-virus stocks were measured using a commercial enzyme-linked immunoassay HIV-1 p24, Perkin Elmer (Waltham, MA, USA). Pseudo-virus stocks were normalized by p24 measurements prior to testing infectivity to equivalent levels, assays were performed using 25 ng of p24 input per well of each pseudo-virus stock.

Fig. 1. Schematic illustration of the methodology used to determine HIV-1 tropism using a clonal based phenotypic assay.



A clonal-based phenotypic assay to determine the HIV-1 viral tropism. Pseudotyped viruses harboring the patient's env were produced by transfection of 293T cells with the env expression plasmid pcDNA3.1D/V5HisTOPO and a backbone vector pNL4-3.Luc.E-R-. The pseudoviruses were harvested 48 h later. They were used to infect the target cells U87.CD4.CXCR5+ and U87.CD4.CXCR4+ (designed to express on their surface the CD4 receptor and the chemokines receptors CCR5 or CXCR4, respectively) in the presence or absence of the CCR5 inhibitor maraviroc and a CXCR4 inhibitor AMD-3100 during 2 days at 37 °C with 5% CO₂. The ability of virus particles to complete a single round of replication in the presence or absence of the inhibitors was assessed by measuring the amount of luciferase in the target cells.

2.7. Luciferase assays for tropism

The s was measured using a luminescence assay with U87.CD4.CXCR4+ and U87.CD4.CCR5+ cells. MVC and AMD-3100, specific CCR5 and CXCR4 inhibitors respectively were used to confirm the co-receptors assigned by suppression or sufficient reduction of luciferase activity. Both inhibitors were added to the U87.CD4.CXCR4+ and U87.CD4.CCR5+ cells (10^6 cells/ml) and incubated for 1 h at 37 °C in 96 flat-bottomed wells plates prior to addition of the pseudo-viruses harboring sample envelopes. The cultures were incubated for 2 days at 37 °C with 5% CO₂, after which the cells were lysed with 100 μ l of cell lysis buffer (Promega) for 30 min. The amount of luciferase activity (RLU) in each well was determined with 100 μ l of substrate (Promega) in a Tecan's luminometer (Tecan infinite M 200). For each patient, 10 clones were analyzed and all experiments were performed in duplicate. Based on the production of luciferase cell line U87 expressing CD4 and either CCR5 or CXCR4 co-receptors, viruses were classified as X4 (U87.CD4.CXCR4+), R5 (U87.CD4.CCR5+) or D/M (both of them), in the presence or absence of CXCR4 and CCR5 inhibitors (Fig. 1).

2.8. Assay specificity

We evaluated 6 plasma samples of HBV+ HIV- and HCV+ HIV- (3 of each) in duplicates to detect the presence of false positives results. No false positives were observed. Then, the same samples were mixed with an HIV positive sample to detect false negative amplifications. All the samples were positives; no false negatives results were obtained.

2.9. Sensitivity to detect minor variants

The ability of the assay to detect minor variants in a viral population was assessed by mixing X4 and R5 clones obtained from viruses characterized as X4 and R5 using different ratios. The paired clones were mixed at fourteen X4/R5 DNA ratios of 0/100, 0.1/99.9, 0.2/99.8, 0.3/99.7, 0.4/99.6, 0.5/99.5, 1/99, 5/95, 10/90, 50/50, 90/10, 95/5, 95.5/0.5 and 100/0. Each mixture was tested in triplicates (Fig. 2A-C), in two independent experiments.

3. Results

3.1. Pseudovirus stocks generated from reference strains

Pseudo-viruses expressing env from the reference R5 strain BAL were used to infect U87.CD4.CCR5⁺ and U87.CD4.CXCR4⁺ cell lines in the presence or absence of MVC and AMD3100. In the absence of inhibitors, pseudo-viruses expressing BAL env produced high levels of luciferase activity in U87.CD4.CCR5⁺ cells (84 745 RLU) and background levels in U87.CD4.CXCR4⁺ cells (148 RLU). The addition of MVC reduced luciferase production (222 RLU) cells, while the addition of AMD3100 did not inhibit luciferase production in U87.CD4.CCR5⁺ cells (74 731 RLU) (Fig. 2A). Pseudoviruses expressing env from the reference X4-tropic strain IIIB were used to inoculate both U87.CD4.CXCR4⁺ and U87.CD4.CCR5⁺ cells. In the absence of inhibitors, high luciferase activity was observed only in U87.CXCR4.CD4⁺ cells (40 179 RLU) which was strongly decreased with the addition of AMD3100 (1202). As expected the addition of MVC did not have any effect (40 158 RLU) (Fig. 2B). For a dual-tropic strain, in the absence of inhibitors, high luciferase activity was observed in U87.CD4.CCR5⁺ cells (74 130 RLU) and U87.CD4.CXCR4⁺ cells (60 183 RLU) cell types (Fig. 2C). The infection was inhibited by specific inhibitors according to cell type. In the U87.CD4.CXCR4⁺ cells,

luciferase activity was inhibited in the presence of AMD-3100 (2895 RLU) and the addition of MVC did not have a strong inhibitory effect (51 745 RLU). In the U87.CD4.CCR5+ cells, the addition of MVC inhibited the luciferase activity (2561 RLU) while the addition of AMD3100 had no strong inhibitory effect (53 512 RLU) (Fig. 2C). The dual tropic isolate 85.6 was able to infect both U87.CD4.CXCR4+ and U87.CD4.CCR5+ cells.

3.2. Performance of env amplification

Plasma samples from 31 HIV-1 subtype B infected patients were tested. The PCR was successful in 26 (83.87%) samples. The viral loads of the 5 samples that could not be amplified with any protocol were as follow: 1 was below 400 copies/ml, 3 were between 400 and 1000 and 1 was above 1000 copies/ml.

3.3. Accuracy

The ability of the assay to accurately assess HIV-1 co-receptor tropism was evaluated by testing 26 HIV-1 isolates from chronically infected patients. All isolates had been previously characterized and documented as R5, X4, or D/M tropic by Trofile-ES (LabCorp, South San Francisco, CA) (Table 1). We compared the concordance between the R5, D/M and X4 phenotype of our clonal-based phenotypic assay with the Trofile-ES assay assay (LabCorp, South San Francisco, CA), 25/26 (96.15%) samples were concordant (Table 2). Samples 7 and 22 were classified as X4 by Trofile-ES (LabCorp, South San Francisco, CA) but were classified using our clonal-base assay as D/M because both had 9 X4 clones and 1 R5 clone. Sample 26 was classified as R5 by Trofile-ES (LabCorp, South San Francisco, CA) and D/M with our assay as it identified 8 R5 and 2 X4 clones. Even if these 3 samples were a mixture of pure R5 and X4 monotropic virus clones, they were classified as D/M in this study for comparative purposes. We

also tested 6 samples harboring HIV-1 from non-B subtypes AGG, CRF02-A6, AK and AGK subtypes. The env gene was amplified, cloned and tropism was determined. All clones were R5 (data not shown).

3.4. Reproducibility

The four well characterized virus strains (BAL, CC1/85, IIB and 85.6) were repeatedly tested in triplicates in 5 separate experiments. Results were consistent with known tropism (R5, X4 and Dual tropic respectively). The experiments involved four different technicians (data not shown).

3.5. Sensitivity of detection of minor variants

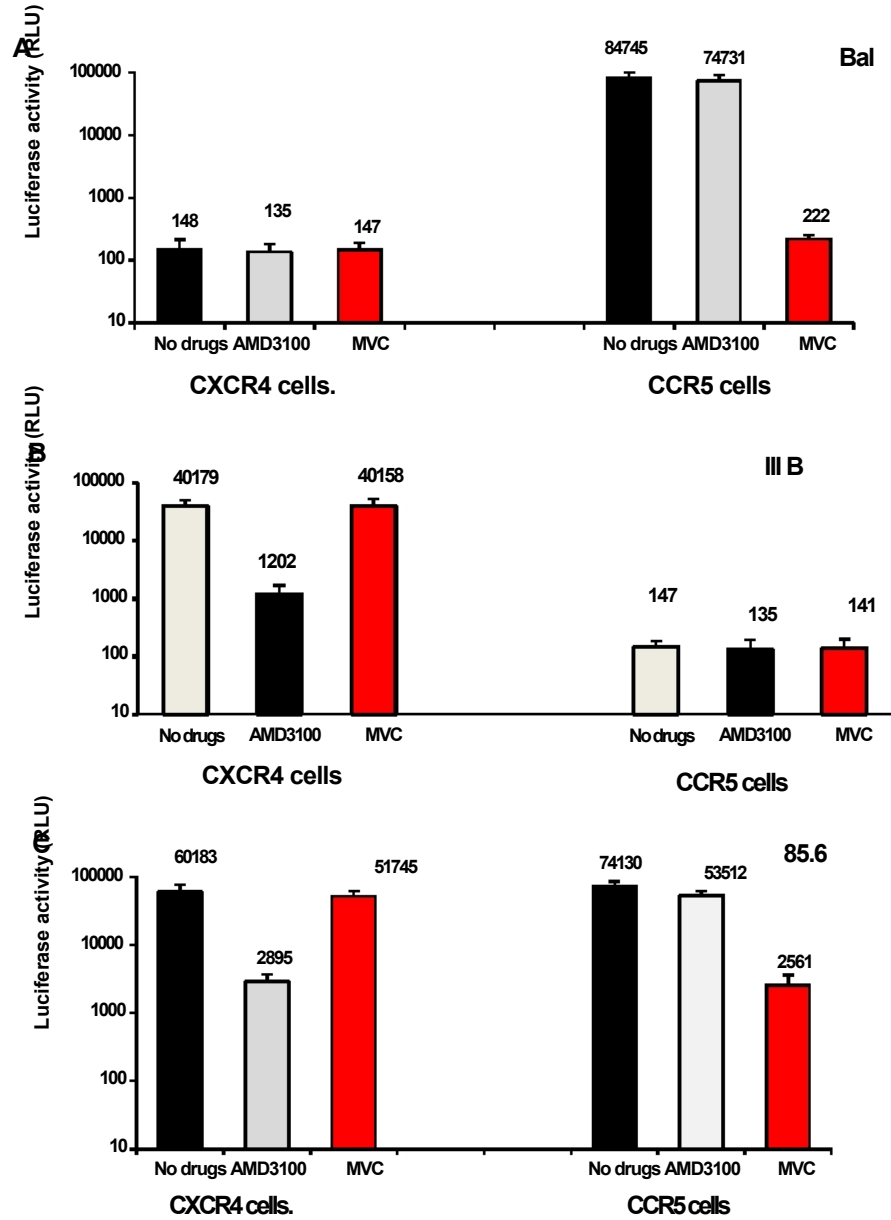
The ability to detect minor subpopulations was assessed by mixing molecular clones X4 and R5-tropic env variants isolated from two D/M clinical isolates and the laboratory adapted viruses (BAL and IIB). One X4 and one R5 clone was selected from each sample. Clone pairs were selected based on similar infectivities (RLU) in U87.CD4.CXCR4+ and U87.CD4.CCR5+ cells and the paired clones were mixed at fourteen X4/R5 DNA ratios as described in materials and methods. Each mixture was tested in triplicate in two independent experiments. Minor variants were always detectable when present at >0.4% in the viral mixtures (Fig. 3).

4. Discussion

Two different methods can be used to determine HIV-1 co-receptor use. Phenotypic assays are based on recombinant virus assays or replication defective pseudo-viruses (Troupin et al., 2001; Whitcomb et al., 2007; Lin et al., 2010; Raymond et al., 2010a; Recordon-Pinson et al., 2010). Genotypic assays predict co-receptor usage mostly by interpretation of V3 loop sequence data (Recordon-Pinson et al., 2010). Several tropism prediction algorithms have been

developed, including the 11/25 rule based on the charge of amino acids at positions 11 and 25 (Fouchier et al., 1992), decision trees (Pillai et al., 2003), support vector machines (SVM) (Pillai et al., 2003), neural networks (Resch and Swanstrom, 2001) and position-specific scoring matrices (PSSM) (Jensen et al., 2003). The predictive value of these algorithms continues to improve. However, not all of the genetic determinants of co-receptor usage reside in the HIV envelope V3 loop. Other regions outside V3 such as V1, V2, V4, V5, C4 (Van Baelen et al., 2007) and the bridging sheet (Vandekerckhove et al., 2011b) may also play a role in HIV tropism. N-linked glycosylation have also been demonstrated to be important for co-receptor usage (Van Baelen et al., 2007). These methods have demonstrated good correlation with phenotypic tests but some factors such as the efficiency of reverse transcription RT-PCR and nested PCR used in the amplification of env gene, the determination of primary sequence from the chromatograms from Sanger method, the viral load of the patient and the volume of plasma used are potential source of errors. The presence of the low levels of X4 variants can reduce their ability to predict HIV-1 tropism (Sanchez et al., 2010; Knapp et al., 2013).

Fig. 2. (A-C) Coreceptor tropism determinations of well-characterized reference strains in U87.CD4.CXCR4+ and U87.CD4.CCR5+ cells.



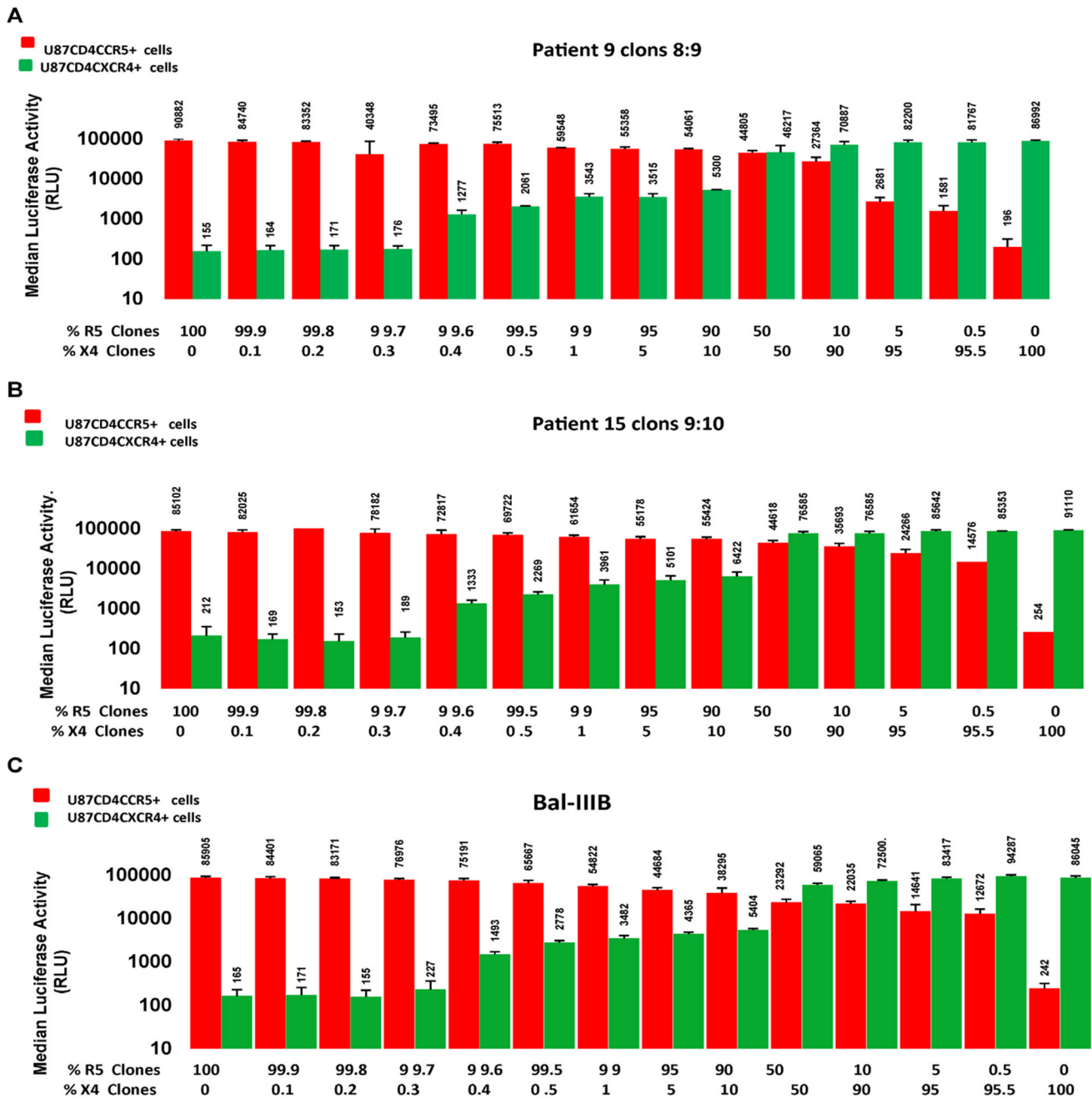
U87-CD4-CXCR4+ and U87-CD4-CCR5+ cells were infected with (A) Bal (R5 tropic strain), (B) III B (X4-tropic strain) and (C) the dual-tropic strain 85.6. Infectivity was analyzed in the presence or absence of CXCR4 (AMD 3100) or CCR5 (MVC) inhibitors. Each sample was tested in triplicates in two independent experiments.

Several other phenotypic assays have been developed to determine tropism. The phenotypic test BVBA, from Virco, Mechelen, amplifies HIV-1 gp120 regions V1-V4 using the backbone pHXB2DNH2V4eGFP by in vitro recombination. The recombinant plasmid is then transfected into 293T cells and then used to infect U87.CD4.CCR5+ and U87.CD4.CXCR4+ cells. Tropism is determined by eGFP expression analysis using a scanning microscope. This assay does not distinguish between dual-tropic or mixed populations and detects minor X4 variants when they represent more than 10% (Van Baelen et al., 2007). The Phenoscript test from VIRalliance, amplifies the V1-V3 env regions. The fragment is co-transfected in 293T cells with a linearized backbone pNL43 lacking V1-V3. (Labrosse et al., 2003) It is then used to infect U373MG.CD4.CCR5+ or U373MG.CD4.CXCR4+ cells. The HIV-1 LTR-lacZ cassette allows infectivity quantification by a colorimetric assay. It detects minor X4 variants when they represent more than 5% of the viral population (Troupin et al., 2001). The PhenoX-R tropism assay from InPheno AG, Basel, Switzerland, is composed by a probe based hybridization assay XtrackC for the rapid discrimination between R5 and X4 variants and a replicative phenotyping assay PhenoX-R for dual/mixed variants. The V1-V3 env sequences are amplified and ligated into NL4-3 backbone lacking env (V1-V3) then transfected into a reporter cell harboring a Tat-responsive lacZ gene. It detects minor X4 variants when they represent 1% or more (Engelman and Cherepanov, 2012). The Toulouse Tropism Test (TTT) phenotypic assay detects X4 variants when they represent 0.5% or more of the virus population. It can also be used in plasma and PBMC and have >90% concordance with Trofile-ES (LabCorp, South San Francisco, CA) for predicting HIV-1 tropism (Raymond et al., 2010b). The assay described in this study uses known technologies for the production of pseudo-typed viral particles and the single cycle luciferase-based assay to assess infectivity (Van Baelen et al., 2007; Whitcomb et al., 2007; Reeves et al., 2009; Raymond et al., 2010a). It detects minority R5 and X4 variants when they represent at least 0.4% of the

virus mixtures. This level of sensitivity is comparable to that reported by other phenotypic assays (Whitcomb et al., 2007; Coakley et al. 2009; Lin et al., 2010; Raymond et al., 2010a). The original version of Trofile (LabCorp, South San Francisco, CA) detects X4 or R5 variants with 100% sensitivity when those variants comprised 10% of a mixed HIV envelope population and with 85% sensitivity when those variants represents 5% of a population (Coakley et al., 2009; Whitcomb et al., 2007). The Trofile-ES (LabCorp, South San Francisco, CA) can detect 0.3% of X4 variants with 100% sensitivity in a mixed envelope population (Coakley et al., 2009; Reeves et al., 2009). Actual sensitivity in clinical samples depends on the input virus load, the infectivity of the envelopes being assayed, inefficiencies due to RNA extraction and reverse transcription of the template viral RNA (Braun and Wiesmann, 2007).

The results obtained using the test described in this study were 96.15% concordant with the Trofile-ES assay (LabCorp, South San Francisco, CA) (Table 2). The analysis of the D/M and X4 phenotype showed discordance in 3 patients (Tables 1 and 2). For patients 7 and 22 the difference between the classification as X4 by Trofile-ES (LabCorp, South San Francisco, CA) and D/M by our assay was due to a single R5 clone. For patient number 26, two X4 clones explained the discordance between the R5 result from the Trofile-ES (LabCorp, South San Francisco, CA) assay and our D/M classification. The use of 10 clones per patient in our assay improved the sensitivity to detect minor variants. Even if full validation would require comparison of a larger number of samples with different HIV-1 subtypes, we did test samples harboring viruses from the non-B subtypes AGG, CRF02-A6, AK and AGK. The assay performed well with these subtypes. This assay has several advantages over existing tropism assays. First and most importantly it can differentiate between the truly dual-tropic viruses and a mixture of R5- and X4-tropic viruses (Fig. 3).

Fig. 3. (A-C) Sensitivity of the clonal-based HIV-1 tropism phenotypic assay to detect minor variants of the mixture of clones derived from two patients (9, 15) and two laboratory adapted viruses (Bal and IIB) in U87CD4CXCR4+ and U87CD4CCR5+ cells.



U87-CD4-CXCR4+ and U87-CD4-CCR5+ cells were infected with (A) the mixture of X4/R5-tropic clones from patient 9 clones 8 and 9 (B) the mixture of X4/R5-tropic clones from patient 15 clones 9 and 10 and (C) the mixture of X4/R5 clones from two laboratory adapted viruses Bal and IIB. Seven DNA ratios of X4/R5 clones were used. Each mixture was tested in triplicates in two independent experiments. Minority species of X4 and R5 tropic viruses were both detected in the mixture when they represent a 0.4% or higher in the mixture.

The single-replication-cycle format of the assay eliminates the need to determine virus titers prior to the infection of target cells (Petropoulos et al., 2000). This test also includes the entire env gene which is different from other assays that only included V1-V3 regions (Troupin et al., 2001; Rose et al., 2009). Using the full env gene allows the study of the complex molecular determinants and mechanisms of inhibition and neutralization for many co-receptor inhibitors, which may map to other regions of the env gene (Whitcomb et al., 2007). Finally using a clonal-based assay provides a randomly sampled image of the virus population present in a patient's sample (Delobel et al., 2007).

Table 1 Comparison results of the viral tropism between the clonal-based HIV-1 tropism phenotypic assay and the enhanced version of Trofile assay (Trofile-ES) in U87-CD4-CXCR4+ and U87-CD4-CCR5+ cells.

Clone	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Clonal- based tropism Assay	Trofile
Patients												
1	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	R5	R5
2	Green	Green	Green	Green	White	Red	Red	Red	Blue	Blue	D/M	D/M
3	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	White	Green	Green	Green	Green	D/M	D/M
4	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	R5	R5
5	White	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	X4	X4
6	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	White	Green	Green	Green	D/M	D/M
7	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	D/M	X4
8	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	R5	R5
9	Blue	Blue	White	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Green	Green	D/M	D/M
10	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	R5	R5
11	Blue	Blue	Red	Blue	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Blue	D/M	D/M
12	Blue	Red	Red	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Red	D/M	D/M
13	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	D/M	D/M
14	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	X4	X4
15	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Blue	Blue	Red	Green	D/M	D/M
16	White	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	R5	R5
17	Red	Red	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Red	Red	D/M	D/M
18	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	R5	R5
19	Red	Red	White	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	R5	R5
20	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	R5	R5
21	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	White	Green	X4	X4
22	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	D/M	X4
23	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	R5	R5
24	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	R5	R5
25	Red	Red	Red	Red	Red	Red	White	Red	Red	Red	R5	R5
26	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	D/M	R5

U87-CD4-CXCR4+ and U87-CD4-CCR5+ cells were infected with 10 clones of 26 HIV-1 infected patients. Infectivity was analyzed in the presence and absence of CXCR4 (AMD 3100) or CCR5 (MVC) inhibitor. Viruses were classified as X4 tropic and R5 tropic, based on the infection and production of luciferase in U87-CD4-CXCR4+ and U87-CD4- CCR5+ cells respectively. The mixture of R5 and X4 are termed dual-mixed viruses (D/M). The true dual-tropisms clones infect and produce luciferase in U87.CD4.CCR5 and U87.CD4.CXCR4 cells. R5-tropic clones are in red, those X4-tropics are in green and the true dual-tropisms clones are in blue. The infection of U87-CD4-CXCR4+ cells by X4 clones was inhibited only by a CXCR4 inhibitor. The infection of U87-CD4-CCR5+ cells by R5 clones was inhibited only by a CCR5 inhibitor. The true dual-tropisms clones were not inhibited well by CCR5 or CXCR4 inhibitors. Non-functional clones in which the luciferase reading in RLU was below the background level between 100 and 200 RLU are in white. Each sample was tested in triplicates in two independent experiments.

Table 2 Correlation between a clonal based phenotypic assay and Trofile-ES assay.

Tropism assays	Samples classified as R5	Samples classified as D/M or X4	Total of samples analyzed
Trofile-ES	12/26	14/26	26
A clonal based phenotypic assay	11/26	15/26	26
Samples concordant by both methods (% concordance)	11/26 (91.6)	14/26 (100)	25/26 (96.15)

The concordance between both methods was calculated as the number of samples with a concordant R5 phenotype with both assays plus number of samples with a concordant R5X4/X4 phenotype with both assays, the whole divided by the total number of tested samples (Raymond et al., 2010a).

The cost of the clonal-based tropism test was evaluated for our laboratory and it was determined to be similar to well-known commercially available phenotypic assays with increased discriminatory power. A sensitive and reproducible clonal-based phenotypic assay that can differentiate between the truly dual tropic viruses and a mixture of pure R5 and X4 tropic viruses was developed and R5 and X4 at low proportions (0.4%) of the virus mixtures were detected. This assay is suitable to determine and monitor HIV-1 co-receptor usage in clinical and in research settings.

Acknowledgements: We thank Dr. Amal Nadiri for discussions, suggestions and assistance with the cloning and luciferase assay, Dr. Benoît Trot-tier, Dr. Claude Fortin, Dr. Danielle Rouleau and Dr. Jean Guy Baril for sample collection, The NIH AIDS Research and Reference Reagent Program for the viruses, the backbone pNL4-3. Luc.E-R-and U87.CD4.CXCR4+, U87.CD4.CCR5+ and 293T cells. This work was supported by an unrestricted educational grant from Pfizer, CANFAR and -MI. CT is a chercheur-boursier from the Fonds de Recherche du Québec en Santé. CT is Pfizer/University of Montreal chair on HIV translational Research.

References.

- Archer, J., Braverman, M.S., Taillon, B.E., Desany, B., James, I., Harrigan, P.R., Lewis, M., Robertson, D.L., 2009. Detection of low-frequency pretherapy chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4)-using HIV-1 with ultra-deep pyrosequencing. *AIDS* 23, 1209-1218.
- Ataher, Q., Portsmouth, S., Napolitano, L.A., Eng, S., Greenacre, A., Kambugu, A., Wood, R., Badal-Faesen, S., Tressler, R., 2012. The epidemiology and clinical correlates of HIV-1 co-receptor tropism in non-subtype B infections from India, Uganda and South Africa. *J. Int. AIDS Soc.* 15, 2.
- Berger, E.A., Doms, R.W., Fenyo, E.M., Korber, B.T., Littman, D.R., Moore, J.P., Sattentau, Q.J., Schuitemaker, H., Sodroski, J., Weiss, R.A., 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* 391, 240.
- Braun, P., Wiesmann, F., 2007. Phenotypic assays for the determination of coreceptor tropism in HIV-1 infected individuals. *Eur. J. Med. Res.* 12, 463-472.
- Coakley, E., Reeves, J.D., Huang, W., Mangas-Ruiz, M., Maurer, I., Harskamp, A.M., Gupta, S., Lie, Y., Petropoulos, C.J., Schuitemaker, H., van 't Wout, A.B., 2009. Comparison of human immunodeficiency virus type 1 tropism profiles in clinical samples by the Trofile and MT-2 assays. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4686-4693.
- Connor, R.I., Sheridan, K.E., Lai, C., Zhang, L., Ho, D.D., 1996. Characterization of the functional properties of env genes from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 70, 5306-5311.
- Cooper, D.A., Heera, J., Goodrich, J., Tawadrous, M., Saag, M., Dejesus, E., Clumeck, N., Walmsley, S., Ting, N., Coakley, E., Reeves, J.D., Reyes-Teran, G., Westby, M., Van Der Ryst, E., Ive, P., Mohapi, L., Mingrone, H., Horban, A., Hackman, F., Sullivan, J., Mayer, H., 2010. Maraviroc versus efavirenz, both in combination with zidovudine-lamivudine, for the treatment of antiretroviral-naive subjects with CCR5-tropic HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 201, 803-813.

- Delobel, P., Nugeyre, M.T., Cazabat, M., Pasquier, C., Marchou, B., Massip, P., Barre-Sinoussi, F., Israel, N., Izopet, J., 2007. Population-based sequencing of the V3 region of env for predicting the coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1572
- Demarest, J.F., Amrine-Madsen, H., Irlbeck, D.M., Kitrinou, K.M., Team, C.C.R.C.S., 2009. Virologic failure in first-line human immunodeficiency virus therapy with a CCR5 entry inhibitor, aplaviroc, plus a fixed-dose combination of lamivudine–zidovudine: nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance regardless of envelope tropism. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1116–1123
- Engelman, A., Cherepanov, P., 2012. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 279–290.
- Fouchier, R.A., Groenink, M., Kootstra, N.A., Tersmette, M., Huisman, H.G., Miedema, F., Schuitemaker, H., 1992. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J. Virol.* 66, 3183–3187
- Genebat, M., Ruiz-Mateos, E., León, J.A., González-Serna, A., Pulido, I., Rivas, I., Ferrando-Martínez, S., Sánchez, B., Muñoz-Fernández, M.Á., Leal, M., 2009. Correlation between the Trofile® test and virological response to a short-term maraviroc exposure in HIV-infected patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 845–849.
- Gonzalez-Serna, A., Leal, M., Genebat, M., Abad, M.A., Garcia-Perganeda, A., Ferrando-Martinez, S., Ruiz-Mateos, E., 2010. TROCAI (tropism coreceptor assay information): a new phenotypic tropism test and its correlation with Trofile enhanced sensitivity and genotypic approaches. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4453–4458.
- Gulick, R.M., Su, Z., Flexner, C., Hughes, M.D., Skolnik, P.R., Wilkin, T.J., Gross, R., Krambrink, A., Coakley, E., Greaves, W.L., Zolopa, A., Reichman, R., Godfrey, C., Hirsch, M., Kuritzkes, D.R., Team, A.C.T.G., 2007. Phase 2 study of the safety and efficacy of vicriviroc, a CCR5 inhibitor, in HIV-1-infected, treatment-experienced patients: AIDS clinical trials group 5211. *J. Infect. Dis.* 196, 304–312.

- Hardy, W.D., Gulick, R.M., Mayer, H., Fatkenheuer, G., Nelson, M., Heera, J., Rajic, N., Goodrich, J., 2010. Two-year safety and virologic efficacy of maraviroc in treatment-experienced patients with CCR5-tropic HIV-1 infection: 96-week combined analysis of MOTIVATE 1 and 2. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 55, 558-564.
- Hoffmann, C., 2007. The epidemiology of HIV coreceptor tropism. *Eur. J. Med. Res.* 12, 385-390.
- Iwamoto, A., Hosoya, N., Kawana-Tachikawa, A., 2010. HIV-1 tropism. *Protein Cell* 1, 510-513.
- Jensen, M.A., Li, F.S., van't Wout, A.B., Nickle, D.C., Shriner, D., He, H.X., McLaughlin, S., Shankarappa, R., Margolick, J.B., Mullins, J.I., 2003. Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *J. Virol.* 77, 13376-13388.
- Kitrinos, K.M., Amrine-Madsen, H., Irlbeck, D.M., Word, J.M., Demarest, J.F., Team, C.C.R.S., 2009. Virologic failure in therapy-naive subjects on aplaviroc plus lopinavir-ritonavir: detection of aplaviroc resistance requires clonal analysis of envelope. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1124-1131.
- Knapp, D.J., McGovern, R.A., Dong, W., Poon, A.F., Swenson, L.C., Zhong, X., Woods, C.K., Harrigan, P.R., 2013. Factors influencing the sensitivity and specificity of conventional sequencing in human immunodeficiency virus type 1 tropism testing. *J. Clin. Microbiol.* 51, 444-451.
- Labrosse, B., Labernardiere, J.L., Dam, E., Trouplin, V., Skrabal, K., Clavel, F., Mammano, F., 2003. Baseline susceptibility of primary human immunodeficiency virus type 1 to entry inhibitors. *J. Virol.* 77, 1610-1613.
- Landovitz, R.J., Angel, J.B., Hoffmann, C., Horst, H., Opravil, M., Long, J., Greaves, W., Fatkenheuer, G., 2008. Phase II study of vicriviroc versus efavirenz (both with zidovudine/lamivudine) in treatment-naive subjects with HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 198, 1113-1122.

- Lin, N.H., Negusse, D.M., Beroukhim, R., Giguel, F., Lockman, S., Essex, M., Kuritzkes, D.R., 2010. The design and validation of a novel phenotypic assay to determine HIV-1 coreceptor usage of clinical isolates. *J. Virol. Methods* 169, 39-46.
- McNicholas, P., Wei, Y., Whitcomb, J., Greaves, W., Black, T.A., Tremblay, C.L., Strizki, J.M., 2010. Characterization of emergent HIV resistance in treatment-naive subjects enrolled in a vicriviroc phase 2 trial. *J. Infect. Dis.* 201, 1470-1480.
- McNicholas, P.M., Mann, P.A., Wojcik, L., Phd, P.Q., Lee, E., McCarthy, M., Shen, J., Black, T.A., Strizki, J.M., 2011. Mapping and characterization of vicriviroc resistance mutations from HIV-1 isolated from treatment-experienced subjects enrolled in a phase II study (VICTOR-E1). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 56, 222-229.
- Moore, J.P., Kitchen, S.G., Pugach, P., Zack, J.A., 2004. The CCR5 and CXCR4 coreceptors - central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res. Human Retroviruses* 20, 111-126.
- Moyle, G., DeJesus, E., Boffito, M., Wong, R.S., Gibney, C., Badel, K., MacFarland, R., Calandra, G., Bridger, G., Becker, S., Team, X.A.C.T.S., 2009. Proof of activity with AMD11070, an orally bioavailable inhibitor of CXCR4-tropic HIV type 1. *Clin. Infect. Dis.: Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 48, 798-805.
- Moyle, G.J., Wildfire, A., Mandalia, S., Mayer, H., Goodrich, J., Whitcomb, J., Gazzard, B.G., 2005. Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 191, 866-872.
- Mulinge, M., Lemaire, M., Servais, J.Y., Rybicki, A., Struck, D., da Silva, E.S., Verhofstede, C., Lie, Y., Seguin-Devaux, C., Schmit, J.C., Bercoff, D.P., 2013. HIV-1 tropism determination using a phenotypic Env recombinant viral assay highlights over-estimation of CXCR4-usage by genotypic prediction algorithms for CRRF01 AE and CRF02 AG. *PLoS ONE* 8, e60566.
- Ng, K.Y., Chew, K.K., Kaur, P., Kwan, J.Y., Khong, W.X., Lin, L., Chua, A., Tan, M.T., Quinn, T.C., Laeyendecker, O., Leo, Y.S., Ng, O.T., 2013. High prevalence of CXCR4 usage

among treatment-naive CRF01 AE and CRF51 01B-infected HIV-1 subjects in Singapore. *BMC Infect. Dis.* 13, 90.

Panel on Retroviral Guidelines for Adults and Adolescents, 2013. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents 2013. Department of Health and Human Services.

Petropoulos, C.J., Parkin, N.T., Limoli, K.L., Lie, Y.S., Wrin, T., Huang, W., Tian, H., Smith, D., Winslow, G.A., Capon, D.J., Whitcomb, J.M., 2000. A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 920-928.

Pfeifer, N., Lengauer, T., 2012. Improving HIV coreceptor usage prediction in the clinic using hints from next-generation sequencing data. *Bioinformatics* 28, i589-i595. Pillai, S., Good, B., Richman, D., Corbeil, J., 2003. A new perspective on V3 phenotype prediction. *AIDS Res. Human Retroviruses* 19, 145-149.

Poveda, E., Alcami, J., Paredes, R., Cordoba, J., Gutierrez, F., Llibre, J.M., Delgado, R.,

Pulido, F., Iribarren, J.A., Garcia Deltoro, M., Hernandez Quero, J., Moreno, S., Garcia, F., 2010. Genotypic determination of HIV tropism - clinical and methodological recommendations to guide the therapeutic use of CCR5 antagonists. *AIDS Rev.* 12, 135-148.

Poveda, E., Paredes, R., Moreno, S., Alcami, J., Cordoba, J., Delgado, R., Gutierrez, F., Llibre, J.M., Garcia Deltoro, M., Hernandez-Quero, J., Pulido, F., Iribarren, J.A., Garcia, F., 2012. Update on clinical and methodological recommendations for genotypic determination of HIV tropism to guide the usage of CCR5 antagonists. *AIDS Rev.* 14, 208-217.

Poveda, E., Soriano, V., 2010. Optimizing management of treatment-naive and treatment-experienced HIV+ patients: the role of maraviroc. *HIV/AIDS* 2, 51-58.

Rachlis, A., Harris, M., Lalonde, R., Shafran, S.D., Tremblay, C., Wainberg, M.A., Walmsley, S., 2010. Canadian consensus guidelines for the optimal use of maraviroc in the treatment of HIV-infected adults. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 21, 159-172.

- Raymond, S., Delobel, P., Mavigner, M., Cazabat, M., Souyris, C., Encinas, S., Bruel, P., Sandres-Saune, K., Marchou, B., Massip, P., Izopet, J., 2010a. Development and performance of a new recombinant virus phenotypic entry assay to determine HIV-1 coreceptor usage. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 47, 126-130.
- Raymond, S., Delobel, P., Mavigner, M., Cazabat, M., Souyris, C., Encinas, S., Bruel, P., Sandres-Sauné, K., Marchou, B., Massip, P., Izopet, J., 2010b. Development and performance of a new recombinant virus phenotypic entry assay to determine HIV-1 coreceptor usage. *J. Clin. Virol.* 47, 126-130.
- Raymond, S.D.P, Izopet, J., 2012. Phenotyping methods for determining HIV tropism and applications in clinical settings. *Curr. Opin. HIV AIDS* 7, 463-469.
- Recordon-Pinson, P., Soulie, C., Flandre, P., Descamps, D., Lazrek, M., Charpentier C., Montes, B., Trabaud, M.A., Cottalorda, J., Schneider, V., Morand-Joubert, L., Tamalet, C., Desbois, D., Mace, M., Ferre, V., Vabret, A., Ruffault, A., Pallier, C., Raymond, S., Izopet, J., Reynes, J., Marcelin, A.G., Masquelier, B., Group, A.A.R.S., 2010. Evaluation of the genotypic prediction of HIV-1 coreceptor use versus a phenotypic assay and correlation with the virological response to maraviroc: the ANRS GenoTropism study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3335-3340.
- Reeves, J.D.C.E, Petropoulos., C.J., Whitcomb, J.M., 2009. An enhanced-sensitivity Trofile™ HIV coreceptor tropism assay for selecting patients for therapy with entry inhibitors targeting CCR5. *Rev. Anal. Clin. Stud. J. Viral Entry* 3, 94-102.
- Resch, W.H.N., Swanstrom, R., 2001. Improved success of phenotype prediction of the human immunodeficiency virus type 1 from envelope variable loop 3 sequence using neural networks. *Virology* 288, 51-62.
- Roche, M., Salimi, H., Duncan, R., Wilkinson, B.L., Chikere, K., Moore, M.S., Webb, N.E., Zappi, H., Sterjovski, J., Flynn, J.K., Ellett, A., Gray, L.R., Lee, B., Jubb, B., Westby, M., Ramsland, P.A., Lewin, S.R., Payne, R.J., Churchill, M.J., Gorry, P.R., 2013. A common mechanism of clinical HIV-1 resistance to the CCR5 antagonist maraviroc despite divergent resistance levels and lack of common gp120 resistance mutations. *Retrovirology* 10, 43.

- Rose, J.D., Rhea, A.M., Weber, J., Quinones-Mateu, M.E., 2009. Current tests to evaluate HIV-1 coreceptor tropism. *Curr. Opin. HIV AIDS* 4, 136-142.
- Sanchez, V., Masia, M., Robledano, C., Padilla, S., Ramos, J.M., Gutierrez, F., 2010. Performance of genotypic algorithms for predicting HIV-1 tropism measured against the enhanced-sensitivity Trofile coreceptor tropism assay. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4135-4139.
- Seclen, E., Del Mar Gonzalez, M., De Mendoza, C., Soriano, V., Poveda, E., 2010. Dynamics of HIV tropism under suppressive antiretroviral therapy: implications for tropism testing in subjects with undetectable viraemia. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1493-1496.
- Singh, A., Page, T., Moore, P.L., Allgaier, R.L., Hiramani, K., Coovadia, H.M., Walker, B.D., Morris, L., Ndung'u, T., 2009. Functional and genetic analysis of coreceptor usage by dualtropic HIV-1 subtype C isolates. *Virology* 393, 56-67.
- Tilton, J.C., Wilen, C.B., Didigu, C.A., Sinha, R., Harrison, J.E., Agrawal-Gamse, C., Henning, E.A., Bushman, F.D., Martin, J.N., Deeks, S.G., Doms, R.W., 2010. A maraviroc-resistant HIV-1 with narrow cross-resistance to other CCR5 antagonists depends on both N-terminal and extracellular loop domains of drug-bound CCR5. *J. Virol.* 84, 10863-10876.
- Trouplin, V., Salvatori, F., Cappello, F., Obry, V., Brelot, A., Heveker, N., Alizon, M., Scarlatti, G., Clavel, F., Mammano, F., 2001. Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using a recombinant phenotypic assay. *J. Virol.* 75, 251-259.
- Tsibris, A.M., Korber, B., Arnaout, R., Russ, C., Lo, C.C., Leitner, T., Gaschen, B., Theiler, J., Paredes, R., Su, Z., Hughes, M.D., Gulick, R.M., Greaves, W., Coakley, E., Flexner, C., Nusbaum, C., Kuritzkes, D.R., 2009. Quantitative deep sequencing reveals dynamic HIV-1 escape and large population shifts during CCR5 antagonist therapy in vivo. *PLoS ONE* 4, e5683.
- Van Baelen, K., Vandenbroucke, I., Rondelez, E., Van Eygen, V., Vermeiren, H., Stuyver, L.J., 2007. HIV-1 coreceptor usage determination in clinical isolates using clonal and population-based genotypic and phenotypic assays. *J. Virol. Methods* 146, 61-73.

- Vandamme, A.M., Camacho, R.J., Ceccherini-Silberstein, F., de Luca, A., Palmisano, L., Paraskevis, D., Paredes, R., Poljak, M., Schmit, J.C., Soriano, V., Walter, H., Sonnerborg, A., European, H.I.V.D.R.G.P., 2011. European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing: 2011 update. *AIDS Rev.* 13, 77-108.
- Vandekerckhove, L.P., Wensing, A.M., Kaiser, R., Brun-Vezinet, F., Clotet, B., De Luca, A., Dressler, S., Garcia, F., Geretti, A.M., Klimkait, T., Korn, K., Masquelier, B., Perno, C.F., Schapiro, J.M., Soriano, V., Sonnerborg, A., Vandamme, A.M., Verhofstede, C., Walter, H., Zazzi, M., Boucher, C.A., European Consensus Group on Clinical Management of Tropism Testing, 2011a. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. *Lancet Infect. Dis.* 11, 394-407.
- Vandekerckhove, L.V.C., Demecheleer, S., E.De Wit, E., Florence, K., Fransen, M., Moutschen, W., Mostmans, K., Kabeya, N., Mackie, J., Plum, K., Vaira D.Van Baelen, H., Vandenbroucke, I., Van Eygen, V., Van Marck, D., Vogelaers, Geretti A.M., Stuyver, L.J., 2011b. Comparison of phenotypic and genotypic tropism determination in triple-class-experienced HIV patients eligible for maraviroc treatment. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 265-272.
- Westby, M., Lewis, M., Whitcomb, J., Youle, M., Pozniak, A.L., James, I.T., Jenkins, T.M., Perros, M., van der Ryst, E., 2006. Emergence of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4-using virus reservoir. *J. Virol.* 80, 4909-4920.
- Westby, M., van der Ryst, E., 2005. CCR5 antagonists: host-targeted antivirals for the treatment of HIV infection. *Antiviral Chem. Chemother.* 16, 339-354.
- Whitcomb, J.M., Huang, W., Fransen, S., Limoli, K., Toma, J., Wrin, T., Chappey, C., Kiss, L.D., Paxinos, E.E., Petropoulos, C.J., 2007. Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 566-575.

Wilkin, T.J., Su, Z., Kuritzkes, D.R., Hughes, M., Flexner, C., Gross, R., Coakley, E., Greaves, W., Godfrey, C., Skolnik, P.R., Timpone, J., Rodriguez, B., Gulick, R.M., 2007. HIV type 1 chemokine coreceptor use among antiretroviral- experienced patients screened for a clinical trial of a CCR5 inhibitor: AIDS Clinical Trial Group A5211. *Clin. Infect. Dis.: Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 44, 591-595.

4.2 Article 2. Ce travail a été publié dans le journal : Journal AIDS Research and Therapy. L'article est présenté ici dans sa version publiée [206]. Asin-Milan et al. AIDS Research and Therapy 2013, 10:15

Mutations in variable domains of the HIV-1 envelope gene can have a significant impact on maraviroc and vicriviroc resistance

Odalis Asin-Milan^{1,2}, Annie Chamberland^{1,2}, Yi Wei¹, Alpha Haidara^{1,2}, Mohamed Sylla^{1,2}
and Cécile L Tremblay^{1,2,3,4*}

Abstract

Background: Resistance to CCR5 inhibitors, such as maraviroc and vicriviroc is characterized by reduction of maximal percent inhibition which indicates the use of an inhibitor-bound conformation of CCR5 for human immunodeficiency virus-1(HIV-1) entry. It is accompanied by substitutions in gp120 and gp41. Variable domain 3 (V3) plays the most important role, but substitutions outside V3 could also be involved in phenotype resistance. In this work, we investigated how mutations in variable regions of the viral envelope protein gp120 can contribute to CCR5 inhibitor resistance.

Methods: Resistant isolates were selected by passaging CC1/85 and BaL viruses with sub-inhibitory MVC and VCV concentrations. Mutations in gp160 were identified and mutants containing V2 (V169M), V3 (L317W) and V4 (I408T) were constructed.

Results: MVC and VCV susceptibility and viral tropism were assessed by single cycle assay. Mutant I408T showed 4-fold change (FC) increase in the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) to MVC, followed by L317W (1.52-FC), V169M (1.23-FC), V169M/I408T (4-FC) L317W/I408T (3-FC), V169M/L317W (1.30-FC), and V169M/L317W/I408T (3.31-FC). MPI reduction was observed for mutants I408T (85%), L317W (95%), V169M/I408T (84%), L317W/I408T (85%) and V169M/L317W/I408T (83%). For VCV, I408T increased the IC₅₀ by 2-FC and few mutants showed MPI reduction less than 95%: I408T (94%), L317W/I408T (94%) and V169M/L317W/I408T (94%). All mutant remained R5 –tropic and presented decreased infectivity

Conclusions: These results suggest that mutations in the V4 loop of HIV-1 may contribute to MVC and VCV resistance alone or combined with mutations in V2 and V3 loops.

Keywords: Maraviroc, Vicriviroc, Resistance, CCR5 Inhibitor

* Correspondence: Dr Cecile Tremblay.

¹Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, QC, Canada

²Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

Background

HIV-1 entry into target cells is initiated by interactions between the viral envelope (Env) protein gp120 and the host cell receptor CD4. It triggers conformational changes in gp120, forming the co-receptor binding site [1-3]. gp120 interaction with C-C chemokine receptor 5 (CCR5) or C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4) induces other conformational changes in gp120, which evoke structural re-arrangement of gp41 and enables the viral and cellular membrane fusion, permitting viral entry [4]. CCR5 inhibitors, including maraviroc (MVC), vicriviroc (VCV), aplaviroc, TAK-779 and TAK-220, antagonize this process and have strong anti-viral activity against HIV-1 in vitro [5,6]. Although they bind the hydrophobic pocket within transmembrane domains of CCR5 with high affinity, they occupy different sub-cavities by interacting with different amino acids [6]. MVC is the first CCR5 inhibitor approved for the treatment of R5-tropic HIV-1 infection in both naïve and treatment-experienced adult patients. VCV development was stopped because of suboptimal efficacy. MVC and VCV are allosteric inhibitors of virus entry, resistance to these drugs is evidenced by reduction in the plateau of virus inhibition curves rather than by increases in 50 percent inhibitory concentration (IC_{50}) [7,8]. The magnitude of this decrease can be expressed as maximum plateau inhibition (MPI) [9]. Plateau height depends on the relative affinity of HIV-1 for inhibitor-bound versus free CCR5, the greater the affinity for inhibitor-bound CCR5, the lower the height of the plateau [7]. MOTIVATE clinical trials of MVC revealed that the MPI of most MVC-resistant viruses in subjects failing therapy ranged from 80 to 95% [9]. In VICTOR-E1 clinical trials of VCV, phenotypic resistance was manifested by reductions in relative MPI. The cut-off value was 0.94 [8]. Changes in susceptibility to CCR5 inhibitors are usually accompanied by substitutions in gp120, with V3 domain appearing to play a critical role. However, substitutions outside this region also contribute to the resistance phenotype

[10]. The aim of this study is to investigate how mutations in other variable loops of the HIV-1 Env can contribute to MVC and VCV resistance.

Results

Selection of resistance mutations by in vitro passage

After 4 passages of CC1/85 virus in the presence of sub-inhibitory MVC concentrations, some mutations, such as V169M and N192K in V2, L317W in V3, I408A in V4, D462N, N463T, S464T and N465aD in V5, and L820I, I829V and Y837C in gp41, were associated with increased p24 levels (Table 1). After 16 passages, 2 new mutations materialized: I408T in V4 and P849Q in gp41 (Table 1). It is noteworthy that the mutation I408A in V4 appeared after 4 passages and disappeared at passage 16, when a new mutation, I408T, surfaced at the same position. For VCV, 2 mutations emerged after 4 passages: V169M in V2 and L317W in V3. After 16 passages, the mutation I840Y arose in gp41. No amino acid change was observed with either drug in the Env region of laboratory-adapted BaL virus after 16 passages (Additional file 1).

Susceptibility of mutant clones to MVC and VCV

Significant (85%) reduction in MVC's MPI was apparent for I408T, 84% for the double mutant V169M/I408T, 85% for L317W/I408T, and 83% for the triple mutant V169M/L317W/I408T. L317W and V169M/L317W mutants presented intermediate resistance of 95% and 94%, respectively. No significant MPI diminution occurred for the single mutant V169M (96%). A similar pattern was observed when measuring fold-change

(FC) increase in the IC_{50} , with I408T showing 4-FC, L317W 1.52-FC, and V169M, 1.23-FC increase. The double mutants V169M/L317W exhibited 1.30-FC, V169M/I408T 4-FC and L317W/I408T 3-FC, and 3.31-FC was evident for the triple mutant V169M/L317W/I408T (Table 2 and Figure 1A). The single mutants V169M and L317W and the double mutants V169M/L317W and V169M/I408T retained their susceptibility to VCV, reaching 100% inhibition in some cases. For VCV, I408T increased the IC_{50} by 2-FC, and the mutants I408T, L317W/I408T and V169M/L317W/I408T showed MPI of 94%, 93% and 94%, respectively (Table 3 and Figure1B).

Mutations affect virus infectivity differentially

The CC1/85 parental clone and mutants exhibited different levels of infectivity. All mutants manifested decreased infectivity that ranged from 20 to 38%. Infectivity percentage was 75% for V169M, 76% for L317W, 80% for I408T, 76% for the double mutants V169M/L317W, 63% for V169M/I408T, 67% for L317W/I408T, and 67% for the triple mutant V169M/L317W/I408T (Figure 2).

Tropism and V3 net charge

All CC1/85-derived mutants remained R5-tropic. None of them was able to replicate in U87CD4CXCR4+ cells, but did so well in U87CD4CCR5+ cells (Tables 2 and 3). R5-tropism was also confirmed by 2 different genotypic predictors, PSSM_{X4R5} [11,12] and geno2pheno co-receptor [13]. No change in V3 net charge was observed.

Discussion

Our findings indicate that viruses resistant to MVC can retain the use of CCR5 coreceptor as reported previously [14-16]. CCR5 inhibitors are associated with mutations in the Env V3 region of R5 isolates [14,17]. Our passage experiments revealed only 1 polymorphism in the V3 loop crown, L317W, which was associated with reduced infectivity, but not with resistance to CCR5 inhibitors or changes in V3 net charge (Tables 1 and 2). The selection of HIV-1 resistance to CCR5 inhibitors is relatively difficult [14,18], the V3 loop being the least variable of the HIV-1 Env variable regions [19]. Marozsan et al. found no amino acid changes in the V3 loop of CC1/85 resistant to VCV generated in vitro [15]. Wesby et al. reported a MVC-resistant CC1/85 virus generated in passage experiments with only 2 changes in amino acid positions 316 and 323 in the V3 loop [14]. Anastassopoulou et al. described D1/86.16, a VCV escape mutant that has no mutations in V3 [20]. Interestingly, when V3 substitution L317W is associated with V4 substitution I408T or triple substitution V169M/L317W/I408T, it confers further reduction of infectivity to 70% of the parental clone (Figure 2). This decreased infectivity could be due to lower fusion activity or binding affinity to the CCR5 co-receptor molecule of the mutant L317W. The same polymorphism was found by Yu et al. in V3 region of the gp120 isolates CRF07_BC and CRF01_AE, the predominant HIV-1 subtypes in China in patients naïve to CCR5 inhibitors. In their study, R5 isolates harboring 2 dominant polymorphisms, R315Q and F317W in V3, were less susceptible than B isolates to MVC and TAK779. They postulated that baseline resistance to entry inhibitors may be associated with naturally-occurring polymorphisms [21]. Yuan et al. [22] studied a combination of polymorphisms in the gp120 V3 loop of HIV-1JR-FL virus that can confer non-competitive resistance to MVC with a V3 loop library containing a set of random

combinations of 0-10 polymorphic mutations in vitro. After 17 passages, they found pseudoviruses containing the polymorphism F317W (F312W from the V3 library) with typical non-competitive resistance to MVC. The polymorphism F317W was also found by Muñoz-Nieto et al. in 2008 in the env region from primary isolates during follow-up of dual natural infection with subtypes B and G [23]. In our study, I408T in V4 was the mutation that conferred the highest level of resistance. occurred only in viruses resistant to MVC in passage experiments. It was a change from medium size and hydrophobic I to medium size and polar T. The mutation conferred resistance to MVC and was linked with cross-resistance to VCV, as indicated by MPI values. Although cross-resistance was observed for VCV, the virus was more resistant to MVC. Cross-resistance is commonly seen among CCR5 inhibitors [5]. Even if VCV had a favorable resistance profile, its virological activity was sub-optimal in phase II and III studies, possibly because of its pharmacokinetic profile and the dose chosen [5,24]. Tilton et al. [25] analyzed viruses from 11 treatment-experienced patients in whom virologic failure occurred on regimens containing MVC and noted that resistance was dependent upon mutations within the V3 loop which was only modulated by additional mutations in the V4 loop. The V4 mutations consisted of D407G and loss of a glycosylation site at residue 386.

Platt et al. [26] described HIV-1 CCR5 (Nt)-adapted mutants of the JR-CSF strain that had mutations in regions V3, V2 and C3 with 4 mutations in the V4 loop: N403S, N403K, T405A, and T405N. They concluded that loss of N-glycan at position 403 helps to convert the HIV-1 env into a hairpin-trigger form that no longer requires strong interactions with both the CCR5 amino terminus and ECL2 but efficiently targets either site alone [27-32]. Based on these models, we could postulate that the presence of T in position 408 of the V4 loop could alter the quaternary structure of the gp120-gp41 trimeric complex, eliciting conformational

transition from a high-energy to a low-energy state (fusogenic conformation), enhancing membrane fusion, and promoting the next step in the virus entry pathway. Since positions 403 and 408 of the V4 loop are close proximity, we imagine that the resistance conferred by I408T mutation in our study could alter the quaternary structure of the HIV-1 Env, thus sterically masking the glycosylation site in position 403. Mutations in V2, C3 and gp41 have also been observed in CC1/85-derived, MVC-resistant viruses [14]. The mutation V169M, identified in our study, was also found by Marozsan et al. in VCV escape mutant, which was resistant to VCV, but they did not investigate the contribution of each individual mutation to the resistant phenotype [15]. Recently, Thielen et al. [33] demonstrated that mutations at position 169 of the V2 loop can serve in HIV-1 co-receptor prediction. In their study, the mutation V169T showed strong association with CXCR4 usage while V169K was coupled with CCR5 usage. In another study, the mutation V169K in V2 was predictive of the R5 phenotype [34]. Our results disclosed that mutant V169M exploits R5 exclusively as a co-receptor. V169M mutation was coupled with reduced infectivity but not with a resistant phenotype. Unexpectedly, our triple mutant was less infective than single and double mutants as the emergence of mutations throughout gp120 and gp41 indicated general envelope gene (env) re-arrangement to compensate for decreased replicative capacity [35,36].

Conclusions

Several mutations outside the V3 loop were shown to contribute to CCR5 inhibitor resistance. Our results showed that I408T, L317W/I408T and V169M/L317W/ I408T mutants had the highest impact on MVC susceptibility, mostly due to I408T in V4. This mutation could lower the activation energy needed to enable gp41 to undergo the next conformational changes and acquire a more stable low-energy state. All mutants retained the CCR5 co-receptor, supporting the concept that resistant viruses maintained the ability to use inhibitor-bound CCR5, depending on co-receptor density on the cellular surface and the degree of CCR5 co-receptor occupancy by drug

Table 1 Summary of sequence changes in env gene associated with decreased susceptibility to MVC and VCV in passages experiments

Virus, drug	Passage no.	gp 120 V2 loop amino acid sequence	
CC1/85	Start	158	198
		SFNITTSIRNKVQKQYALFYKLDVVPIDNDSNNTNYRLISC	
CC1/85 control	4	-	-----
CC1/85, maraviroc	4	-----M-----	K-----
CC1/85, vicriviroc	4	-----M-----	
CC1/85 control	16	-----	
CC1/85, maraviroc	16	-----M-----	K-----
CC1/85, vicriviroc	16	-----M-----	
		gp 120 V3 loop amino acid sequence	
CC1/85	start	296	331
		CTRPNNYTRKSIHIGPRALYATGDIIGDIRQAHC	
CC1/85 control	4	-----	
CC1/85, maraviroc	4	-----W-----	
CC1/85, vicriviroc	4	-----W-----	
CC1/85 control	16	-----	
CC1/85, maraviroc	16	-----W-----	
CC1/85, vicriviroc	16	-----W-----	
		gp 120 V4 loop amino acid sequence	
CC1/85	start	385	
		CNSTKLFNSTWTWNNSTWNNTKRANDIEEITLPC	
CC1/85 control	4	-----	
CC1/85, maraviroc	4	-----A-----	
CC1/85, vicriviroc	4	-----	
CC1/85 control	16	-----A-----	
CC1/85, maraviroc	16	-----T-----	
CC1/85, vicriviroc	16	-----	
		gp 120 V5 loop amino acid sequence	
CC1/85	start	461	469
		KDNSTNEIFR	
CC1/85 control	4	-----	
CC1/85, maraviroc	4	TN--T---N--	
CC1/85, vicriviroc	4	-----	
CC1/85 control	16	-----	
CC1/85, maraviroc	16	TNTT-D---	
CC1/85, vicriviroc	16	-----	
		gp 41 amino acid sequence	
CC1/85	Start	642	681
		IYNLLEESQNQQEKNEQELLELDKWANLWNWFDISNWLWY	
CC1/85 control	4	-----	
CC1/85, maraviroc	4	-----	
CC1/85, vicriviroc	4	-----	
CC1/85 control	16	-----A-----	
CC1/85, maraviroc	16	-----A-----	
CC1/85, vicriviroc	16	-----	

Table 1 Summary of sequence changes in env gene associated with decreased susceptibility to MVC and VCV in passages experiments (Continued)

		gp 41 amino acid sequence
CC1/85	start	812 IKIFINATALAVAEGTDRILEVLQRAYRAILHIPRRIRP
CC1/85, maraviroc	4	----- ----- V C
CC1/85, vicriviroc	4	----- -----
CC1/85 control	16	----- ----- V A C
CC1/85, maraviroc	16	----- ----- V C Q
CC1/85, vicriviroc	16	----- ----- A

Residues are numbered according to the HXB2 gp120 sequence.

Figure 1 Sensitivity of parental and mutant clones to MVC (A) and VCV (B). HIV-1 Env pseudoviruses bearing the parental clone or Env-selected mutations V2 (V169M), V3 (L317W) and V4 (I408T) in single, double and triple combinations served to infect U87-CD4-CCR5 cells in the presence of increasing MVC and VCV concentrations. Infectivity was assessed by measuring luciferase activity 3 days after infection. The GraphPad Prism program generated inhibition curves. In each graph, the percentages of inhibition of parental clones are shown in red, and all results are the means of 3 experiments, each performed in triplicate.

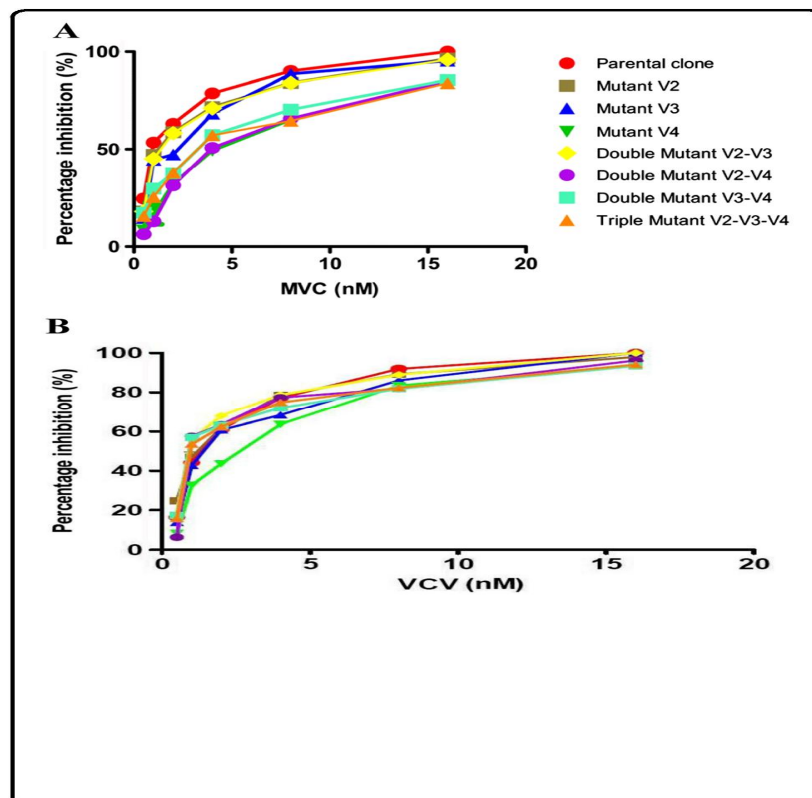


Table 2 Susceptibility and phenotypic properties of V2, V3 and V4 single, double and triple mutants against maraviroc

Loop	Mutant	Tropism	IC ₅₀	IC ₅₀ FC increase	MPI
Parental clone	Wild type	R5	1.47 nM	-	-
V2	V169M	R5	1.82 nM	1.23	96%
V3	L317W	R5	2.24 nM	1.52	95%
V4	I408T	R5	5.46 nM	4.00	85%
V2-V3	V169M	R5	1.92 nM	1.30	94.3%
	L317W				
V2-V4	V169M	R5	5.76 nM	4.00	84%
	I408T				
V3-V4	L317W	R5	4.29 nM	3.00	85%
	I408T				
V2-V3-V4	V169M	R5	4.88 nM	3.31	83%
	L317W				
	I408T				

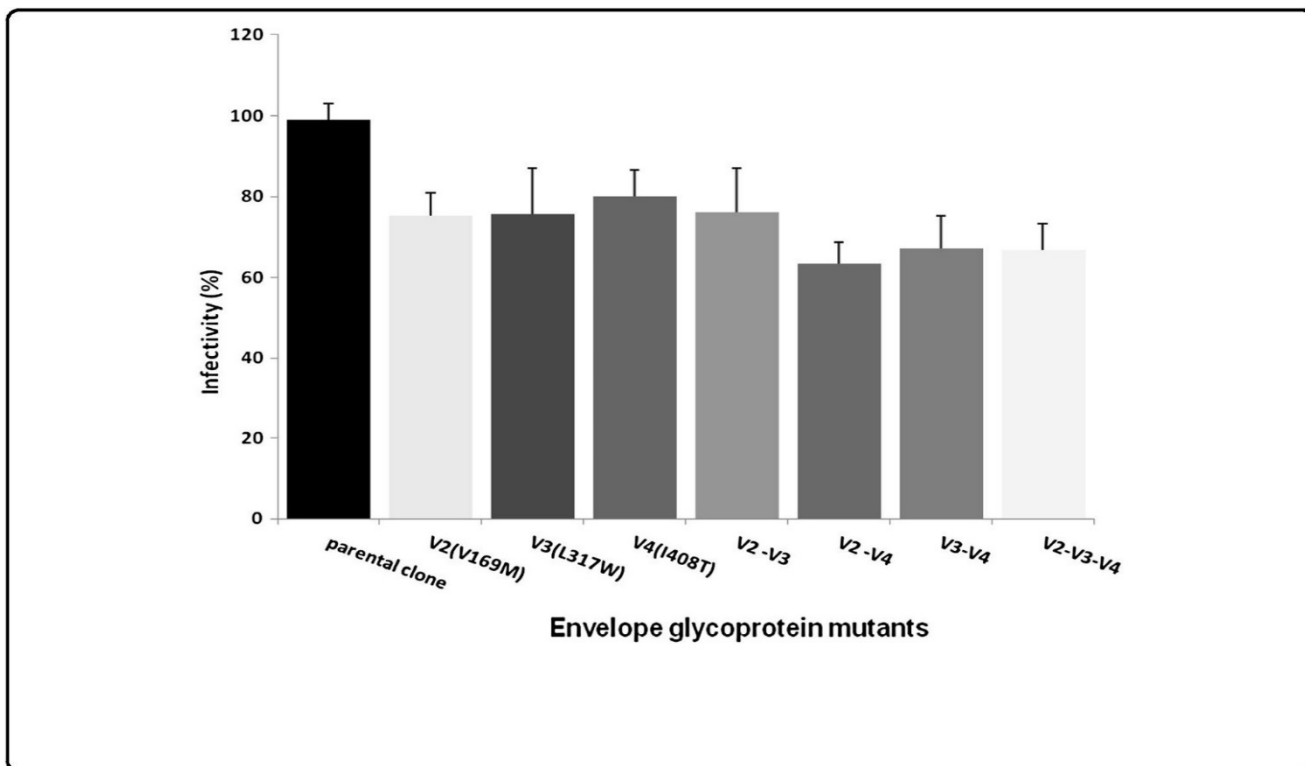
IC₅₀, 50% effective concentration or concentration needed to inhibit 50% of HIV. IC₅₀ FC was calculated as the ratio IC₅₀ for resistant virus/IC₅₀ for wild type virus. MPI

Table 3 Summary of susceptibility and phenotypic properties of V2, V3 and V4 single, double and triple mutants against vicriviroc

Loop	Mutant	Tropism	IC ₅₀	IC ₅₀ FC increase	MPI
Parental clone	Wild type	R5	1.56 nM	-	-
V2	V169M	R5	1.61 nM	1.03	100%
V3	L317W	R5	1.90 nM	1.21	100%
V4	I408T	R5	3.16 nM	2.02	94%
V2-V3	V169M	R5	1.56 nM	1.57	100%
	L317W				
V2-V4	V169M	R5	1.62 nM	1.03	96%
	I408T				
V3-V4	L317W	R5	1.68 nM	1.07	93%
	I408T				
V2-V3-V4	V169M	R5	1.59 nM	1.01	94%
	L317W				
	I408T				

IC₅₀, 50% effective concentration or concentration needed to inhibit 50% of HIV. IC₅₀ FC was calculated as the ratio IC₅₀ for resistant virus/IC₅₀ for wild type virus. MPI (maximum percent inhibition) was calculated as described in Methods

Figure 2 Effect of Env glycoprotein mutations on infectivity of the HIV-1 strain CC1/85.



U87-CD4-CCR5 cells were infected with HIV-1 Env pseudoviruses bearing parental clone (wild type) or Env single mutants V169M, L317W, I408T, double mutants V169M/L317W, V169M/I408T, L317W/I408T and the triple mutant V169M/L317W/I408T. Means from 3 independent experiments performed in triplicate are reported. Pseudovirus infectivity was calculated as RLU of the mutant/RLU of the wild type \times 100%

Methods

Compounds, cells and viruses

MVC and VCV were obtained from ViroChem Inc. Canada, now Vertex Canada Inc., reconstituted in DMSO 100% (Sigma, St. Louis, MO, USA) and diluted in RPMI 1640 culture medium (Sigma). Peripheral blood mono-nuclear cells (PBMCs) from 3 HIV-negative donors

were isolated by Ficoll-Paque gradient separation (Sigma), stimulated for 3 days with phytohemagglutinin (Sigma) at 1 mg/ml and re-suspended at 2×10^6 cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 20% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 50 U/ml penicillin (Invitrogen), 50 μ g/ml streptomycin (Invitrogen), 2 mM L-glutamine, 10 mM hydroxyethylpiperazine N-2 ethanesulfonic acid (HEPES) and 1 μ g/ml interleukin-2 (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ, USA) in 6-well plates (Becton Dickinson, Lincoln Park, N.J. USA.). 293T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) and supplemented with 10% FCS, 100 U/ml penicillin and 0.1 mg of streptomycin/ml U87CD4CXCR4 and U87CD4CCR5 cells were cultured in DMEM and supplemented with 10% FCS, 100 U/ml of penicillin, 0.1 mg of streptomycin/ml, 1 μ g/mL of puromycin (Sigma) and 300 μ g of G418 (Invitrogen). All cells were maintained at 37°C and 5% CO₂. Cells and the viruses BaL and CC1/85 (R5 tropic), III B (X4-tropic) and 85.6 (dual-tropic) were obtained from the National Institutes of Health.

Generation of HIV-1 mutants resistant to MVC and VCV by in vitro passage in PBMCs

2×10^6 PBMCs/ml were infected with 3,000 tissue culture infective doses 50% of BaL and CC1/85 viruses, in a final volume of 2 ml containing sub-inhibitory concentrations of 0.04 nM MVC and 0.02 nM VCV. Every 7 days, the culture supernatant was passaged onto fresh cells with MVC- and VVC-containing medium, and virus growth was monitored by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to measure supernatant p24 levels (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). MVC and VCV were added every 4 days at concentrations depending on p24 levels. MVC and VCV control passages were set up in parallel. Full length sequences of gp120 and gp41 were obtained for different time points, and

mutations from resistant viruses were identified. Resistance was defined as MPI <95% or ≥ 3 -FC in IC₅₀. Viral tropism was pre-dicted according to 11/25 and net charge rules [37] as well as PSSM_{X4R5} [11,12] and geno2pheno co-receptor algorithms [13]

Amplification and sequence analysis of the HIV env gene from selected time-points

HIV-1 RNA was extracted from culture supernatants with QIAmp Viral RNA mini-kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Full-length gp160 was amplified with re-verse transcription -polymerase chain reaction (RT-PCR) primers (5' NewFHindIII GGCCAAGCTTATGAGAGT GACGGAGATCAG and 5' YW15XhoI GGCCCTCGA GTTATCCAGTCCCCCCTTTTC), followed by nested polymerase chain reaction (PCR) with primers (5' NewFHindIII GGCCAAGCTTATGAGAGTGACGGAG ATCAG and 5' YW16XhoI GGCCCTCGAGTTATTTT GACCACTTGCCAC). PCR products were separated on 1% agarose gel and purified with QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Sequencing was undertaken at the Génome-Québec sequencing facilities in a 3730 × I DNA ana-lyser from Applied Biosystems (McGill University and the Genome Quebec Innovation Centre, Montreal, QC, Canada) with Sequencer 4.7 (Gene Code Softwar Corporation, Ann Arbor, MI, USA) and aligned by ClustalW version 1.83 [10]. Nucleotide sequences of CC1/85 have been deposited in GenBank under acces-sion numbers JQ924495 (start), JQ924496 (controlP4), JQ924497 (MVCP4), JQ924498 (VCVP4), JQ924499 (con-trolP16), JQ92450 (MVCP16), and JQ924501 (VCVP16).

Site-directed mutagenesis

Primers were designed with the Stratagene's web-based QuikChange® Primer Design Program [38]. Mutagenesis procedures were carried out according to an overlapping-extension PCR-based procedure [39,40].

Cloning and pseudovirus construction

The expression plasmid pcDNA3.1day/V5HisTOPO (Invitrogen) and Env PCR products of CC1/85, BaL, III B, 85.6 viruses and selected mutants (V169M in V2, L317W in V3 and I408T in V4) in single, double and triple combinations were digested with HindIII and XhoI restriction enzymes (Invitrogen), purified and ligated with T4 DNA Ligase (Invitrogen). The ligation product was transformed into E. coli TOP10 competent cells. Pseudoviruses were produced by co-transfection of Env expression plasmid and backbone pNL4-3. Luc.E-R-, as described previously [41,42]. Pseudovirus stocks were normalized with p24 ELISA prior to testing infectivity. Assays were performed with 25 ng of p24 per well.

Luciferase assays to determine infectivity and tropism

A luminescence assay using U87CD4CXCR5 and U87CD4CXCR4 cells was used to measure infectivity and tropism. On the day prior to infection, 1×10^6 cells per well were seeded in 96-well plates. On the day of infection, MVC and AMD 3100 were added to wells designated for treatment with an inhibitor and incubated for 1 h at 37°C prior to infection. 50 µl of normalized pseudovirus stocks were added in each well. The plates were incubated for 2 days at 37°C with 5% CO₂. The medium was removed, and 100 µl of lysis buffer (Promega Inc., Madison, WI, USA) was added to each well for 30 min. Then, 100 µl of luciferase assay reagent (Promega) was added immediately prior to reading the plates in a luminometer (Tecan, Morrisville, NC, USA). Luciferase activity was

recorded as relative light units (RLU). Viral entry was determined as percent reduction of viral infectivity compared to the controls. All experiments were performed in duplicate. IC₅₀-FC was calculated as the ratio of IC₅₀ for resistant virus/IC₅₀ for wild type virus. MPI was calculated as $[1 - (\text{RLU in the presence of drug} / \text{RLU in the absence of drug})] \times 100$, and infectivity as $\text{RLU of the mutant} / \text{RLU of the wild type} \times 100\%$. Inhibition curves were generated by GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA)

Abbreviations

(HIV-1): Human immunodeficiency virus-1 entry; (V3): Variable domain 3; (IC₅₀): Half maximal inhibitory concentration; (Env): Envelope protein; (CCR5): C-C chemokine receptor 5; (CXCR4): C-X-C chemokine receptor 4; (MVC): Maraviroc; (VCV): Vicriviroc; (MPI): As maximum percent inhibition; (FC): Measuring fold-change; (env): Envelope gene.

Competing interests

CT is the Pfizer/University of Montreal Chair in HIV Translational Research and a scholar from Fonds de la recherche en santé du Québec. The other authors declare no conflicts of interest.

Authors' contributions

OA-M participated in study conception and design, data collection, analysis and interpretation as well as manuscript drafting; AC supervised the study, analyzed and interpreted the data, and reviewed the manuscript;

YW participated in study conception and design; AH participated in data collection; MS participated in data collection, analysis and interpretations; CT participated in study conception and design, data analysis and interpretation, study supervision, and manuscript review. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank Dr. Andrés Finzi for reading our manuscript and offering valuable suggestions, Dr. Amal Nadiri for discussions on and assistance with mutagenesis, and the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program for the viruses, the backbone pNL4-3. Luc.E-R- and U87CD4CXCR4, U87CD4CCR5 and 293T cells.

Funding

This work was supported by the Réseau Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ)-SIDA.

Author details

¹Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, QC, Canada. ²Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada. ³Laboratoire de santé publique du Québec/Institut national de santé publique du Québec (INSPQ), Québec, Canada. ⁴CRCHUM – Hôtel-Dieu, Pavillon Jeanne-Mance, bureau 7-355, 3840 rue St-Urbain, Montréal, QC H2W 1T8, Canada.

References

1. Chen B, Vogan EM, Gong H, Skehel JJ, Wiley DC, Harrison SC: Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* 2005, 433:834–841.
2. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA: Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 1998, 393:648–659.
3. Pfaff JM, Wilen CB, Harrison JE, Demarest JF, Lee B, Doms RW, Tilton JC: HIV-1 resistance to CCR5 antagonists associated with highly efficient use of CCR5 and altered tropism on primary CD4+ T cells. *J Virol* 2010, 84:6505–651
4. Tilton JC, Doms RW: Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Res* 2010, 85:91–100.

5. Berro R, Klasse PJ, Moore JP, Sanders RW: V3 determinants of HIV-1 escape from the CCR5 inhibitors Maraviroc and Vicriviroc. *Virology* 2011
6. Kondru R, Zhang J, Ji C, Mirzadegan T, Rotstein D, Sankuratri S, Dioszegi M: Molecular interactions of CCR5 with major classes of small-molecule anti-HIV CCR5 antagonists. *Mol Pharmacol* 2008, 73:789–800
7. Strizki JM, Tremblay C, Xu S, Wojcik L, Wagner N, Gonsiorek W, Hipkin RW, Chou CC, Pugliese-Sivo C, Xiao Y, et al: Discovery and characterization of vicriviroc (SCH 417690), a CCR5 antagonist with potent activity against human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49:4911–4919.
8. McNicholas PM, Mann PA, Wojcik L, Phd PQ, Lee E, McCarthy M, Shen J, Black TA, Strizki JM: Mapping and characterization of vicriviroc resistance mutations from HIV-1 isolated from treatment-experienced subjects enrolled in a phase II study (VICTOR-E1). *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011, 56:222–229.
9. Roche M, Jakobsen MR, Sterjovski J, Ellett A, Posta F, Lee B, Jubb B, Westby M, Lewin SR, Ramsland PA, et al: HIV-1 escape from the CCR5 antagonist maraviroc associated with an altered and less-efficient mechanism of gp120-CCR5 engagement that attenuates macrophage tropism. *J Virol* 2011, 85:4330–4342.
10. McNicholas P, Wei Y, Whitcomb J, Greaves W, Black TA, Tremblay CL, Strizki JM: Characterization of emergent HIV resistance in treatment-naive subjects enrolled in a vicriviroc phase 2 trial. *J Infect Dis* 2010, 201:1470–1480.
11. Jensen MA, Li FS, van't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, McLaughlin S, Shankarappa R, Margolick JB, Mullins JI: Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *J Virol* 2003, 77:13376–13388.
12. Jensen MA, Coetzer M, van't Wout AB, Morris L, Mullins JI: A reliable phenotype predictor for human immunodeficiency virus type 1 subtype C based on envelope V3 sequences. *J Virol*

2006, 80:4698–4704.

13. Lengauer T, Sander O, Sierra S, Thielen A, Kaiser R: Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. *Nat Biotechnol* 2007, 25:1407–1410.
14. Westby M, Smith-Burchnell C, Mori J, Lewis M, Mosley M, Stockdale M,
15. Dorr P, Ciaramella G, Perros M: Reduced maximal inhibition in phenotypic susceptibility assays indicates that viral strains resistant to the CCR5 antagonist maraviroc utilize inhibitor-bound receptor for entry. *J Virol* 2007, 81:2359–2371.
16. Marozsan AJ, Kuhmann SE, Morgan T, Herrera C, Rivera-Troche E, Xu S, Baroudy BM, Strizki J, Moore JP: Generation and properties of a human immunodeficiency virus type 1 isolate resistant to the small molecule CCR5 inhibitor, SCH-417690 (SCH-D). *Virology* 2005, 338:182–199.
17. Trkola A, Kuhmann SE, Strizki JM, Maxwell E, Ketas T, Morgan T, Pugach P, Xu S, Wojcik L, Tagat J, et al: HIV-1 escape from a small molecule, CCR5-specific entry inhibitor does not involve CXCR4 use. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:395–400.
18. Kuhmann SE, Pugach P, Kunstman KJ, Taylor J, Stanfield RL, Snyder A, Strizki JM, Riley J, Baroudy BM, Wilson IA, et al: Genetic and phenotypic analyses of human immunodeficiency virus type 1 escape from a small-molecule CCR5 inhibitor. *J Virol* 2004, 78:2790–2807.
19. Roche M, Jakobsen MR, Ellett A, Salimisedabad H, Jubb B, Westby M, Lee B, Lewin SR, Churchill MJ, Gorry PR: HIV-1 predisposed to acquiring resistance to maraviroc (MVC) and other CCR5 antagonists in vitro has an inherent, low-level ability to utilize MVC-bound CCR5 for entry *Retrovirology* 2011, 8:89.
20. Zolla-Pazner S, Cardozo T: Structure-function relationships of HIV-1 envelope sequence-variable regions refocus vaccine design. *Nat Rev Immunol* 2010, 10:527–535.
21. Anastassopoulou CG, Ketas TJ, Klasse PJ, Moore JP: Resistance to CCR5 inhibitors caused

- by sequence changes in the fusion peptide of HIV-1 gp41. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106:5318–5323.
22. Yu X, Yuan L, Huang Y, Xu W, Fang Z, Liu S, Shao Y, Jiang S, Ma L: Susceptibility of HIV-1 Subtypes B', CRF07_BC and CRF01_AE that Are Predominantly Circulating in China to HIV-1 Entry Inhibitors. *PLoS O* 2011, 6:e17605.
23. Yuan Y, Maeda Y, Terasawa H, Monde K, Harada S, Yusa K: A combination of polymorphic mutations in V3 loop of HIV-1 gp120 can confer noncompetitive resistance to maraviroc. *Virology* 2011, 413:293–299.
24. Munoz-Nieto M, Perez-Alvarez L, Thomson M, Garcia V, Ocampo A, Casado G, Delgado E, Miralles C, de Parga EV, Sierra M, et al: HIV type 1 intersubtype recombinants during the evolution of a dual infection with subtypes B and G. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008, 24:337–343.
25. Wilkin TJ, Gulick RM: CCR5 antagonism in HIV infection: current concepts and future opportunities. *Annu Rev Med* 2012, 63:81–93.
26. Tilton JC, Wilen CB, Didigu CA, Sinha R, Harrison JE, Agrawal-Gamse C, Henning EA, Bushman FD, Martin JN, Deeks SG, Doms RW: A maraviroc-resistant HIV-1 with narrow cross-resistance to other CCR5 antagonists depends on both N-terminal and extracellular loop domains of drug-bound CCR5. *J Virol* 2010, 84:10863–10876.
27. Platt EJ, Shea DM, Rose PP, Kabat D: Variants of human immunodeficiency virus type 1 that efficiently use CCR5 lacking the tyrosine-sulfated amino terminus have adaptive mutations in gp120, including loss of a functional N-glycan. *J Virol* 2005, 79:4357–4368.
28. Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG: The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 1998, 393:705–711.
29. Wyatt R, Sodroski J: The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and

immunogens. *Science* 1998, 280:1884–1888.

30. Xiang SH, Finzi A, Pacheco B, Alexander K, Yuan W, Rizzuto C, Huang CC, Kwong PD, Sodroski J: A V3 loop-dependent gp120 element disrupted by CD4 binding stabilizes the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein trimer. *J Virol* 2010, 84:3147–3161.
31. Cormier EG, Dragic T: The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J Virol* 2002, 76:8953–8957.
32. Cormier EG, Tran DN, Yukhayeva L, Olson WC, Dragic T: Mapping the determinants of the CCR5 amino-terminal sulfopeptide interaction with soluble human immunodeficiency virus type 1 gp120-CD4 complexes. *J Virol* 2001, 75:5541–5549.
33. Huang CC, Lam SN, Acharya P, Tang M, Xiang SH, Hussan SS, Stanfield RL, Robinson J, Sodroski J, Wilson IA, et al: Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science* 2007, 317:1930–1934.
34. Thielen A, Sichtig N, Kaiser R, Lam J, Harrigan PR, Lengauer T: Improved prediction of HIV-1 coreceptor usage with sequence information from the second hypervariable loop of gp120. *J Infect Dis* 2010, 202:1435–1443.
- 35.
36. Monno L, Saracino A, Scudeller L, Punzi G, Brindicci G, Altamura M, Lagioia A, Ladisa N, Angarano G: Impact of mutations outside the V3 region on coreceptor tropism phenotypically assessed in patients infected with HIV-1 subtype B. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55:5078–5084.
37. Gonzalez-Ortega E, Ballana E, Badia R, Clotet B, Este JA: Compensatory mutations rescue the virus replicative capacity of VIRIP-resistant HIV-1. *Antiviral Res* 2011, 92:479–483.
38. Lucas GM: Antiretroviral adherence, drug resistance, viral fitness and HIV disease progression:

a tangled web is woven. *J Antimicrob Chemother* 2005, 55:413–416.

39. Poveda E, Alcami J, Paredes R, Cordoba J, Gutierrez F, Llibre JM, Delgado R, Pulido F, Iribarren JA, Garcia Deltoro M, et al: Genotypic determination of HIV tropism - clinical and methodological recommendations to guide the therapeutic use of CCR5 antagonists. *AIDS Rev* 2010, 12:135–148.
40. The stratagene's web-based Primer Design Program QuikChange® available at website at [<http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>]
41. Kanoksilapatham, GJM W, Robb FT: Directed-Mutagenesis and Deletion Generated through an Improved Overlapping-Extension PCR Based Procedure. *Silpakorn U Sci Tech J Vol* 2007, 1:7–12.
42. Aiyar A, Xiang Y, Leis J: Site-directed mutagenesis using overlap extension PCR. *Methods Mol Biol* 1996, 57:177–191.
43. Connor RI, Sheridan KE, Lai C, Zhang L, Ho DD: Characterization of the functional properties of env genes from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1996, 70:5306–5311.
44. Singh A, Page T, Moore PL, Allgaier RL, Hiramien K, Coovadia HM, Walker BD, Morris L, Ndung'u T: Functional and genetic analysis of coreceptor usage by dualtropic HIV-1 subtype C isolates. *Virology* 2009, 393:56–67.

Cite this article as: Asin-Milan et al.: Mutations in variable domains of the HIV-1 envelope gene can have a significant impact on maraviroc and vicriviroc resistance. *AIDS Research and Therapy* 2013 10:15.

4.3 Article 3. Ce travail a été publié dans le journal Antimicrobial Agents and Chemotherapy en septembre 2014. L'article est présenté ici dans sa version publiée [340]. O Asin-Milan 2014 Antimicrobial Agents and Chemotherapy p. 7565–7569 December 2014 Volume 58 Number 12. Short Communication.

Synergistic Combinations of the CCR5 Inhibitor VCH-286 with Other Classes of HIV-1 Inhibitors

Odalis Asin-Milan,^{a,b} Mohamed Sylla,^a Mohamed El-Far,^a Geneviève Belanger-Jasmin,^a Alpha Haidara,^a Julie Blackburn,^a Annie Chamberland,^a Cécile L. Tremblay^{a,b,c}

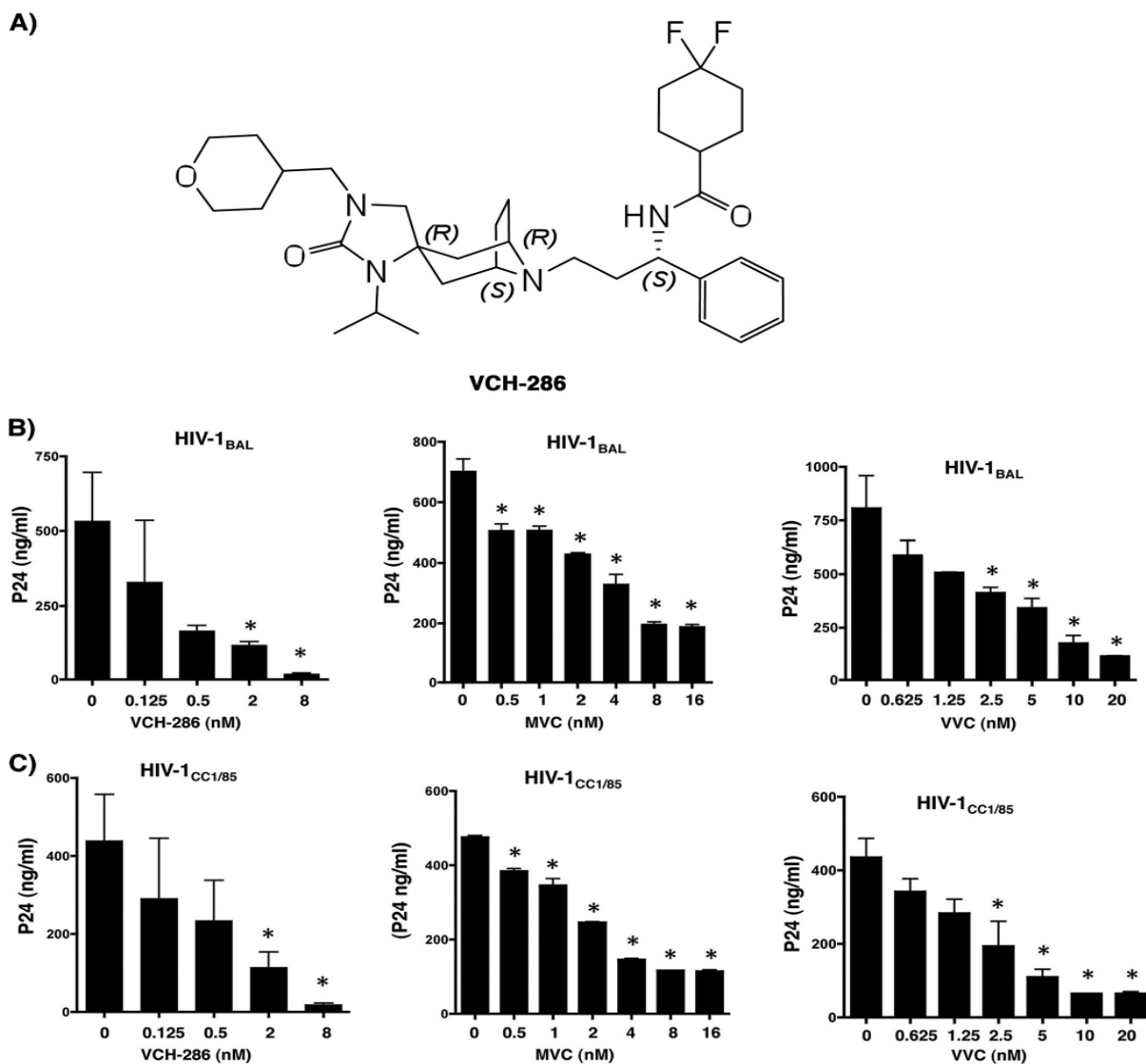
Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Canada^a; Department de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada^b; Laboratoire de Santé Publique du Québec/Institut National de Santé Publique du Québec, Montréal, Canada^c

Here, we evaluated the *in vitro* anti-HIV-1 activity of the experimental CCR5 inhibitor VCH-286 as a single agent or in combination with various classes of HIV-1 inhibitors. Although VCH-286 used alone had highly inhibitory activity, paired combinations with different drug classes led to synergistic or additive interactions. However, combinations with other CCR5 inhibitors led to effects ranging from synergy to antagonism. We suggest that caution should be exercised when combining CCR5 inhibitors *in vivo*.

HIV entry inhibitors represent a diverse group of drugs targeting multiple steps of the viral entry process. Among these drugs, the chemokine coreceptor CCR5 antagonist maraviroc is the only approved drug for combination therapy for the treatment of HIV-1 (1-3). The curing of an HIV-infected patient with acute myeloid leukemia treated with the hematopoietic stem/progenitor cells from a CCR5 32 homozygous donor highlighted the critical role of the CCR5 coreceptor in HIV infection and disease progression, and it raised hopes for HIV eradication using therapeutic approaches that inactivate CCR5 (4-7). Because of their broad therapeutic potentials, CCR5 inhibitors represent an interesting group of drug candidates. Of note, CCR5 inhibitors are not limited to the treatment of HIV infection, as CCR5 has been implicated in the pathophysiologies of a number of inflammatory diseases, such as transplant rejection, autoimmune diseases (e.g., multiple sclerosis), type 1 diabetes, colitis, and rheumatoid arthritis.

tis (8, 9). CCR5 inhibitors have been shown to reduce plaque formation in atherosclerosis and participate in the anti-tumor immune responses mediated by CCR5-expressing leukocytes (9). CCR5 inhibitors include different members, such as maraviroc (MVC) (UK-42785; Selzentry), vicriviroc (VVC), aplaviroc (AVC), and TAK-779 (10). This group of small-molecule inhibitors binds to the hydrophobic pockets located in the transmembrane domains of the HIV-1 cellular coreceptor CCR5, which induces conformational changes in CCR5. These changes inhibit HIV-1 entry by allosteric mechanisms preventing the binding of the viral protein gp120 to CCR5 (1, 11). Maraviroc (MVC), a phenylpropylamine, was the first CCR5 inhibitor approved by the FDA in 2007 for HIV-1 treatment in combination with other antiretrovirals for treatment-experienced patients, and as a first-line therapy in 2009 (1, 11, 12). The development of vicriviroc (VVC), a piperidinopiperidine and another CCR5 inhibitor tested in clinical trials, was discontinued because of suboptimal efficacy (1, 13, 14). Cenicriviroc, a CCR5/CCR2 antagonist, is currently under development in a phase II study (15). Finally, VCH-286 (a citrate salt, Fig. 1A) from ViroChem, Inc., Canada (now Vertex Pharmaceuticals), is a novel CCR5 antagonist. A phase I clinical study with VCH-286 in healthy volunteers showed favorable pharmacokinetics and safety profiles, and it has recently received phase II regulatory approval (16, 17). As more members of this class of entry inhibitors make their way through the process of development for use in HIV treatment, it is important to evaluate their interactions and rule out any antagonistic effects (4). Therefore, in this work, we aimed to evaluate the *in vitro* interactions of a new candidate CCR5 inhibitor, VCH-286, with other members of the same class, MVC and VVC, and also with representative candidates from other classes of HIV inhibitors.

FIG 1 (A) Chemical structure of the new CCR5 inhibitor VCH-286, a citrate salt. (B) Inhibitory effects of VCH-286 (left), MVC (middle), and VVC (right) on HIV-1_{BAL}. (C) Inhibitory effects of VCH-286 (left), MVC (middle), and VVC (right) on HIV-1_{CC1/85}.



The core viral protein p24 was measured from the culture supernatant by commercial enzyme-linked immunoassay (PerkinElmer) at day 7 postinfection (mean SD from three independent experiments). *, $P < 0.05$ calculated by paired t test (comparing the p24 production by HIV-infected cells with each drug concentration relative to infected nontreated cells). Cell viability was assessed by the exclusion method using the Trypan blue dye.

We first established the inhibitory effects of the three CCR5 inhibitors MVC, VVC, and VCH-286 using a dose-response inhibitory assay against two HIV-1 R5 isolates, the laboratory strain HIV-1_{BAL} and the clinical isolate HIV-1_{CC1/85} (18-21). Viral infections were carried out on total peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from three HIV- and hepatitis B virus-seronegative donors (all participants were adults and signed written informed consent approved by the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal [CRCHUM] institutional review boards). The cells were isolated by Ficoll-Paque gradient separation and stimulated for 3 days with phytohemagglutinin (PHA) (1 mg/ml) and interleukin-2 (1 g/ml) in 24-well tissue culture plates, followed by infection with 3,000 the tissue culture infectious doses (TCID) of the HIV-1 R5 viruses. As shown in Fig. 1B and C, viral replication of both HIV strains was readily inhibited by the three CCR5 inhibitors when monitored by the production of the viral core protein p24 (measured by enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA]). The 50% inhibitory concentrations (IC₅₀s) (calculated by dose-effect analysis using the CalcuSyn software [Biosoft, Cambridge, United Kingdom]) were used to determine the antiviral activities of the three drugs, as these compounds act at the cell surface and are not dependent on cellular uptake and metabolism. The IC₅₀s against the HIV-1_{BAL} strain for MVC, VVC, and VCH-286 were 1.85 nM, 3.38 nM, and 0.23 nM, respectively (Table 1).

TABLE 1 IC₅₀s obtained for MVC, VVC, and VCH-286 against the R5 viruses HIV-1BAL and HIV-1CC1/85

Drug		
	HIV-1BAL	HIV-1CC1/85
MVC	1.85	4.39
VVC	3.38	3.78
VCH-286	0.23	0.34

IC₅₀, 50% inhibitory concentration; MVC, maraviroc; VVC, vicriviroc.

The IC₅₀s against HIV-1CC1/85 for MVC, VVC, and VCH-286 were 4.39 nM, 3.78 nM, and 0.34 nM, respectively (Table 1). Of note, no toxicity was observed in the uninfected PBMCs with concentrations up to 1,000 nM with any of these three drugs. These results are thus consistent with earlier reports of strong antiviral activities of MVC and VVC against both HIV-1BAL and HIV-1CC1/85 infections (12, 22). Moreover, VCH-286 showed a significant inhibition of viral replication at drug concentrations that were lower than those of the two other drugs (i.e., IC₅₀s 8- to 14-fold lower than those of MVC and VVC).

We further evaluated the impact of drug interactions through paired combinations between MVC, VVC, and VCH-286 on HIV replication, using the same experimental settings. Drug combinations using CCR5 inhibitors may represent an interesting approach, as the association and dissociation rates to the CCR5 receptor may differ between the drug candidates, thus providing a pharmacodynamic advantage in maintaining adequate receptor occupancy (23). Therefore, we opted to define whether different drug combinations would result in synergistic

effects. Synergism takes place when the combination is more effective than single agent use; one of the agents increases the actions of the second drug. Antagonism is when the combination is less effective than with the use of single agents; one of the agents counteracts the actions of the other. We also employed a multiple-drug effect analysis. This multiple-drug effect analysis is based on the median effect principle and the isobologram technique (24). While the IC₅₀, IC₇₅, and IC₉₀ are the concentrations required to inhibit 50%, 75%, and 90%, respectively, the combination indexes (CI) CI₅₀, CI₇₅, and CI₉₀ of any given combination of two drugs provide information on the nature and extent of drug interaction at the IC₅₀, IC₇₅, and IC₉₀ of each drug, respectively. A combination was defined as synergistic when the CI value was < 1, additive when the CI was 1, and antagonistic when the CI was > 1, as described earlier (25). Combinations of CCR5 inhibitors showed interactions ranging from synergy to antagonism, as illustrated by the combination indices (CI) shown in Table 2.

TABLE 2 Combination indices for MVC, VVC, and VCH-286 against the R5 viruses HIV-1BAL and HIV-1CC1/85

Virus	Drug combination	CI ₅₀	SD	CI ₇₅	SD	CI ₉₀	SD	Interpretation
HIV-1BAL	MVC VCH-286	0.76	0.05	0.56	0.03	0.41	0.08	Synergy
	MVC VVC	9.53	0.629	7.49	0.377	5.61	0.53	Antagonism
	VVC VCH-286	0.96	0.06	1.055	0.007	1.08	0.03	Additive
HIV-1CC1/85	MVC VCH-286	0.61	0.01	0.50	0.002	0.43	0.014	Synergy
	MVC VVC	10.17	0.7	4.22	0.54	1.86	0.68	Antagonism
	VVC VCH-286	0.68	0.23	1.91	0.098	2.22	0.42	Antagonism

Data are presented as the means from two independent experiments (three replicates per condition for each experiment) standard deviations (SD). The ranges of doses used for MVC, VVC, and VCH-286 were as follows: 0.0128, 0.064, 0.32, 1.6, 8, 40, 200, and 1,000 nM. Combination index (CI) interpretation: < 1, synergy; = 1, additive; and > 1, antagonism.

The interaction of MVC and VCH-286 was highly synergistic under all tested concentrations against both viral isolates, with CI90 values of 0.41 (mean, 0.47 and 0.35 from two independent experiments) and 0.43 (mean, 0.44 and 0.42) for HIV-1BAL and HIV-1CC1/85, respectively.

In contrast, combinations of MVC with VVC showed highly antagonistic interactions against both HIV isolates under the different inhibitory concentrations tested, with CI90 values of 5.61 (mean, 5.99 and 5.24 from two independent experiments) and 1.86 (mean, 1.37 and 2.34) for HIV-1BAL and HIV-1CC1/85, respectively. Meanwhile, the interaction between VVC and VCH-286 was additive, with a CI90 value of 1.08 (mean, 1.1 and 1.05 from two independent experiments) against HIV-1BAL. However this same combination performed in an antagonistic fashion against HIV-1CC1/85, with a CI90 value of 2.22 (mean, 2.52 and 1.92 from two independent experiments).

VCH-286 was further evaluated in dual combinations with representative drugs from each of the currently approved antiretroviral classes: the nucleoside reverse transcriptase inhibitors zidovudine (AZT) and lamivudine (3TC), the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors nevirapine (NVP) and efavirenz (EFV) the protease inhibitors lopinavir (LPV) and saquinavir (SQV), the integrase inhibitor raltegravir (RTG), and the fusion inhibitor enfuvirtide (Fuzeon, T-20) (Table 3). The laboratory-adapted strain HIV-1BAL and the clinical isolate HIV-1CC1/85 were both susceptible to almost all the antiretroviral drug combinations with VCH-286 used in this study, and synergistic or additive interactions were observed, as shown in Table 3. The synergistic and additive effects of the combination of VCH-286 with other drug candidates are consistent with our earlier observations (26) and those of others (12) on the combination of the CCR5 inhibitors *in vitro* from. Only two exceptions with moderate and significant antagonistic effects were observed for HIV-1BAL and HIV-1CC1/85 when combining VCH-286 with lopinavir

and 3TC, respectively (Table 3). The CI₉₀ for the combination of VCH-286 with lopinavir against HIV-1BAL was 1.39 (mean, 1.69 and 1.09 from two independent experiments), whereas the CI₉₀ for the combination of VCH-286 with 3TC against HIV-1CC1/85 was 2.03 (mean, 2.2 and 1.85). Although we did not study the mechanism(s) underlying the clear antagonism between the CCR5 inhibitor VCH-286 and the nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) 3TC, this might be related to a potential interference with the cell activation process. The NRTI 3TC is known to be dependent on the cellular machinery in order to be transformed from the initial monophosphate to the triphosphate active form (27), a step that might be affected by the interference with CCR5 signaling by VCH-286. On the other hand, the moderate antagonism with lopinavir might be related to an unappreciated low level of cytotoxicity mediated by the drug combination. Of note, the cytotoxicities for all single drugs and drug combinations were assessed by treating noninfected cells with the highest concentrations used in the current study. Cell viability was tested by the Trypan blue exclusion method and showed negligible effects.

Altogether, our results clearly show that the new CCR5 inhibitor VCH-286 performed well when used as a single agent, with IC₅₀s 8- to 14-fold lower than those of the two other CCR5 inhibitor drugs. It also showed favorable combination indexes with drug candidates from different classes of viral inhibitors. However, its interactions with other CCR5 inhibitors ranged from synergistic to antagonistic, depending on the agent with which it was combined and the viral isolate. This variation in interactions suggests that overlapping binding sites of drugs on the CCR5 protein are likely involved in the antagonistic effects. Small-molecule inhibitors of CCR5 bind to the pocket formed by the transmembrane (TM) domain of CCR5 in helices 1, 2, 3, 5, and 7 (28). Although all inhibitors bind to the same hydrophobic pocket, they occupy different subcavities (29). The nature of the specific interactions within this pocket is unique to each molecule, as

they have different electrostatic shapes and polarities. Interestingly, the key residues involved in the interactions of CCR5 with MVC and VVC are similar (Glu283 on TM7, Tyr108 on TM3, Ile198 on TM5, and Tyr251 on TM6 [30]), and this overlapping binding is likely to explain the antagonistic effect that we observed upon combining these drugs *in vitro*. Our results are therefore consistent with earlier reports on the combination of CCR5 inhibitors. Nakata et al. (31) reported that a combination of the CCR5 inhibitor aplaviroc (AVC) and other members from the same class, such as TAK-779 and SCH-C, leads to mild synergism and additivity, respectively.

TABLE 3 Combination indices for VCH-286 and reverse transcriptase, protease, integrase, and fusion inhibitors at various inhibitory concentrations against the R5 viruses HIV-1BAL and HIV-1CC1/85

Virus	Drug	CI ₅₀	SD	CI ₇₅	SD	CI ₉₀	SD	Interpretation
HIV-1BAL	AZT	0.780	0.145	0.762	0.030	0.768	0.064	Synergy
	3TC	1.620	0.083	1.168	0.032	0.899	0.028	Synergy
	NVP	0.683	0.022	0.621	0.141	0.633	0.235	Synergy
	EFV	1.070	0.101	1.913	0.075	0.824	0.209	Additive
	LPV	1.143	0.914	1.235	0.701	1.397	0.421	Moderate antagonism (33)
	SQV	0.297	0.271	0.170	0.049	0.390	0.015	Synergy
	RTG	0.776	0.158	0.551	0.058	0.427	0.156	Synergy
	T-20	0.704	0.285	0.674	0.015	0.722	0.218	Synergy
HIV-1CC1/85	AZT	2.859	3.085	1.167	0.602	0.747	0.094	Synergy
	3TC	1.900	0.136	2.037	0.033	2.031	0.252	Antagonism
	NVP	0.686	0.081	0.911	0.086	0.741	0.003	Synergy
	EFV	1.039	0.145	0.883	0.033	0.790	0.161	Synergy
	LPV	1.243	0.144	0.849	0.013	0.568	0.036	Synergy
	SQV	0.342	0.207	0.237	0.144	0.479	0.148	Synergy
	RTG	0.969	0.034	0.933	0.035	0.992	0.003	Synergy
	T-20	0.741	0.056	0.734	0.003	0.802	0.134	Synergy

Data are presented as the means from two independent experiments (three replicates per condition for each experiment) standard deviations (SD). The ranges of doses used for MVC, VVC, and VCH-286 were as follows: 0.0128, 0.064, 0.32, 1.6, 8, 40, 200, and 1,000 nM. Combination index (CI) interpretation: <math>CI < 1</math>, synergy; $CI = 1$, additive; and $CI > 1$ antagonism.

Similarly, Murga et al. (32) observed a significant synergy for the humanized CCR5 monoclonal antibody (MAb) PRO 140 in combination with three small-molecule CCR5 inhibitors (maraviroc, vicriviroc, and TAK-779), with CI values from 0.36 to 0.61, but additive effects were observed with the combination of MVC and VVC.

In vitro studies of drug interactions have proven to be beneficial in predicting which drug combination regimens should be evaluated in a clinical setting (12–14). In the present study, we also evaluated the interactions between VCH-286 and representatives from each class of currently available antiretroviral agents *in vitro*. We have found that in the nanomolar range, VCH-286 exerted synergistic activity against two HIV-1 R5 viruses when it was combined with AZT, NVP, SQV, RTG, and T-20.

In conclusion, our current study highlights the efficacy of VCH-286 as a new antiviral agent inhibiting HIV-1 binding to CCR5. It has favorable drug interactions with antiretrovirals (ARVs) used in the clinic to treat HIV/AIDS, such as reverse transcriptase, protease, integrase, and fusion inhibitors, thus suggesting that VCH-286 may be a useful anti-HIV drug in combination therapy. However, we raise the possibility that antagonistic effects with the combination of CCR5 inhibitors, including this new drug candidate, may take place *in vivo*; hence, caution should be exercised when considering this type of combination in a potential treatment regimen.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by an unrestricted educational grant from CANFAR and Réseau FRQS-SIDAmi. C.L.T. is a scholar from the “Fonds de Recherche du Québec en Santé” and is Pfizer/University of Montreal chair on HIV translational research. We thank ViroChem, Inc., Canada (now Vertex Pharmaceuticals), for providing the VCH-286 compound and its chemical structure for the current study. We also thank Jean Bédard (ViroChem) for his guidance and discussions.

REFERENCES

1. Berro R, Klasse PJ, Jakobsen MR, Gorry PR, Moore JP, Sanders RW 2012. V3 determinants of HIV-1 escape from the CCR5 inhibitors maraviroc and vicriviroc. *Virology* 427:158–165. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2012.02.006>.
2. Kuritzkes DR. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. *Curr. Opin.HIV AIDS* 4:82–87. <http://dx.doi.org/10.1097/COH.0b013e328322402e>.
3. Veiga AS, Santos NC, Castanho MA. 2006. An insight on the leading HIV entry inhibitors. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 1:67–73.<http://dx.doi.org/10.2174/157489106775244046>.
4. Haqqani AA, Tilton JC. 2013. Entry inhibitors and their use in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Res.* 98:158–170. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.017>.
5. Allers K, Hutter G, Hofmann J, Loddenkemper C, Rieger K, Thiel E, Schneider T. 2011. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Delta32/Delta32 stem cell transplantation. *Blood* 117:2791–2799.<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-09-309591>.
6. Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Mussig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kucherer C, Blau O, Blau IW, Hofmann WK, Thiel E. 2009. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stemcell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 360:692–698. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0802905>.

7. Hütter G, Ganepola S. 2011. Eradication of HIV by transplantation of CCR5-deficient hematopoietic stem cells. *ScientificWorldJournal* 11: 1068–1076. <http://dx.doi.org/10.1100/tsw.2011.102>.
8. Ribeiro S, Horuk R. 2005. The clinical potential of chemokine receptor antagonists. *Pharmacol. Ther.* 107:44–58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.01.004>.
9. Corbeau P, Reynes J. 2009. CCR5 antagonism in HIV infection: ways, effects, and side effects. *AIDS* 23:1931–1943. <http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0b013e32832e71cd>.
10. Briz V, Poveda E, Soriano V. 2006. HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:619–627. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl027>.
11. Maeda K, Das D, Nakata H, Mitsuya H. 2012. CCR5 inhibitors: emergence, success, and challenges. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 17:135–145. <http://dx.doi.org/10.1517/14728214.2012.673584>.
12. Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, Mori J, Rickett G, Smith Burchnell C, Napier C, Webster R, Armour D, Price D, Stammen B, Wood A, Perros M. 2005. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4721–4732. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.11.4721-4732.2005>.
13. Berro R, Klasse PJ, Jakobsen MR, Gorry PR, Moore JP, Sanders RW. 2012. V3 determinants of HIV-1 escape from the CCR5 inhibitors maraviroc and vicriviroc. *Virology* 427:158–165. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2012.02.006>.
14. Strizki JM, Tremblay C, Xu S, Wojcik L, Wagner N, Gonsiorek W, Hipkin RW, Chou CC, Pugliese-Sivo C, Xiao Y, Tagat JR, Cox K, Priestley T, Sorota S, Huang W, Hirsch M, Reyes GR, Baroudy BM. 2005. Discovery and characterization of vicriviroc (SCH 417690), a CCR5 antagonist with potent activity against human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4911–4919. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.12.4911-4919.2005>.
15. Kagan RM, Johnson EP, Siaw MF, Van Baelen B, Ogden R, Platt JL, Pesano RL, Lefebvre E. 2014. Comparison of genotypic and phenotypic HIV type 1 tropism assay: results from the

- screening samples of Cenicriviroc Study 202, a randomized phase II trial in treatment-naive subjects. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 30:151–159. <http://dx.doi.org/10.1089/aid.2013.0123>.
16. Bhopale GM. 2012. Emerging drugs for the treatment of human immunodeficiency virus. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 7:45–52. <http://dx.doi.org/10.2174/157489112799829729>.
 17. Proulx LC, Clermont N, Laterreur PJ, Thibert R. 2008. Results of a phase I study to evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics (with and without ritonavir) and food-effect of VCH-286. *J. Int. AIDS Soc.* 11(Suppl 1):298. <http://dx.doi.org/10.1186/1758-2652-11-S1-P298>.
 18. Connor RI, Mohri H, Cao Y, Ho DD. 1993. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4₊ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* 67:1772–1777.
 19. Kuhmann SE, Pugach P, Kunstman KJ, Taylor J, Stanfield RL, Snyder A, Strizki JM, Riley J, Baroudy BM, Wilson IA, Korber BT, Wolinsky SM, Moore JP. 2004. Genetic and phenotypic analyses of human immunodeficiency virus type 1 escape from a small-molecule CCR5 inhibitor. *J. Virol.* 78:2790–2807. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.6.2790-2807.2004>.
 20. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. 1997. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J. Exp. Med.* 185:621–628. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.185.4.621>.
 21. Gartner S, Markovits P, Markovitz DM, Kaplan MH, Gallo RC, Popovic M. 1986. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* 233:215–219. <http://dx.doi.org/10.1126/science.3014648>.
 22. Westby M, Smith-Burchnell C, Mori J, Lewis M, Mosley M, Stockdale M, Dorr P, Ciaramella G, Perros M. 2007. Reduced maximal inhibition in phenotypic susceptibility assays indicates that viral strains resistant to the CCR5 antagonist maraviroc utilize inhibitor-bound receptor for entry. *J. Virol.* 81:2359–2371. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02006-06>.
 23. Swinney DC, Beavis P, Chuang KT, Zheng Y, Lee I, Gee P, Deval J, Rotstein DM, Dioszegi M, Ravendran P, Zhang J, Sankuratri S, Kondru R, Vauquelin G. 2014. A study of the molecular mechanism of binding kinetics and long residence times of human CCR5 receptor small molecule allosteric ligands. *Br. J. Pharmacol.* 171:3364–3375. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12683>.

24. Chou TC, Talalay P. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 22:27–55. [http://dx.doi.org/10.1016/0065-2571\(84\)90007-4](http://dx.doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4).
25. Chou TC. 1991. The median-effect principle and the combination index for quantitation of synergism and antagonism, p 61–102. *In* Chou TC, Rideout DC (ed), *Synergism and antagonism in chemotherapy*. Academy Press, New York, NY.
26. Tremblay CL, Giguel F, Kollmann C, Guan Y, Chou TC, Baroudy BM, Hirsch MS. 2002. Anti-human immunodeficiency virus interactions of SCH-C (SCH 351125), a CCR5 antagonist, with other antiretroviral agents *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother* 46:1336–1339. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.46.5.1336-1339.2002>.
27. Furman PA, Fyfe JA, St Clair MH, Weinhold K, Rideout JL, Freeman GA, Lehrman SN, Bolognesi DP, Broder S, Mitsuya H. 1986. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83:8333–8337. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.83.21.8333>.
28. Dragic T, Trkola A, Thompson DA, Cormier EG, Kajumo FA, Maxwell E, Lin SW, Ying W, Smith SO, Sakmar TP, Moore JP. 2000. A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:5639–5644. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.090576697>.
29. Tan Q, Zhu Y, Li J, Chen Z, Han GW, Kufareva I, Li T, Ma L, Fenalti G, Li J, Zhang W, Xie X, Yang H, Jiang H, Cherezov V, Liu H, Stevens RC, Zhao Q, Wu B. 2013. Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science* 341:1387–1390. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1241475>.
30. Kondru R, Zhang J, Ji C, Mirzadegan T, Rotstein D, Sankuratri S, Dioszegi M. 2008. Molecular interactions of CCR5 with major classes of small-molecule anti-HIV CCR5 antagonists. *Mol. Pharmacol.* 73:789–800. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.107.042101>.
31. Nakata H, Steinberg SM, Koh Y, Maeda K, Takaoka Y, Tamamura H, Fujii N, Mitsuya H. 2008. Potent synergistic anti-human immunodeficiency virus (HIV) effects using combinations of the

CCR5 inhibitor aplaviroc with other anti-HIV drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 2111–2119. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01299-07>.

32. Murga JD, Franti M, Pevear DC, Maddon PJ, Olson WC. 2006. Potent antiviral synergy between monoclonal antibody and small-molecule CCR5 inhibitors of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:3289–3296. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00699-06>.
33. Chou TC. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.* 58:621–681. <http://dx.doi.org/10.1124/pr.58.3.10>. CCR5 Combination Interactions December 2014 Volume 58 Number 12 aac.asm.org 7569

Discussion

5. Discussion

L'objectif de nos travaux était de confirmer notre hypothèse de travail qui stipule que les mutations associées à la résistance aux inhibiteurs de CCR5 identifiées dans plusieurs domaines de la glycoprotéine gp160 ont le potentiel d'altérer la structure quaternaire de l'enveloppe permettant ainsi aux souches résistantes l'utilisation du corécepteur CCR5 lié à l'inhibiteur. De plus la variabilité de l'enveloppe de différents isolats peut affecter les interactions entre deux inhibiteurs de CCR5, variant de la synergie à l'antagonisme, dépendamment des molécules et des souches virales utilisées.

Afin de caractériser les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de CCR5, nous nous sommes tout d'abord consacrés à développer un outil phénotypique de détermination du tropisme du VIH-1. Par la suite, nous avons utilisé cet outil afin de déterminer le tropisme viral de deux virus VIH-1 résistants, un isolat clinique, le virus CC1/85 et un virus de laboratoire, le virus BAL. Ces deux virus ont été générés lors d'expériences de passage en présence de concentrations sous-inhibitrices de MVC et VCV. Finalement, nous avons étudié les interactions entre différents inhibiteurs de CCR5 afin d'évaluer s'ils pourraient être utilisés dans un même régime thérapeutique ou de façon séquentielle.

5.1. Développement d'un test phénotypique pour la détermination du tropisme du VIH-1 et de la résistance phénotypique

Afin de développer un test phénotypique pour déterminer le tropisme du VIH-1, nous avons utilisé une technique basée sur l'utilisation de pseudovirus exprimant l'enveloppe d'intérêt du VIH. Cette technique peut être réalisée à partir d'un échantillon de plasma de patient ou à partir de cultures cellulaires infectées. Les pseudovirus ainsi générés peuvent infecter des lignées cellulaires exprimant le récepteur CD4 ainsi que les corécepteurs CCR5 ou CXCR4. L'infection est révélée à l'aide du gène rapporteur luciférase qui en présence de son substrat produit un signal lumineux quantifiable par bioluminescence [193].

Les techniques phénotypiques de détermination de tropisme utilisant des virus recombinants sont plus sensibles et plus rapides que les techniques classiques. Quelques tests fonctionnant sur la base de ces techniques sont actuellement commercialisés [84, 193, 215, 217, 341]. Trofile® de LabCorp, anciennement Monogram Biosciences, San Francisco, CA, est le test phénotypique le plus largement utilisé pour déterminer le tropisme en milieu clinique. Il a été utilisé pour déterminer le tropisme du VIH-1 dans des essais cliniques d'inhibiteurs de CCR5 [193, 218]. Dans sa version originale, Trofile® détecte les populations X4 ou R5 avec une sensibilité de 100% lorsque ces variants représentent 10% de la population virale et avec 85% de sensibilité lorsque ces variants constituent 5% de la population [35, 59]. Dans sa version améliorée, ES-Trofile peut détecter les virus X4 avec une sensibilité de 100 % quand ils représentent aussi peu que 0,3% de la population virale [341]. Ce test se base sur des fragments du gène *env* obtenus à partir de plasma pour construire des virus recombinants, qui

sont ensuite utilisés pour infecter les lignées cellulaires humaines U87CD4CXCR4 ou U87CD4CCR5 [193]. Les aspects limitants de ce test sont son coût élevé, sa disponibilité limitée en clinique, ainsi que la nécessité d'une charge virale > 1000 copies/ml d'ARN du VIH [342-344]. Mais, plus important encore, il ne permet pas de distinguer les virus à tropisme double des mélanges de virus R5 et X4 [84, 345, 346].

Notre approche a été de développer un test de tropisme phénotypique clonal qui permet de différencier les clones à tropisme double d'un mélange de virus R5 et X4. L'approche utilisant un cycle unique de réplication élimine la nécessité de déterminer les titres de virus avant l'infection des cellules cibles [347]. Nous avons utilisé les cellules U87-CD4-CCR5+ parce que leurs niveaux d'expression du corécepteur CCR5 reflète ceux observés sur les cellules T CD4+ [200]. Notre test utilise la totalité du gène *env* ce qui diffère d'autres tests qui analysent seulement les régions V1-V3 [215]. L'utilisation de la totalité du gène *env* permet l'étude de déterminants moléculaires complexes et de mécanismes d'inhibition et de neutralisation ciblant de multiples régions de l'enveloppe [193]. Notre test permet de détecter les populations minoritaires R5 et X4 quand elles représentent 0.4% ou plus de la population virale. Ce niveau de sensibilité est comparable à celui rapporté par d'autres tests phénotypiques [193, 218, 348, 349] comme par exemple le ES-Trofile qui détecte 0,3 % des variantes X4 avec une sensibilité de 100 % [341], ou le test Toulouse Tropism Test (TTT) qui permet de détecter des virus X4 ou R5X4 quand ils représentent 0,5 % de la population virale [348].

En clinique, la sensibilité des tests phénotypiques dépend de la charge virale, de l'infectiosité des enveloppes testées, de l'efficacité de l'extraction de l'ARN ainsi que de la transcription inverse de la matrice d'ARN viral [350]. Afin d'améliorer la sensibilité de l'étape d'amplification, nous avons mis au point deux protocoles d'amplification de l'enveloppe virale à partir de l'ARN des échantillons de plasma et de cultures cellulaires, ce qui a résulté en un taux d'amplification de 83.87 %. Ce taux d'amplification est similaire celui de 90% du test Trofile® [193]. Le taux d'amplification de la version améliorée du test Trofile® est supérieure à 95% quand la charge virale est supérieure ou égale à 1000 copies/ml d'ARN du VIH [341]. Nous avons validé notre test en utilisant 31 échantillons de patients avec infection chronique à VIH-1 de sous-type B et en comparant nos résultats avec ceux obtenus avec la version améliorée ES-Trofile. Nos résultats étaient concordants à 96,15%. Cette concordance est supérieure à celle de 85% trouvée entre le test Trofile® et le test Phenoscript de VIRalliance et similaire à celle de 90% et 91% entre les tests Toulouse Tropism Test (TTT) et les versions originale et améliorée du test Trofile® respectivement [348].

Une discordance entre les phénotypes D/M et X4 a été observée chez 3 patients. Deux patients ont été classifiés comme X4 par ES-Trofile et D/M par notre essai. La différence était attribuable à la plus grande sensibilité de détection des populations minoritaires de notre technique permettant une analyse de plusieurs clones et sa capacité à distinguer les virus à tropisme double des mélanges de virus R5 et X4. En effet, chez un patient, 9 clones étaient X4 et 1 seul clone R5. Dans un autre cas de discordance où notre test avait classifié l'échantillon comme D/M et le test ES-Trofile l'avait classifié comme R5, 2 clones étaient X4.

L'analyse de 10 clones par patient améliore la sensibilité de détection des populations minoritaires comparativement à une analyse populationnelle comme dans le cas du test ES Trofile® [13].

L'analyse phénotypique de nos échantillons a permis l'identification d'un phénotype R5 pur chez onze patients, X4 chez deux patients et un phénotype D/M chez douze patients. Parmi les phénotypes D/M nous avons trouvé un phénotype mixte comprenant des clones monotropiques R5 et X4 (R5, X4) seulement chez trois patients. Chez cinq patients, il s'agit d'un mélange de clones R5 et dual tropiques R5/X4 (R5, R5/X4). Chez trois patients nous avons pu observer un mélange de clones R5, dual tropiques et X4 (R5, R5/X4, X4). Un seul patient avait un mélange de clones X4 et dual tropiques (X4, R5/X4). Aucun des échantillons ne possédait uniquement des virus R5/X4. Cependant, nous les avons tous classifiés comme D/M à des fins de comparaison avec les autres tests existants. La sensibilité de détection des populations minoritaires X4 ou X4R5 est essentielle en clinique car elles peuvent mener à l'échec d'un traitement par inhibiteurs de CCR5. En effet, l'analyse de l'essai MERIT a montré que la présence de variants minoritaires utilisant CXCR4 dans plus de 1 % de la population virale totale est liée à un risque accru d'échec virologique chez les patients sous MVC. [263]. Une autre étude utilisant une technique de séquençage haut débit a montré que le taux de succès virologique varie en fonction de la proportion de virus X4 [351]. Ces données témoignent de l'importance d'utiliser un test de détermination du tropisme sensible afin de bien évaluer les options thérapeutiques et d'augmenter les chances de succès virologique [19]

Nous avons également testé six échantillons VIH-1 de sous-types non B, AGG, CRF02-A6, AK et AGK pour lesquels l'env a été amplifiée, clonée et le tropisme a été déterminé. Même si une validation complète exigerait la comparaison d'un grand nombre d'échantillons de sous-types B et non B du VIH-1, nos résultats suggèrent que les pseudovirus générés par cette méthode et l'analyse clonale utilisée ici peuvent déterminer avec précision l'utilisation du corécepteur à la fois au niveau expérimental et au niveau clinique.

Pour analyser l'avenir commercial du test de tropisme développé par notre laboratoire nous avons analysé certains points comme sa performance diagnostique, son taux de non-réponse, ses aspects organisationnels et son coût. Sa performance diagnostique, c'est-à-dire sa capacité à classer correctement les différents isolats clonaux présents dans les échantillons (spécificité du test) était de 100%, sa concordance avec Trofile® étant de 96%. Son taux de non-réponse, lequel correspond au pourcentage d'échantillons analysés pour lesquels il est impossible de donner un résultat, dans notre cas était de 26/31 (16 %). Sa capacité à détecter les populations minoritaires à tropisme X4 dans un mélange de virus, laquelle peut avoir des implications dans l'échec thérapeutique, était de 0.4 % ou plus [210]. Les aspects organisationnels sont aussi importants car il faut compter avec du personnel formé, une structure (laboratoire) adapté avec les équipements nécessaires au confinement de niveau 3. Le coût du test a été évalué par notre laboratoire et il a été déterminé qu'il est similaire à des essais de tropisme déjà disponibles commercialement. Nous croyons que nous disposons au CR-CHUM de tous les éléments nécessaires à l'implantation de ce test de tropisme lorsque cliniquement indiqué en complément aux tests génotypiques ainsi que pour des fins de

recherche. Le fait de pouvoir réaliser un test phénotypique de tropisme au Canada pourrait éliminer les problèmes organisationnels liés à l'envoi des échantillons par messagerie aux États-Unis.

La connaissance du tropisme du VIH-1 est essentielle afin d'évaluer l'utilité potentielle de nouveaux inhibiteurs de corécepteurs et d'en analyser les mécanismes de résistance, ce que nous avons fait dans la seconde partie de notre projet.

5.2. Caractérisation des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de CCR5

Le principal mécanisme de résistance aux inhibiteurs de CCR5 est un mécanisme d'inhibition non compétitive ou allostérique avec diminution du plateau maximal d'inhibition aux fortes concentrations de l'inhibiteur de CCR5 [261, 275]. La résistance non compétitive est évaluée expérimentalement en démontrant la réduction du plateau maximal d'inhibition <95% plutôt qu'un changement classique des valeurs d'IC₅₀ dans une courbe d'inhibition d'un test phénotypique [352].

Nous avons étudié comment les mutations dans les régions variables de la protéine gp120 de l'enveloppe du VIH-1 dans V3, mais aussi à l'extérieur de V3, peuvent contribuer à la résistance aux inhibiteurs de CCR5. Pour ce faire nous avons généré des virus résistants par

passage des isolats CC1/85 et BAL en concentrations sous-inhibitrices de MVC et de VCV que nous avons par la suite caractérisés génotypiquement et phénotypiquement.

Le modèle actuel d'interaction suggère que la gp120 se lie au CCR5 sur deux sites différents. Le «feuilleton de liaison» et des résidus de la base de V3 lient la partie N-terminale de CCR5. La couronne de V3 interagit avec la deuxième boucle extracellulaire de CCR5 [307]. Les inhibiteurs de CCR5 affectent principalement la conformation ECL2. Les variations de séquence de l'*env* présentes dans les souches résistantes pourraient directement ou indirectement modifier la conformation de V3, de sorte que sa couronne n'a plus besoin d'interagir avec la deuxième boucle extracellulaire de CCR5 [305]. Les virus résistants dépendent de l'interaction avec l'extrémité N-terminale. L'inhibition non compétitive se produit suite à des modifications au niveau de l'enveloppe virale qui vont permettre l'interaction CCR5-gp120 malgré la présence de l'inhibiteur. Ces modifications sont causées par l'émergence de mutants dans différentes régions de la gp120, V3, V2, C2 C4, V4 et gp41 [353-355].

La résistance aux inhibiteurs de CCR5 a été observée à la fois *in vitro* [261] et *in vivo* [305, 311]. Des essais cliniques évaluant les inhibiteurs de CCR5 ont montré deux voies de résistance par lesquelles le virus pouvait leur échapper. La première voie de résistance passe par la sélection de populations minoritaires X4 préexistantes [356] et la deuxième par la sélection de souches capables d'utiliser le corécepteur CCR5 pour l'entrée dans la cellule en présence de l'inhibiteur [305]. En effet, des études *in vitro* suggèrent que la deuxième voie est

la voie principale de résistance aux inhibiteurs de CCR5 à cause des mutations au niveau de la gp120 qui la rendent capable de reconnaître le complexe inhibiteur-CCR5 sans perdre sa capacité à interagir avec le corécepteur libre [89, 311, 357]. Ainsi, le virus résistant conserve habituellement le phénotype R5, même si CXCR4 est disponible en abondance relative [305].

La voie conférant la résistance aux inhibiteurs de CCR5 la plus courante est l'acquisition de multiples changements de séquence au niveau de la boucle V3 (V3-dépendante) [261, 311, 358], toutefois une voie V3-indépendante a également été décrite [311].

Des études précliniques du MVC ont montré que la résistance *in vitro* est accompagnée de substitutions/délétions dans la boucle V3 du virus CC1/85, A316T et I323V. Concernant le virus RU570, une délétion de trois résidus Δ QAI aux positions 315-317 a été observée [306]. Dans une étude de résistance *in vitro* pour AD101, un précurseur préclinique du vicriviroc, des changements d'acides aminés H308P et les substitutions K305R, A316V, et G321E ont été cartographiés dans la boucle V3 de la gp120 du virus CC101.19, un dérivé résistant du virus CC1/85 [305]. Dans une autre étude sur la résistance au maraviroc, le polymorphisme H308P a été trouvé dans la boucle V3 du dérivé résistant du virus CC1/85 D101,12. Le virus RU570 a développé les changements K305R, R315Q, K319T en présence de vicriviroc [359].

De plus, les substitutions d'acides aminés K305R, S306P, T307I, F316I, T318R et G319E dans la boucle V3, ont été observées chez un virus de patient résistant au VCV [316]. Au cours d'un essai clinique de phase 2, l'analyse de la résistance au VCV chez 26 sujets en échec

virologique, a démontré que seulement les virus de deux sujets avaient évolué vers une population virale D/M. L'analyse clonale des enveloppes des échantillons provenant de ces 2 sujets a révélé de multiples changements de séquence chez la gp160, principalement dans les boucles V1, V2, V3 et V4. Toutefois, aucun profil de mutations spécifiques associées à une sensibilité réduite au Vicriviroc n'a été identifié [315].

Lors de l'étude de phase 2 VICTOR-E1 comprenant 79 patients prétraités recevant 20 mg ou 30 mg de VCV en plus d'un traitement de base optimisé, 5 de 15 patients en échec virologique présentaient des virus résistants phénotypiquement. L'analyse clonale a permis d'identifier quelques mutations dans V3 associées avec la résistance au VCV comme G314A, R/G315E et D/E325G chez un sujet. Cependant, aucune mutation signature n'a été trouvée [317]. Ces résultats suggèrent que des substitutions qui se produisent à l'extérieur de la boucle V3 de la gp120 pourraient également contribuer à la diminution de la sensibilité au VCV.

Dans une analyse des études de phase 3 du maraviroc chez des patients ayant déjà reçu des multiples traitements antiretroviraux et qui présentaient seulement des virus R5 au début de l'étude (MOTIVATE 1 et 2), 2/3 des patients chez qui le traitement a échoué présentaient des virus à tropisme X4 et 1/3 des virus qui continuaient à utiliser le corécepteur CCR5. Ils arboraient les mutations I20F, A25D et I26V dans la boucle V3 (positions 317,322 et 323 du virus de référence HXB2) [360]. Cependant, le modèle mutationnel était différent chez chaque patient suggérant de multiples voies de résistance possibles [352]. Parmi 58 patients en échec thérapeutique au MVC après 48 semaines de traitement, 15 des virus analysés ont montré

des substitutions d'acides aminés dans la boucle V3. Sept des quinze virus analysés ont présenté des changements au niveau des positions 308 à 323 (positions de séquence de référence de la gp120 du virus HXB2) [260].

L'étude MERIT a comparé l'efficacité du MVC et d'Efavirenz chez des patients naïfs de traitement. Parmi les 29 patients qui présentaient au début de l'étude des virus à tropisme R5 exclusivement, 9/29 patients (31%) ont vu émerger des virus utilisant le CXCR4 et 4/29 patients (14%) avaient sélectionné des virus résistants à tropisme R5. D'autres raisons de l'échec thérapeutique étaient la présence de virus résistants à la Lamivudine ainsi qu'une mauvaise adhérence au traitement, témoignée par des taux de Maraviroc indétectables dans le plasma [263].

Des changements d'acides aminés dans la boucle V3 affectent clairement la sensibilité aux inhibiteurs de CCR5. Toutefois, d'autres voies génétiques peuvent être utilisées selon la souche virale et l'inhibiteur de CCR5 utilisé [361]. Les régions hors de la boucle V3 peuvent jouer un rôle primordial dans la résistance [355]. Une étude a montré que deux virus résistants au VCV ne présentaient pas de mutations dans la boucle V3, cependant ils présentaient des mutations dans la région du peptide de fusion de la gp41 [310, 362]. Les mutations à l'extérieur de V3 peuvent moduler l'effet des mutations de résistance primaire en V3. Par exemple, un clone d'un patient en échec thérapeutique avec APL possédait une délétion dans la boucle V3 en position 24 (positions 321 du virus de référence HXB2), huit mutations à travers la gp41 et onze mutations sur la face externe de la gp120 à proximité de résidus qui

interagissent avec la gp41. Dans ce cas, en analysant l'effet des mutations de gp41 avec et sans la mutation en V3, ils ont conclu que les résidus présents sur la gp120 et sur la gp41 étaient nécessaires pour une résistance complète [363]. D'autres exemples indiquent également que les mutations en V3 pourraient ne pas suffire pour une résistance totale [261, 269, 315, 317, 364]. Par exemple dans l'étude préclinique du MVC mentionnée précédemment qui avait permis l'identification des mutations A316T et I323V et une délétion de trois résidus Δ QAI au niveau des résidus 315-317, des substitutions à l'extérieur de V3 étaient également présentes. Les virus résistants dérivés du virus CC1/85 présentaient les mutations T163K au niveau de V2, N355Y au niveau de C3 et S405A au niveau de V4. D'autres dérivés du virus RU570 contenaient les mutations S132N au niveau de V1, D389N au niveau de V4, N442K au niveau de C4 et E509K au niveau de la gp41. Même si le rôle des mutations à l'extérieur de V3 n'a pas été formellement étudié dans cette étude, les variations des plateaux maximaux d'inhibition observées pour les différents clones d'enveloppe provenant du même stock de virus CC1/85 résistants et qui partagent les mêmes mutations de la boucle V3 suggèrent que les régions à l'extérieur de la boucle V3 ont contribué au phénotype de résistance [261]. Baba et collaborateurs, dans une étude de caractérisation de virus résistants à l'inhibiteur de CCR5 cenicriviroc (anciennement TAK-652) ont démontré qu'un virus hautement résistant à cette molécule, en plus de présenter la mutation Q309E en V3, arborait également les mutations K221N dans C2 et I769S dans la gp41. Les changements d'acides aminés à l'extérieur de V3 semblaient être nécessaires pour que le virus acquière une résistance complète à TAK-652 [364]. Des mutations dans la région V4 pourraient moduler la résistance conférée par les mutations dans V3. Tilton et collaborateurs ont caractérisé l'émergence de résistance dans

une cohorte de patients traités avec le MVC en combinaison avec une thérapie optimisée de base. L'émergence de la résistance était dépendante des mutations dans V3 ,P/T308H, T320H, et I322aV (la position 322a est absente dans HXB2 et se situe entre les résidus 322 et 323). Le virus présentait aussi les mutations V489I dans C5, D407G ainsi que la perte d'un site de glycosylation en position 386 de la boucle V4. Aucune mutation n'était présente dans la gp 41. Dans cette étude, le rôle des mutations en V4 a été étudié grâce à l'utilisation de pseudovirus qui portaient les mutations seules ou en combinaison. Les virus qui comportaient des mutations en V3 étaient résistants. Les virus résistants qui possédaient des mutations en V3 et en V4 étaient hautement résistants, mais le profil de résistance des virus qui contenaient des mutations en V4 seulement ressemblait au virus sauvage [269]. Ces données suggèrent que les mutations dans la boucle V4 de ce patient ne confèrent pas de résistance primaire au MVC, mais peuvent moduler l'ampleur de la résistance.

Afin de mieux comprendre l'impact de diverses mutations sur la résistance aux inhibiteurs de CCR5, nous avons réalisé des expériences de passage en présence de ces inhibiteurs et caractérisé les mutants.

Lors des expériences de passage en présence de MVC et de VVC, nous avons identifié des changements de séquences qui se situent dans V2 à la position 169, dans V3 en position 317, position 408 dans V4 et également dans la gp 41. Dans le cas de V2 et V3, ces changements surviennent généralement sur des sites naturellement polymorphes. Nous avons identifié un polymorphisme L317W, dans la couronne de la boucle V3, lequel est associé à une réduction

de l'infectivité, mais non avec la résistance au MVC. Quand la mutation L317W est seule ou associée avec I408T ou avec la triple substitution V169M/L317W/I408T, elle confère une réduction de l'infectivité d'approximativement 30% comparée avec le clone parental.

Dans notre étude, 16 passages du virus CC1/85 ont été nécessaires pour que le virus CC1/85 puisse acquérir une résistance à MVC, ce qui suggère que ce virus a une barrière génétique relativement élevée à l'acquisition de résistance à MVC comparé au 3TC que nous avons utilisé comme contrôle et pour lequel nous avons obtenu des mutations de résistance après un seul passage. Des résultats similaires ont été trouvés par Wesby et collaborateurs lesquels ont obtenu des mutations de résistance à MVC avec le virus CC1/85 après 17 passages et des mutations de résistance pour 3TC après un seul passage [306].

De façon intéressante, dans notre étude c'est la mutation I408T dans la région V4, donc à l'extérieur de V3, qui a conféré le plus haut niveau de résistance à la fois au MVC et au VCV. Cette mutation ne confère pas de changement de tropisme. Platt et collaborateurs ont proposé un modèle où la perte d'un site de N- glycosylation en position 403 (N403S/K) de la boucle V4 peut modifier la structure quaternaire du complexe trimérique gp120-gp41 et le convertir en une structure en forme d'épingle à cheveux capable de déclencher une transition conformationnelle d'un état de haute énergie à un état de basse d'énergie (une conformation fusogène) permettant l'amélioration de la fusion membranaire [365]. Considérant que les positions 403 et 408 de la boucle V4 sont rapprochées nous pouvons proposer que la mutation I408T observée dans notre étude pourrait modifier la structure quaternaire de l'env masquant le site de glycosylation en position 403.

Il a été montré que les changements de glycosylation dans la boucle V4 peuvent affecter la sensibilité d'un isolat à des anticorps neutralisants spécifiques présents dans le sérum d'un patient avec une infection aiguë au VIH [366]. Il a aussi été suggéré que l'augmentation de la longueur et du nombre de sites de glycosylation en V4 est associée à la résistance aux anticorps neutralisants et à la progression de la maladie [327]. Tout au long des 16 passages en culture du virus CC1/85, nous n'avons pas observé de changement de longueur dans la boucle V4. Toutefois, nous avons observé comme résultat de la mutation I408T, la formation d'un motif de N-glycosylation ou séquen (NDT) Asparagine-Acide Aspartique-thréonine, lequel peut être utilisé pour l'addition des oligosaccharides sur la protéine naissante au niveau du réticulum endoplasmique (RE).

La N-glycosylation est une modification post-traductionnelle des protéines consistant en l'addition de structures glycosydiques aux résidus d'asparagine aux chaînes peptidiques en croissance dès leur entrée dans la lumière du réticulum endoplasmique. Pour qu'une asparagine (N) soit glycosylée, il est nécessaire qu'elle reconnaisse un motif spécifique d'acides aminés ou séquen de type Asparagine X-Sérine/Thréonine (NXS/T), où X peut être n'importe quel acide aminé sauf la proline, suivi par une sérine (S) ou une thréonine [328].

L'enveloppe virale possède un bouclier de N-glycosylation (glycan shield), qui hérissé la surface de la gp120, au sein duquel chaque glycan contribue différemment aux propriétés antigéniques et fonctionnelles de l'enveloppe. L'altération d'un site de N-glycosylation ou de la

séquence qui l'entoure peut interférer avec le repliement des protéines et leur conformation ou affecter des parties plus éloignées de la protéine par encombrement stérique. Cette interférence stérique change l'immunogénicité des protéines de l'Env en modifiant la structure des épitopes et contribue à la résistance de ces souches virales aux anticorps neutralisants. Le remodelage permanent du bouclier de glycosylation via le changement de distribution des sites de N-glycosylation de l'Env est un des mécanismes permettant au VIH-1 d'échapper à la réponse neutralisante des anticorps[367].

Les anticorps neutralisants agissent en se liant aux spicules fonctionnels à la surface des virions empêchant ainsi les interactions entre l'enveloppe virale et les récepteurs sur la cellule cible par encombrement stérique [54, 56, 314, 368]. Les inhibiteurs de CCR5 se lient au corécepteur CCR5 au niveau de la poche formée par les hélices transmembranaires de ce dernier et perturbent la conformation du CCR5, aussi par encombrement stérique, en particulier celle de la deuxième boucle extracellulaire du CCR5, qui ne peut plus interagir avec la boucle V3 de la gp120 du VIH nécessaire à l'entrée du virus

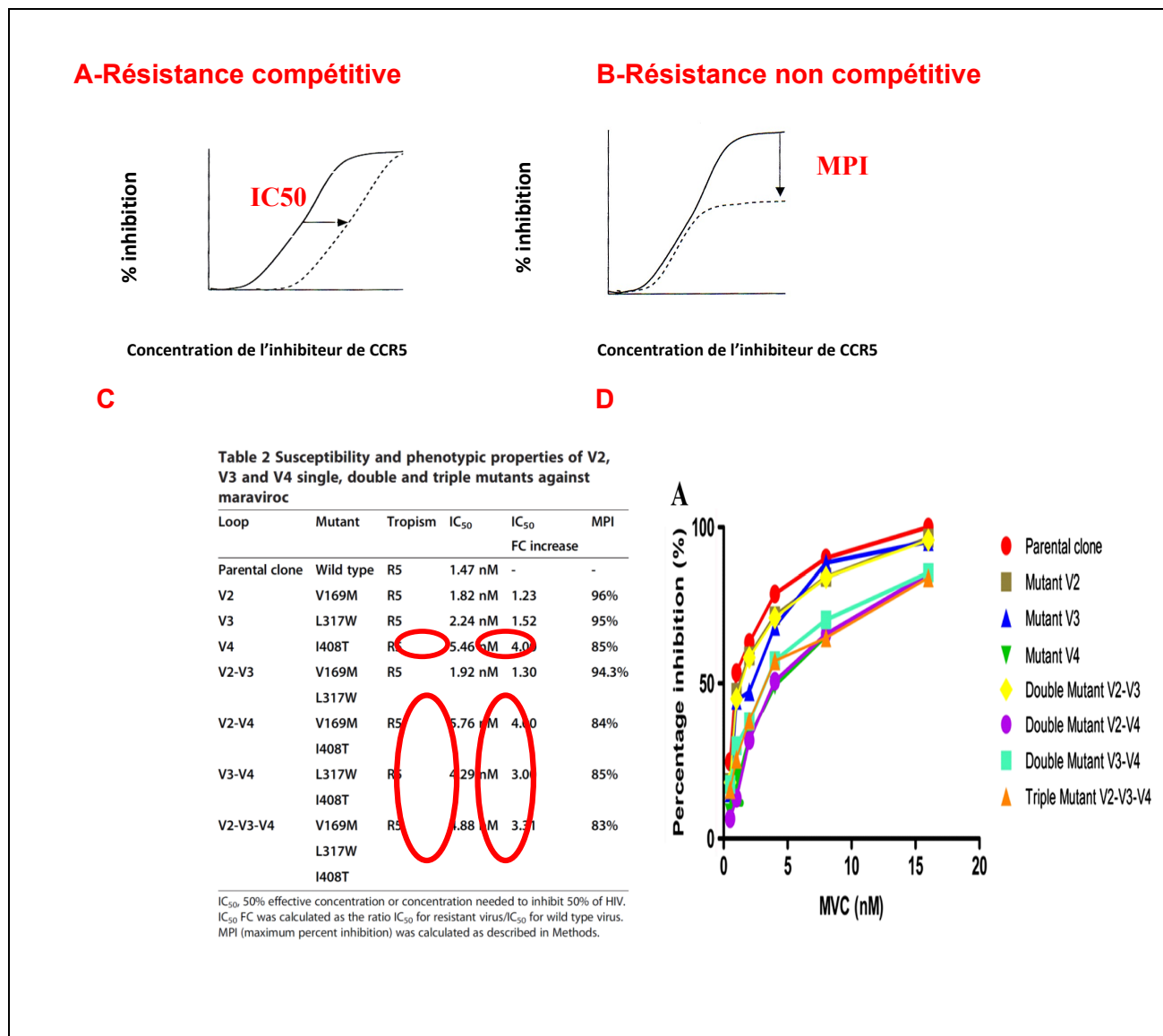
Étant donné les similarités des mécanismes d'action entre les inhibiteurs de CCR5 et les anticorps neutralisants, lesquels agissent par interférence ou encombrement stérique, on peut penser que le remodelage permanent du bouclier de glycosylation *via* le changement de distribution des sites de N-glycosylation de l'Env peut aussi contribuer à la résistance aux inhibiteurs de CCR5, car les mutations de résistance causées par la pression de sélection aux inhibiteurs de CCR5 qui causent la formation ou la perte d'un site potentiel de glycosylation

peuvent causer la destruction de l'intégrité structurelle de l'enveloppe et la perte des sites de liaison au corécepteur CCR5.

Nos résultats démontrent l'utilité de séquencer la boucle V4 et des sites potentiels de N-glycosylation en plus de la boucle V3 afin de détecter la résistance V3 indépendante aux inhibiteurs de CCR5 [311].

Il faut noter aussi que les mutants I408T (V4), V169M-I408T(V2-V4), L317W/I408T(V3-V4) et V169M/L317W/I408T(V2-V3-V4) ont à la fois démontré un profil de résistance de type non-compétitif ou allostérique caractérisé par des réductions du plateau maximal d'inhibition (MPI) de 85%,84%,85% et 83% respectivement, par rapport à la souche sauvage ainsi qu'un profil de résistance compétitif caractérisé par des changements des valeurs de l'IC50 de 4.00FC, 4.00FC, 3.00FC et 3.31FC respectivement (Figure 26). Ceci pourrait être dû à la disponibilité des récepteurs libres et la capacité d'utiliser le récepteur lié à l'inhibiteur.

Figure 26. Résistance aux inhibiteurs de CCR5 avec maintien du tropisme R5.



A-Résistance compétitive. On observe une augmentation de la valeur d'IC₅₀ de l'inhibiteur et l'inhibition maximale du virus est toujours possible. **B-Résistance non compétitive.** La valeur d'IC₅₀ reste inchangée, mais on trouve une réduction du plateau maximal d'inhibition (MPI). **C-Donnés de la susceptibilité des mutants au MVC.** Encerclés en rouge les mutants avec des augmentations des valeurs d'IC₅₀ de 3 et plus, caractéristiques de la résistance compétitive et les réductions du MPI inférieures à 90% caractéristiques de la résistance non compétitive. **D-Graphique du pourcentage d'inhibition** montrant la

reduction du MPI des mutants I408T(V4) représenté en triangle vert, V169M-I408T (V2-V4) en cercle violet , L317W-I408T (V3-V4) en carré vert turquoise et V169M- L317W -I408T en triangle orange.

5.3. Interactions des inhibiteurs de CCR5

Dans la troisième partie de ce travail, nous avons évalué l'activité antivirale d'un nouvel inhibiteur de CCR5, VCH-286 et ses interactions avec d'autres inhibiteurs de CCR5 tels que le MVC et le VVC ainsi qu'avec d'autres médicaments représentatifs de différentes classes d'antirétroviraux tels que les inhibiteurs de transcriptase inverse, de protéase, d'intégrase, et de fusion employés en clinique pour traiter le VIH/SIDA. Ceci a été réalisé afin d'évaluer le rôle de VCH-286 dans l'arsenal thérapeutique contre le VIH et de déterminer si ces molécules pourraient être utilisées ensemble dans un même régime thérapeutique. Pour le faire, nous avons d'abord évalué l'activité antivirale des trois inhibiteurs de CCR5 : VCH-286, MVC et VVC. Par la suite, nous avons évalué les interactions de VCH-286 avec des antirétroviraux représentatifs de différentes classes et finalement ses interactions avec MVC et VVC. Pour déterminer l'activité antivirale de chaque médicament nous avons calculé l'IC₅₀ de chaque agent unique par analyse dose-effet, grâce au programme CalcuSyn. Pour analyser l'effet des combinaisons des différentes molécules, les deux composés sont déposés en dilutions sériées croisées et l'index de combinaisons est calculé en utilisant la méthode de Chou et Talalay.

Nous avons démontré que le nouvel inhibiteur de CCR5 a une puissante activité antivirale supérieure à celle du MVC et du VVC contre les souches VIH-1_{BAL} et VIH-1_{cc1/85}. Son IC₅₀ est

de l'ordre du nanomolaire, une concentration inférieure de 8 à 14 fois par rapport au MVC et au VVC. Les IC_{50} de VCH-286, MVC et VVC contre la souche VIH-1_{BAL} étaient de 0,23 nM, 1,85 nM et 3,38 nM respectivement. Les IC_{50} de VCH-286, MVC et VVC contre la souche VIH-1_{CC1/85} étaient de 0,34 nM, 4,39 nM et 3,78 nM respectivement. Aucune toxicité n'a été observée dans les cellules non infectées avec des concentrations de chacun des médicaments allant jusqu'à 1000 nM. Ces résultats sont donc compatibles avec les rapports précédents sur l'activité antivirale du MVC et du VVC contre les souches VIH-1_{BAL} et HIV-1_{CC1/85} [369]. L'activité antivirale supérieure du VCH-286 par rapport au MVC et au VVC contre les souches VIH-1_{BAL} et VIH-1_{CC1/85} pourrait être liée à des différences d'affinités pour le CCR5, ce qui se reflète dans les valeurs de k_d de chaque inhibiteur et dans les différences de demi-vie de dissociation de chaque inhibiteur au récepteur. VCH-286 a une constante de dissociation k_d de 0.019 nM plus faible que celle du MVC 0.20 nM [370] et du VVC 0.40 nM. De plus il possède une demi-vie de dissociation du récepteur CCR5 plus lente (194h) [370] comparé au MVC et au VCV qui sont de 6,4h et 19,4h respectivement. Un faible k_d veut dire que il y a une forte affinité du récepteur pour son ligand, donc une très faible concentration du médicament sera efficace [371]. Ces différences d'affinités pourraient être causées par des interactions uniques et spécifiques de chaque molécule avec la poche commune de liaison au sein de CCR5 à cause des ses différentes formes et nature électrostatiques [251]. Le fait d'avoir une demi-vie de dissociation plus lente suggère que VCH-286 peut occuper le corécepteur CCR5 pour des périodes plus longues, ce qui permet un blocage prolongé du CCR5 [370]. Comme déjà souligné plus haut, le fait qu'aucune toxicité n'aie été observée dans

des PBMCs non infectés avec des concentrations de 1000 nM de VCH-286 nous indique que l'activité antivirale de la molécule n'est pas dûe à des effets cytopathiques.

La molécule VCH-286 a également été évaluée en combinaison avec des molécules représentantes de chacune des classes d'antirétroviraux actuellement approuvés: les inhibiteurs de la transcriptase inverse nucléosidiques zidovudine (AZT) et lamivudine (3TC), non nucléosidique de la transcriptase inverse névirapine (NVP) et efavirenz (EFV), inhibiteurs de la protéase lopinavir (LPN) et saquinavir (SQV), inhibiteurs de l'intégrase raltégravir (RTG) et les inhibiteurs de fusion enfuvirtide (EFV), Fuzeon ou T-20 (tableau 3). La souche de laboratoire VIH-1_{BAL} et l'isolat clinique VIH-1_{CC1/85} étaient tous deux sensibles à presque toutes les combinaisons de VCH-286 avec les traitements antirétroviraux utilisés dans cette étude. Seules deux exceptions avec des effets antagonistes légers ont été observées pour le VIH-1_{BAL} et VIH-1_{CC1/85} en combinant VCH-286 avec le lopinavir et le 3TC.

Pour savoir si l'effet antagoniste du VCH-286 en combinaison avec 3TC était un vrai antagonisme, nous avons décidé de tester la combinaison du 3TC et VCH-286 en utilisant trois différentes souches de VIH-1, les virus R5 RAS, RM et JC. Les résultats obtenus ont montré que l'interaction entre VCH-286 et 3TC était synergique pour toutes les concentrations testées sur le virus RAS avec des CI_{50} de 0.78, CI_{75} de 0.86 et CI_{90} de 0.97 pour le VIH-1_{RAS} et VIH-1_{CC1/85}, respectivement.

Par contre, l'interaction de VCH-286 et 3TC était antagoniste envers les virus VIH-1_{RM} et VIH-1_{JC} avec des CI₅₀ de 2.72, CI₇₅ de 2,37 et CI₉₀ de 2,025 respectivement pour le VIH-1_{RM}. Pour le virus VIH-1_{JC} les CI₅₀ étaient de 3.13, CI₇₅ de 2,82 et CI₉₀ de 2,58. Ces résultats suggèrent que la combinaison de VCH-286 et 3TC peut être antagoniste dépendamment de la souche virale utilisée. Étant donné que le nombre de résultats expérimentaux obtenus pour la combinaison était faible (n=7), plus d'expériences seraient probablement en mesure de déterminer si cette combinaison est vraiment antagoniste.

Les résultats de combinaisons favorables de VCH-286 avec d'autres représentants de chacune des classes d'antirétroviraux actuellement approuvés contre le VIH-1 sont cohérents avec les données trouvées par notre groupe lors de l'analyse de TAK 220 et SCH-C en combinaison avec la Zidovudine, la Lamivudine, l'Indinavir, et l'Efavirenz contre des isolats cliniques de VIH-1 [336, 372]. De plus ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Dorr et collaborateurs lors de l'évaluation des interactions du maraviroc avec des molécules représentantes de chacune des classes d'antirétroviraux [369].

Les interactions entre antirétroviraux des différentes classes sont normalement synergiques parce qu'ils bloquent différentes étapes du cycle de vie du VIH [325]. L'antagonisme observé en associant VCH-286 et 3TC pourrait être lié à une interférence avec le processus d'activation de la cellule 3TC est connue pour être dépendante de la machinerie cellulaire pour être transformé de monophosphate à triphosphate, cette étape pourrait être affecté à cause l'interférence avec la signalisation de CCR5 causé par VCH-286.

D'autre part, l'antagonisme modéré avec lopinavir pourrait être lié à un faible niveau de cytotoxicité causé par la combinaison. La cytotoxicité pour toutes les combinaisons simples et des médicaments a été évaluée par le traitement des cellules non infectées avec les concentrations les plus élevées utilisées dans la présente étude. La viabilité cellulaire a été testée par trypan méthode d'exclusion au bleu et a montré des effets négligeables.

Des études d'interactions médicamenteuses ont montré qu'une même combinaison médicamenteuse pourrait être antagoniste à des faibles effets, par exemple (IC_{30} au IC_{50}) et être synergique à des effets élevés comme (IC_{90} au IC_{95}) [373, 374]. Pour le VIH et le cancer, l'index de combinaison à 90 % d'inhibition (IC_{90}) est plus utilisé, car il est plus relevant en clinique [325]

L'interaction du MVC et du VCH-286 était hautement synergique dans toutes les concentrations testées contre les deux souches virales avec des CI_{90} de 0,41 et 0,42 pour VIH-1_{BAL} et VIH-1_{CC1/85}, respectivement. En revanche, les combinaisons du MVC avec le VCV ont montré des interactions hautement antagonistes à la fois contre des isolats de VIH dans les différentes concentrations inhibitrices testées avec des IC_{90} de 5,61 et 1,86 pour le VIH-1_{BAL} et VIH-1_{CC1/85}, respectivement. L'interaction entre le VVC et le VCH-286 était additive avec la valeur d' CI_{90} de 1,08 contre le VIH-1_{BAL}. Toutefois, cette même combinaison a montré de l'antagonisme contre la souche VIH-1_{CC1/85} avec une CI_{90} 2,22. Cet antagonisme pourrait s'expliquer par le fait que le VCH-286 et VVC interagissent avec les mêmes résidus sur le site

de liaison au corécepteur. Les petits inhibiteurs du CCR5 se lient tous dans la même poche hydrophobe dans CCR5 mais occupent différentes sous-cavités. La nature des interactions spécifiques au sein de cette poche est unique à chacune de ces molécules, car elles ont des formes et des polarités électrostatiques différentes. Les résidus clés impliqués dans les interactions avec le MVC et le VCV sont Glu283 en TM7, Tyr108 en TM3, Ile198 en TM5, et Tyr251 en TM6 [251]. Même si le MVC et le VVC interagissent avec les mêmes résidus ils ont toutefois des affinités différentes. Par exemple, le MVC interagit fortement à la position 283 (Glu283), alors que pour le VVC l'interaction la plus forte se situe avec l'acide aminé Ile198 via des interactions hydrophobes [251]. Nous croyons que l'antagonisme que nous avons trouvé dans la présente étude est également possible dû au fait que la liaison du premier inhibiteur de CCR5 au corécepteur provoque une modification de la conformation du corécepteur qui permettra une diminution de son affinité pour le deuxième inhibiteur ajouté dans la combinaison [375, 376].

Des résultats similaires de combinaison d'inhibiteurs de CCR5 ont été rapportés par Nakata et collaborateurs dans une étude de combinaison d'inhibiteurs de CCR5 AVC, TAK 779 et SCH-C. Ce groupe a observé une légère synergie, une additivité ou un antagonisme. Il y avait une tendance à l'antagonisme lors de la combinaison de l'AVC avec SCH-C ainsi qu'entre SCH-C et lui même. Une tendance vers la synergie était observée lorsque l'AVC était en combinaison avec TAK779 ou TAK779 avec lui même. Le groupe a conclu qu'il faut considérer avec prudence l'utilisation des combinaisons de certains inhibiteurs de CCR5 [339]

Dans une autre étude Murga et collaborateurs ont observé une puissante synergie avec l'anticorps monoclonal humanisé anti CCR5, PRO 140 lorsque utilisé en combinaison avec trois petites molécules inhibitrices de CCR5 (maraviroc, vicriviroc et TAK-779), les valeurs du CI étaient entre 0,36 et 0,61, mais la combinaison du MVC et du VCV montrait un effet additif [338].

Notre équipe a aussi montré une synergie entre les deux inhibiteurs de CCR5, SCH-C et AOP-RANTES ainsi qu'entre SCH-C et l'inhibiteur de fusion T-20. La combinaison de SCH-C et AOP-RANTES a été testée contre un isolat R5 et les valeurs du CI étaient comprises entre 0,36 et 0,42. Les interactions entre T-20 et SCH-C étaient synergiques contre une large variété d'isolats cliniques R5 avec des valeurs de CI allant de 0,33 à 0,98 [337].

Dans une autre étude notre groupe a également constaté une interaction hautement synergique entre l'inhibiteur de CCR5 TAK-220 et l'inhibiteur de fusion T-20 contre toutes les souches virales testées à chaque concentration inhibitrice utilisée [336]. Ici il faut noter qu'il s'agit d'un inhibiteur de CCR5 et un inhibiteur de fusion pour lesquels on s'attend à trouver un effet synergique, car ils agissent à différentes étapes de l'entrée et vont se lier à des endroits différents.

Notre étude a montré une variation importante des interactions en fonction des souches virales et des inhibiteurs utilisés. L'expression différentielle de CCR5 à la surface cellulaire pourrait influencer l'efficacité des inhibiteurs de CCR5 [377]. Afin de prévenir ces variations, nous avons utilisé un mélange (pool) de PBMCs de trois donneurs différents et avons répété

l'expérience à trois reprises, chaque fois en duplicata. Un autre facteur qui pourrait affecter les interactions entre inhibiteurs de CCR5 est la présence d'inhibiteurs exogènes ou naturels qui provoquent une régulation négative et induisent l'endocytose du récepteur réduisant ainsi sa disponibilité pour l'infection par les virus R5. Il s'agit par exemple le cas des ligands naturels de CCR5 comme RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β [378].

Il est important de comprendre les interactions entre les inhibiteurs de CCR5, car ils sont actuellement à l'étude dans un contexte de microbicide en combinaison avec d'autres ARV et des interactions défavorables *in vitro* déconseilleraient leur usage en combinaison en clinique. [292-294, 303].

Certaines différences entre nos résultats et ceux des études mentionnées peuvent être attribuées aux différences concernant la nature chimique des molécules utilisées ainsi qu'aux systèmes expérimentaux, les types cellulaires et les souches virales utilisés.

Conclusions

et

Perspectives

6. Conclusion et perspectives

Lors de ce travail, nous avons développé un outil phénotypique clonal sensible et reproductible permettant de déterminer le tropisme du VIH-1. Ce test est également utile non seulement pour évaluer le tropisme du VIH de spécimens cliniques ou de cultures cellulaires, mais aussi pour évaluer la résistance aux inhibiteurs de CCR5. Le niveau de sensibilité de notre test est comparable à celui rapporté par d'autres tests phénotypiques actuellement commercialisés. La disponibilité de cette technique au Canada permettrait un accès rapide aux résultats à coûts moindres, étant donné l'élimination du transport des échantillons à l'étranger. À cause de sa haute sensibilité le test pourrait être utilisé pour déterminer des populations très rares et . Ce système peut être utilisé également pour différencier l'effet des mutations sur l'infectivité virale ainsi que la sensibilité aux médicaments et non seulement sur le tropisme viral. Cette technique sera également utilisée pour étudier la sensibilité des virus aux anticorps neutralisants dans le cadre d'étude vaccinales.. Elle pourra être utilisées pour déterminer les interactions entre différents inhibiteurs d'entrée en développement. Il sera utile, de compléter l'évaluation de la performance de notre test sur une banque de souches non-B.

Nous avons aussi démontré que plusieurs mutations à l'extérieur de la boucle V3 peuvent contribuer à la résistance aux inhibiteurs de CCR5. La mutation I408T seule ou en combinaison double et triple L317W/I408T V169M/L317W/I408T semble avoir le plus d'impact sur la susceptibilité au MVC.

Les mutations F317W et V169M ont été associées au phénotype de résistance uniquement quand elles étaient en double ou triple combinaison des mutants en présence de la mutation I408T. La mutation I408T dans la boucle V4 pourrait causer une modification de la structure quaternaire de l'env et la convertir en une structure capable de déclencher une transition conformationnelle d'un état de haute énergie, pré-fusogène, à un état de basse d'énergie, fusogène, favorisant la fusion membranaire. Cette mutation permet la formation d'un site potentiel de glycosylation, lequel pourrait être utilisé pour l'addition d'oligosaccharides et pourrait ainsi avoir un impact dans la structure de l'enveloppe et sa sensibilité aux anticorps neutralisants. Tous les mutants générés lors de nos expériences de passage ont conservé l'utilisation du corécepteur CCR5, étayant le concept de la capacité du virus résistant à utiliser l'inhibiteur de CCR5 lié au corécepteur. Toutefois, le phénotype de résistance n'a pas de signature moléculaire unique et semble être propre à chaque combinaison de virus, d'inhibiteur, et de type de cellule.

Dans de travaux ultérieurs, il serait intéressant d'analyser l'impact de la mutation I408T sur la structure tertiaire de l'enveloppe ainsi que de tester la sensibilité de nos différents mutants aux anticorps neutralisants. Il serait particulièrement intéressant de tester les anticorps qui ciblent la gp120: IgGb12, 2G12, X5 ainsi que ceux qui ciblent la gp41 comme 17b, 2F5 et 4E10. Les anticorps 2G12 se lient à des sites de glycosylation en position 332, 339 et 392. IgGb12 est un anticorps anti-CD4 binding site. Son épitope est situé au niveau du site de liaison avec la molécule CD4, X4 et 17b sont quant à eux des anticorps anti-épitope CD4 induits, ces épitopes sont exposés uniquement après interaction de la gp120 avec la molécule CD4.

L'anticorps HGN194 reconnaît un épitope linéaire conservé de la région variable V3 situé dans le domaine d'interaction avec CCR5 ou CXCR4, 2F5 reconnaît l'épitope ELDKWA, lequel se trouve dans l'ectodomaine de la gp41. 4E10 lie l'épitope linéaire très conservé NWF(D/N)IT dans la gp41[371]. On peut croire que le mutant I408T en V4 seul ou en combinaison pourrait provoquer une diminution ou une absence de sensibilité aux anticorps anti-CD4 binding site, à l'anticorps HGN194 et aux anticorps anti CD4 induit à cause d'une perte des sites de liaison aux récepteurs [327].

Notre laboratoire est présentement engagée dans l'étude d'anticorps neutralisants provenant de sérum des patients infectés par le VIH à différents stades de leur maladie. Les enveloppes seront séquencées et le rôle de mutations comme I408T sera investigué.

VCH 286 est un nouvel antagoniste du récepteur CCR5 avec une puissante activité antivirale contre les souches VIH-1_{BAL} et VIH-1_{cc1/85} avec une IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire, supérieure à MVC et VVC et présentant des interactions médicamenteuses favorables avec la majorité des ARV tels que les inhibiteurs de transcriptase inverse, de protéase, d'intégrase, et de fusion employés en clinique pour traiter le HIV/SIDA. Les différences d'activité antivirale de VCH-286, MVC et VVC pourraient être dues à des différences d'affinité de ces molécules pour le CCR5. Il serait important de vérifier si VCH-286 se lie sur le même site ou des sites différents que les autres inhibiteurs de CCR5 avec des expériences de liaison au récepteur en présence de deux inhibiteurs et d'évaluer leur coopérativité de liaison. Il est primordial de caractériser les résidus de CCR5 nécessaires à la liaison de VCH-286 par des expériences

d'infection avec des mutants du CCR5 tel que réalisé pour les molécules maraviroc, vicriviroc, aplaviroc, TAK779 et TAK 720. Il serait aussi intéressant de vérifier la sélectivité de la liaison de VCH-286 envers le CCR5 et savoir si cette molécule est capable de se lier à d'autres corécepteurs tels que le cenicriviroc qui se lie aussi bien au CCR5 qu'au CCR2. Malgré que le développement de la molécule VCH- 286 a été abandonné, il est intéressant de l'étudier comme un modèle à cause de sa bonne performance comme inhibiteur de CCR5 pour des fins de comparaison avec des médicaments candidats en développement.

Les interactions de VCH-286 avec d'autres antagonistes de CCR5 tels que le maraviroc et vicriviroc, ont montré une grande variabilité allant de la synergie à l'antagonisme dépendamment des isolats cliniques utilisés. Les antagonismes trouvés lors des expériences de combinaison peuvent être expliqués par le fait que le MVC et le VVC interagissent avec les mêmes résidus au niveau de CCR5 ou par une modification de la conformation du corécepteur induite par le premier inhibiteur de CCR5, diminuant ainsi son affinité pour le deuxième inhibiteur ajouté dans la combinaison. Nos données indiquent que les combinaisons d'inhibiteurs du CCR5 doivent être considérées avec prudence, car les interactions sont variables et un antagonisme est observé avec certaines combinaisons en fonction de la souche virale utilisée.

Contributions

7. Contributions

1. Nous avons développé un outil phénotypique clonal sensible et reproductible pour déterminer le tropisme de VIH-1. Cet outil est utile non seulement pour évaluer le tropisme du VIH des spécimens cliniques ou de cultures cellulaires, mais aussi pour évaluer la résistance aux inhibiteurs de CCR5 et l'effet des mutations sur l'infectivité virale . Dans le cadre de développement de vaccins contre le VIH, cette technique pourrait être utilisée pour évaluer l'activité neutralisante des sérums de sujets vaccinés avec des candidats vaccins. Elle pourrait aussi être utile dans le développement des nouvelles molécules inhibitrices de CCR5.
2. Nous avons découvert une mutation à l'extérieur de la boucle V3, la mutation 408T qui a un impact sur la susceptibilité MVC.
3. Nous avons évalué les interactions médicamenteuses de VCH 286, un nouvel inhibiteur du récepteur CCR5 avec des molécules antiretrovirales représentatives de chaque classe médicamenteuse utilisée en clinique pour traiter l'infection par le VIH-1. Nous avons aussi étudié les interactions de VCH-286 avec deux inhibiteurs de CCR5, le maraviroc et le vicriviroc.

Bibliographies

8. Bibliographies.

1. Sharp, P.M. and B.H. Hahn, *Origins of HIV and the AIDS Pandemic*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a006841.
2. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
3. Gao, F., et al., *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 436-41.
4. Keele, B.F., et al., *Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1*. Science, 2006. **313**(5786): p. 523-6.
5. *Report from the 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Maraviroc in treatment-experienced and treatment-naive patients*. AIDS Clin Care, 2007. **19**(10): p. 83-4.
6. De Cock KM, et al., *Epidemiology and transmission of HIV-2: Why there is no HIV-2 pandemic?* . JAMA 1993. **270**(17): p. 2083-2086.
7. Sina, S., W. Ren, and C. Cheng-Mayer, *Coreceptor use in nonhuman primate models of HIV infection*. Journal of Translational Medicine, 2010. **9**(Suppl 1): p. S7.
8. Corbeau, P. and J. Reynes, *CCR5 antagonism in HIV infection: ways, effects, and side effects*. AIDS, 2009. **23**(15): p. 1931-43.
9. Zhao, Q., *Dual targeting of CCR2 and CCR5: therapeutic potential for immunologic and cardiovascular diseases*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(1): p. 41-55.
10. Scordi-Bello, I.A., et al., *Candidate sulfonated and sulfated topical microbicides: comparison of anti-human immunodeficiency virus activities and mechanisms of action*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(9): p. 3607-15.
11. Descamps, D., et al., *Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 group O isolates to antiretroviral agents: in vitro phenotypic and genotypic analyses*. J Virol, 1997. **71**(11): p. 8893-8.
12. UNAIDS, *Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic. November 2012*. 2012: p. 110.
13. Delobel, P., et al., *Population-based sequencing of the V3 region of env for predicting the coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(5): p. 1572-80.
14. Canada, P.H.A.o., *HIV and AIDS in Canada: Surveillance Report to December 31st, 2011*. Public Health Agency of Canada 2012.
15. Skrabal, K., et al., *Determining Human Immunodeficiency Virus Coreceptor Use in a Clinical Setting: Degree of Correlation between Two Phenotypic Assays and a Bioinformatic Model*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(2): p. 279-284.
16. Rerks-Ngarm, S., et al., *Defining the objectives of the AIDS vaccine for Asia network: report of the WHO-UNAIDS/Global HIV vaccine enterprise regional consultation on expanding AIDS vaccine research and development capacity in Asia*. Curr Opin HIV AIDS, 2010. **5**(5): p. 435-52.
17. Hirsch, V.M., et al., *An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2*. Nature, 1989. **339**(6223): p. 389-92.

18. Robertson, D.L., et al., *HIV-1 nomenclature proposal*. Science, 2000. **288**(5463): p. 55-6.
19. Tatt, I.D., et al., *The public health significance of HIV-1 subtypes*. AIDS, 2001. **15**: p. S59-S71.
20. Plantier, J.C., et al., *A new human immunodeficiency virus derived from gorillas*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 871-2.
21. Heslop, O.D., et al., *Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) subtypes in Jamaica*. West Indian Med J, 2005. **54**(5): p. 279-82.
22. Wainberg, M.A., G.J. Zaharatos, and B.G. Brenner, *Development of Antiretroviral Drug Resistance*. New England Journal of Medicine, 2011. **365**(7): p. 637-646.
23. Tebit, D.M. and E.J. Arts, *Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease*. Lancet Infect Dis, 2011. **11**(1): p. 45-56.
24. Hardy, W.D., et al., *Two-year safety and virologic efficacy of maraviroc in treatment-experienced patients with CCR5-tropic HIV-1 infection: 96-week combined analysis of MOTIVATE 1 and 2*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2010. **55**(5): p. 558-64.
25. Hemelaar, J., *The origin and diversity of the HIV-1 pandemic*. Trends in Molecular Medicine, 2012. **18**(3): p. 182-192.
26. Chiu, I.M., et al., *Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses*. Nature, 1985. **317**(6035): p. 366-8.
27. Wain-Hobson, S., M. Alizon, and L. Montagnier, *Relationship of AIDS to other retroviruses*. Nature, 1985. **313**(6005): p. 743.
28. Vogt, P.K., *Historical Introduction to the General Properties of Retroviruses*, in *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, Editors. 1997: Cold Spring Harbor (NY).
29. Briggs, J.A., et al., *Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores*. EMBO J, 2003. **22**(7): p. 1707-15.
30. Zhu, P., et al., *Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 15812-7.
31. Arthur, L.O., et al., *Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1935-8.
32. Maurais, E., R. Cantin, and M.J. Tremblay, *Human immunodeficiency virus type 1-anchored CD40 ligand induces secretion of the chemokine interleukin-8 by human primary macrophages*. Virology, 2009. **385**(1): p. 227-32.
33. Fortin, J.F., et al., *Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity*. J Virol, 1997. **71**(5): p. 3588-96.
34. Giguere, J.F., et al., *Insertion of host-derived costimulatory molecules CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) into human immunodeficiency virus type 1 affects the virus life cycle*. J Virol, 2004. **78**(12): p. 6222-32.
35. Esser, M.T., et al., *Differential incorporation of CD45, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and major histocompatibility complex class I and II molecules into human immunodeficiency virus type 1 virions and microvesicles: implications for viral pathogenesis and immune regulation*. J Virol, 2001. **75**(13): p. 6173-82.
36. Sierra, S., B. Kupfer, and R. Kaiser, *Basics of the virology of HIV-1 and its replication*. J Clin Virol, 2005. **34**(4): p. 233-44.
37. Freed, E.O., *HIV-1 Replication*. Somatic Cell and Molecular Genetics, 2001. **26**(1): p. 13-33.
38. Rohr, O., et al., *Regulation of HIV-1 gene transcription: from lymphocytes to microglial cells*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(5): p. 736-49.

39. Krebs FC, H.T., Quiterio S, Gartner S, Wigdahl BKuiken C, Foley B, Hahn B, Marx P, McCutchan F, et al. , *Lentiviral LTR-directed expression, sequence variation, and disease pathogenesis. HIV sequence compendium 2001. Los Alamos (New Mexico): Los Alamos National Laboratory. Theoretical Biology and Biophysics.*, 2001: p. 29–70.
40. Valdés, I., et al., *Immunogenicity and protection conferred by Mycobacterium habana in a murine model of pulmonary tuberculosis.* Tuberculosis (Edinb), 2014. **94**(1): p. 65-72.
41. Waki, K. and E.O. Freed, *Macrophages and Cell-Cell Spread of HIV-1.* Viruses, 2010. **2**(8): p. 1603-1620.
42. Larrouy.L, B.-V.F.e.D.D., *Mutations au niveau des sites de clivage de gag et du changement de cadre de lecture gag-pol du VIH-1 et réponse virologique à un traitement par inhibiteurs de protéase.* Virologie 2010. **14** ((2)): p. 119-28.
43. Pettit, S.C., et al., *Initial cleavage of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor by its activated protease occurs by an intramolecular mechanism.* J Virol, 2004. **78**(16): p. 8477-85.
44. Chen, S.S., *Functional role of the zipper motif region of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41.* J Virol, 1994. **68**(3): p. 2002-10.
45. Merk, A. and S. Subramaniam, *HIV-1 envelope glycoprotein structure.* Curr Opin Struct Biol, 2013. **23**(2): p. 268-76.
46. Earl, P.L., R.W. Doms, and B. Moss, *Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(2): p. 648-52.
47. Otteken, A., P.L. Earl, and B. Moss, *Folding, assembly, and intracellular trafficking of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein analyzed with monoclonal antibodies recognizing maturational intermediates.* J Virol, 1996. **70**(6): p. 3407-15.
48. Earl, P.L., B. Moss, and R.W. Doms, *Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein.* J Virol, 1991. **65**(4): p. 2047-55.
49. Kliger, Y., et al., *Membrane-induced conformational change during the activation of HIV-1 gp41.* J Mol Biol, 2000. **301**(4): p. 905-14.
50. Byland, R., et al., *A conserved dileucine motif mediates clathrin and AP-2-dependent endocytosis of the HIV-1 envelope protein.* Mol Biol Cell, 2007. **18**(2): p. 414-25.
51. Eckert, D.M. and P.S. Kim, *Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition.* Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 777-810.
52. Shang, L., L. Yue, and E. Hunter, *Role of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in cell-cell fusion and virus infection.* J Virol, 2008. **82**(11): p. 5417-28.
53. Lopez-Verges, S., et al., *Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(40): p. 14947-52.
54. Pognard, P., et al., *gp120: Biologic aspects of structural features.* Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 253-74.
55. Teixeira, C., et al., *Viral surface glycoproteins, gp120 and gp41, as potential drug targets against HIV-1: Brief overview one quarter of a century past the approval of zidovudine, the first anti-retroviral drug.* European Journal of Medicinal Chemistry, 2011. **46**(4): p. 979-992.

56. M, P., *Structure, fonction et antigénicité des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH1)* Virologie., 2005. **9** (6): p. 457-72.
57. Zolla-Pazner, S., *Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 199-210.
58. Kwong, P.D., et al., *Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody.* Nature, 1998. **393**(6686): p. 648-59.
59. Kwong, P.D., et al., *Structures of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory-adapted and primary isolates.* Structure, 2000. **8**(12): p. 1329-39.
60. Huang, C.C., et al., *Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core.* Science, 2005. **310**(5750): p. 1025-8.
61. Kwong, P.D., et al., *Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus.* J Virol, 2000. **74**(4): p. 1961-72.
62. Chen, B., et al., *Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core.* Nature, 2005. **433**(7028): p. 834-41.
63. Myszka, D.G., et al., *Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 9026-31.
64. Zhou, T., et al., *Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120.* Nature, 2007. **445**(7129): p. 732-7.
65. Rizzuto, C.D.W., R.Hernandez-Ramos, N.Sun, Y.Kwong, P. D.Hendrickson, W. A.Sodroski, J., *A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding.* Science, 1998. **280**(5371): p. 1949-53.
66. Wyatt, R., et al., *The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein.* Nature, 1998. **393**(6686): p. 705-11.
67. Helseth, E., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein.* J Virol, 1991. **65**(4): p. 2119-23.
68. Yang, X., et al., *Role of the gp120 inner domain beta-sandwich in the interaction between the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein subunits.* Virology, 2003. **313**(1): p. 117-25.
69. Pancera, M., et al., *Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(3): p. 1166-71.
70. Wyatt R, K.P., Hendrickson WA and Sodroski J, *Structure of the core of the HIV-1 gp120 exterior envelope glycoprotein.* <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/Compendium/1998/III/Sodroski.pdf>, 1998.
71. Guex, N.a.P., M. C. , *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling.* . Electrophoresis 1997. **18**: p. 2714-2723. .
72. Schwede T, K.J., Guex N, and Peitsch MC., *SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server.* . Nucleic Acids Research 2003. **31**(31): p. 3381-3385.
73. Arnold K., B.L., Kopp J., and Schwede T. 201., *The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling.* . Bioinformatics., 2006. **22**: p. 195-201.
74. DeLano, W.L. *The PyMOL molecular graphics system on The WorldWide Web* <http://www.pymol.org> 2002.; Available from: <http://www.pymol.org>.

75. Liu, J., et al., *Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers*. Nature, 2008. **455**(7209): p. 109-13.
76. Tran, E.E., et al., *Structural mechanism of trimeric HIV-1 envelope glycoprotein activation*. PLoS Pathog, 2012. **8**(7): p. e1002797.
77. Meyerson, J.R., et al., *Molecular structures of trimeric HIV-1 Env in complex with small antibody derivatives*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(2): p. 513-8.
78. Harris, A., et al., *Trimeric HIV-1 glycoprotein gp140 immunogens and native HIV-1 envelope glycoproteins display the same closed and open quaternary molecular architectures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(28): p. 11440-5.
79. Gaudin, Y., *Structure des glycoprotéines de fusion virale de classe II dans leur conformation fusogène*. Virologie., 2004. **8**(2).
80. Chan, D.C., et al., *Core Structure of gp41 from the HIV Envelope Glycoprotein*. Cell, 1997. **89**(2): p. 263-273.
81. Cullen, B.R., *Regulation of HIV-1 gene expression*. FASEB J, 1991. **5**(10): p. 2361-8.
82. Heera J, S.M., Ive P, et al. , *Virological correlates associated with treatment failure at week 48 in the phase 3 study of maraviroc in treatment-naïve patients*. . Fifteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; 3–6 February 2008; Boston, MA. Abstract 40LB., 2008.
83. Ren, X., J. Sodroski, and X. Yang, *An unrelated monoclonal antibody neutralizes human immunodeficiency virus type 1 by binding to an artificial epitope engineered in a functionally neutral region of the viral envelope glycoproteins*. J Virol, 2005. **79**(9): p. 5616-24.
84. Wei, X., et al., *Antibody neutralization and escape by HIV-1*. Nature, 2003. **422**(6929): p. 307-12.
85. Montero, M., et al., *The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design*. Microbiol Mol Biol Rev, 2008. **72**(1): p. 54-84, table of contents.
86. Liu, J., et al., *Structure of the HIV-1 gp41 Membrane-Proximal Ectodomain Region in a Putative Prefusion Conformation*. Biochemistry, 2009. **48**(13): p. 2915-2923.
87. Rawat, S.S., et al., *Sphingolipids, cholesterol, and HIV-1: a paradigm in viral fusion*. Glycoconj J, 2006. **23**(3-4): p. 189-97.
88. Freed, E.O. and M.A. Martin, *Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix*. J Virol, 1995. **69**(3): p. 1984-9.
89. Yuan, T., J. Li, and M.Y. Zhang, *HIV-1 envelope glycoprotein variable loops are indispensable for envelope structural integrity and virus entry*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e69789.
90. Belair, M., et al., *The polymorphic nature of HIV type 1 env V4 affects the patterns of potential N-glycosylation sites in proviral DNA at the intrahost level*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2009. **25**(2): p. 199-206.
91. Bobardt, M.D., et al., *Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes*. Immunity, 2003. **18**(1): p. 27-39.
92. Larkin, M., et al., *Oligosaccharide-mediated interactions of the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 that are independent of CD4 recognition*. AIDS, 1989. **3**(12): p. 793-8.
93. Curtis, B.M., S. Scharnowske, and A.J. Watson, *Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(17): p. 8356-60.

94. Fantini, J., et al., *GalCer, CD26 and HIV infection of intestinal epithelial cells*. AIDS, 1994. **8**(9): p. 1347-8.
95. Tardif, M.R. and M.J. Tremblay, *LFA-1 is a key determinant for preferential infection of memory CD4+ T cells by human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 2005. **79**(21): p. 13714-24.
96. Montefiori, D.C., *Role of complement and Fc receptors in the pathogenesis of HIV-1 infection*. Springer Semin Immunopathol, 1997. **18**(3): p. 371-90.
97. Stoiber, H., A. Clivio, and M.P. Dierich, *Role of complement in HIV infection*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 649-74.
98. Gorry, P.R. and P. Ancuta, *Coreceptors and HIV-1 pathogenesis*. Curr HIV/AIDS Rep, 2011. **8**(1): p. 45-53.
99. Kuritzkes, D.R., *HIV-1 entry inhibitors: an overview*. Curr Opin HIV AIDS, 2009. **4**(2): p. 82-7.
100. Harrison, S.C., et al., *Structure and interactions of CD4*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1992. **57**: p. 541-8.
101. Wu, H., P.D. Kwong, and W.A. Hendrickson, *Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4*. Nature, 1997. **387**(6632): p. 527-530.
102. Wyatt, R. and J. Sodroski, *The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens*. Science, 1998. **280**(5371): p. 1884-8.
103. Wilen, C.B., J.C. Tilton, and R.W. Doms, *Molecular mechanisms of HIV entry*. Adv Exp Med Biol, 2012. **726**: p. 223-42.
104. Huang, C.C., et al., *Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4*. Science, 2007. **317**(5846): p. 1930-4.
105. Permanyer, M., E. Ballana, and J.A. Este, *Endocytosis of HIV: anything goes*. Trends Microbiol, 2010. **18**(12): p. 543-51.
106. Ayoub, A., et al., *Distinct efficacy of HIV-1 entry inhibitors to prevent cell-to-cell transfer of R5 and X4 viruses across a human placental trophoblast barrier in a reconstitution model in vitro*. Retrovirology, 2008. **5**: p. 31.
107. Mayor, S. and R.E. Pagano, *Pathways of clathrin-independent endocytosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(8): p. 603-12.
108. Miller, C.J. and R.J. Shattock, *Target cells in vaginal HIV transmission*. Microbes Infect, 2003. **5**(1): p. 59-67.
109. Corbeau, P. and J. Reynes, *CCR5 antagonism in HIV infection: ways, effects, and side effects*. AIDS, 2009. **23**(15): p. 1931-1943 10.1097/QAD.0b013e32832e71cd.
110. Le Roy, C. and J.L. Wrana, *Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(2): p. 112-126.
111. Polo, S. and P.P. Di Fiore, *Endocytosis conducts the cell signaling orchestra*. Cell, 2006. **124**(5): p. 897-900.
112. Zhu, X.-D., et al., *Caveolae-dependent Endocytosis Is Required for Class A Macrophage Scavenger Receptor-mediated Apoptosis in Macrophages*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(10): p. 8231-8239.
113. Vidricaire, G., M. Imbeault, and M.J. Tremblay, *Endocytic host cell machinery plays a dominant role in intracellular trafficking of incoming human immunodeficiency virus type 1 in human placental trophoblasts*. J Virol, 2004. **78**(21): p. 11904-15.
114. Verma, S.P., *HIV: a raft-targeting approach for prevention and therapy using plant-derived compounds (review)*. Curr Drug Targets, 2009. **10**(1): p. 51-9.

115. Le Lay, S., et al., *Filling up adipocytes with lipids. Lessons from caveolin-1 deficiency*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 514-8.
116. Marechal, V., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis*. J Virol, 2001. **75**(22): p. 11166-77.
117. Pauza, C.D. and T.M. Price, *Human immunodeficiency virus infection of T cells and monocytes proceeds via receptor-mediated endocytosis*. J Cell Biol, 1988. **107**(3): p. 959-68.
118. Engering, A., et al., *The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells*. J Immunol, 2002. **168**(5): p. 2118-26.
119. Fittipaldi, A., et al., *Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 34141-9.
120. Aiken, C., et al., *Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain*. Cell, 1994. **76**(5): p. 853-64.
121. Kim, P.W., et al., *A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8*. Science, 2003. **301**(5640): p. 1725-8.
122. Pelchen-Matthews, A., et al., *The protein tyrosine kinase p56lck inhibits CD4 endocytosis by preventing entry of CD4 into coated pits*. J Cell Biol, 1992. **117**(2): p. 279-90.
123. Fredericksen, B.L., et al., *Inhibition of endosomal/lysosomal degradation increases the infectivity of human immunodeficiency virus*. J Virol, 2002. **76**(22): p. 11440-6.
124. Mothes, W., et al., *Virus cell-to-cell transmission*. J Virol, 2010. **84**(17): p. 8360-8.
125. Alarcon, B., D. Mestre, and N. Martinez-Martin, *The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering?* Immunology, 2011. **133**(4): p. 420-5.
126. Antón, O.M., et al., *MAL Protein Controls Protein Sorting at the Supramolecular Activation Cluster of Human T Lymphocytes*. The Journal of Immunology, 2011. **186**(11): p. 6345-6356.
127. Contento, R.L., et al., *CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(29): p. 10101-6.
128. Martin, N. and Q. Sattentau, *Cell-to-cell HIV-1 spread and its implications for immune evasion*. Curr Opin HIV AIDS, 2009. **4**(2): p. 143-9.
129. Sattentau, Q., *Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses*. Nat Rev Micro, 2008. **6**(11): p. 815-826.
130. Sherer, N.M., et al., *Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(3): p. 310-315.
131. Mattila, P.K. and P. Lappalainen, *Filopodia: molecular architecture and cellular functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(6): p. 446-54.
132. Jolly, C., *Cell-to-cell transmission of retroviruses: Innate immunity and interferon-induced restriction factors*. Virology, 2011. **411**(2): p. 251-9.
133. Reynard, F.B., F. Verrier, B., *Les N-glycanes de l'enveloppe du VIH1 et leurs interactions avec le système immunitaire*. Virologie 2006. **10** p. 129-41.
134. Permanyer, M., E. Ballana, and J.A. Esté, *Endocytosis of HIV: anything goes*. Trends in Microbiology, 2010. **18**(12): p. 543-551.
135. Barin, F., *Virus de l'immunodéficience humaine et anticorps neutralisants*. Virologie. , 2002. **Volume 6**(Numéro 4): p. 249-57.
136. Bomsel, M. and V. David, *Mucosal gatekeepers: Selecting HIV viruses for early infection*. Nat Med, 2002. **8**(2): p. 114-116.

137. Belyakov, I.M. and J.A. Berzofsky, *Immunobiology of Mucosal HIV Infection and the Basis for Development of a New Generation of Mucosal AIDS Vaccines*. *Immunity*, 2004. **20**(3): p. 247-253.
138. Bomsel, M., et al., *Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM*. *Immunity*, 1998. **9**(2): p. 277-87.
139. Bomsel, M., *Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier*. *Nat Med*, 1997. **3**(1): p. 42-7.
140. Hocini, H. and M. Bomsel, *Infectious human immunodeficiency virus can rapidly penetrate a tight human epithelial barrier by transcytosis in a process impaired by mucosal immunoglobulins*. *J Infect Dis*, 1999. **179 Suppl 3**: p. S448-53.
141. Bomsel, M.A., Annette, *Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(1): p. 57-68.
142. Ransohoff, R.M., *Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology*. *Immunity*, 2009. **31**(5): p. 711-21.
143. Oppermann, M., *Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation*. *Cell Signal*, 2004. **16**(11): p. 1201-10.
144. Mirabelli-Badenier, M., et al., *CC and CXC chemokines are pivotal mediators of cerebral injury in ischaemic stroke*. *Thromb Haemost*, 2011. **105**(3): p. 409-20.
145. Zlotnik, A., A.M. Burkhardt, and B. Homey, *Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(9): p. 597-606.
146. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. *Immunity*, 2000. **12**(2): p. 121-7.
147. Banisadr, G., et al., *Chemokines and brain functions*. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005. **4**(3): p. 387-99.
148. Nomenclature, I.W.S.o.C., *Chemokine/chemokine receptor nomenclature*. *Cytokine*, 2003. **21**(1): p. 48-9.
149. Peatman, E., et al., *In silico identification and expression analysis of 12 novel CC chemokines in catfish*. *Immunogenetics*, 2005. **57**(6): p. 409-19.
150. Allen, S.J., S.E. Crown, and T.M. Handel, *Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 787-820.
151. Colobran, R., et al., *The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity*. *Clin Exp Immunol*, 2007. **148**(2): p. 208-17.
152. Bennett, L.D., J.M. Fox, and N. Signoret, *Mechanisms regulating chemokine receptor activity*. *Immunology*, 2011. **134**(3): p. 246-56.
153. International Union of Immunological Societies/World Health Organization Subcommittee on chemokine, n., *Chemokine/chemokine receptor nomenclature*. *J Leukoc Biol*, 2001. **70**(3): p. 465-6.
154. Borroni, E.M., et al., *Chemokine receptors intracellular trafficking*. *Pharmacol Ther*, 2010. **127**(1): p. 1-8.
155. Cartier, L., et al., *Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases*. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005. **48**(1): p. 16-42.
156. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. *Science*, 1996. **272**(5263): p. 872-7.

157. Schols, D., et al., *T-cell-line-tropic human immunodeficiency virus type 1 that is made resistant to stromal cell-derived factor 1alpha contains mutations in the envelope gp120 but does not show a switch in coreceptor use*. J Virol, 1998. **72**(5): p. 4032-7.
158. Hori, T., et al., *Detection and delineation of CXCR-4 (fusin) as an entry and fusion cofactor for T-tropic [correction of T cell-tropic] HIV-1 by three different monoclonal antibodies*. J Immunol, 1998. **160**(1): p. 180-8.
159. Crane, I.J., et al., *CXCR4 receptor expression on human retinal pigment epithelial cells from the blood-retina barrier leads to chemokine secretion and migration in response to stromal cell-derived factor 1 alpha*. J Immunol, 2000. **165**(8): p. 4372-8.
160. Berger, O., et al., *CXC and CC chemokine receptors on coronary and brain endothelia*. Mol Med, 1999. **5**(12): p. 795-805.
161. Deng, H., et al., *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1*. Nature, 1996. **381**(6584): p. 661-6.
162. Dragic, T., et al., *HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5*. Nature, 1996. **381**(6584): p. 667-73.
163. Samson, M., et al., *Molecular Cloning and Functional Expression of a New Human CC-Chemokine Receptor Gene*. Biochemistry, 1996. **35**(11): p. 3362-3367.
164. Ostrowski, M.A., et al., *Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-infected and uninfected individuals*. J Immunol, 1998. **161**(6): p. 3195-201.
165. Raport, C.J., et al., *Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha*. J Biol Chem, 1996. **271**(29): p. 17161-6.
166. Wu, K., et al., *Construction, purification, and immunogenicity of recombinant cystein-cystein type chemokine receptor 5 vaccine*. Protein Expr Purif, 2006. **49**(1): p. 108-13.
167. Paterlini, M.G., *Structure modeling of the chemokine receptor CCR5: implications for ligand binding and selectivity*. Biophys J, 2002. **83**(6): p. 3012-31.
168. Bannert, N., et al., *Sialylated O-glycans and sulfated tyrosines in the NH2-terminal domain of CC chemokine receptor 5 contribute to high affinity binding of chemokines*. J Exp Med, 2001. **194**(11): p. 1661-73.
169. Garcia-Perez, J., et al., *New insights into the mechanisms whereby low molecular weight CCR5 ligands inhibit HIV-1 infection*. Journal of Biological Chemistry, 2010.
170. Garcia-Perez, J., et al., *Allosteric Model of Maraviroc Binding to CC Chemokine Receptor 5 (CCR5)*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(38): p. 33409-33421.
171. Alkhatib, G., *The biology of CCR5 and CXCR4*. Curr Opin HIV AIDS, 2009. **4**(2): p. 96-103.
172. Blanpain, C., et al., *CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1899-905.
173. Wang, C.R., H.R. Guo, and M.F. Liu, *RANTES promoter polymorphism as a genetic risk factor for rheumatoid arthritis in the Chinese*. Clin Exp Rheumatol, 2005. **23**(3): p. 379-84.
174. Martinson, J.J., et al., *Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion*. Nat Genet, 1997. **16**(1): p. 100-3.
175. Huang, Y., et al., *The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression*. Nat Med, 1996. **2**(11): p. 1240-3.
176. Dean, M., et al., *Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter*

- AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study.* Science, 1996. **273**(5283): p. 1856-62.
177. Mulherin, S.A., et al., *Effects of CCR5-Delta32 and CCR2-64I alleles on HIV-1 disease progression: the protection varies with duration of infection.* AIDS, 2003. **17**(3): p. 377-87.
 178. Arenzana-Seisdedos, F. and M. Parmentier, *Genetics of resistance to HIV infection: Role of co-receptors and co-receptor ligands.* Semin Immunol, 2006. **18**(6): p. 387-403.
 179. Hutter, G., et al., *Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation.* N Engl J Med, 2009. **360**(7): p. 692-8.
 180. Hutter, G. and S. Ganepola, *Eradication of HIV by transplantation of CCR5-deficient hematopoietic stem cells.* ScientificWorldJournal, 2011. **11**: p. 1068-76.
 181. Cannon, P. and C. June, *Chemokine receptor 5 knockout strategies.* Curr Opin HIV AIDS, 2011. **6**(1): p. 74-9.
 182. Scerra S, M.G.e.L.J.-D., *Thérapie génique conduisant à l'inactivation de CCR5 — Vers l'éradication du VIH?* Journal des Anti-infectieux 2011. **13**: p. 184—190.
 183. Raymond, S., et al., *Development and performance of a new recombinant virus phenotypic entry assay to determine HIV-1 coreceptor usage.* Journal of Clinical Virology, 2010. **47**(2): p. 126-130.
 184. Recordon-Pinson, P., et al., *Evaluation of the genotypic prediction of HIV-1 coreceptor use versus a phenotypic assay and correlation with the virological response to maraviroc: the ANRS GenoTropism study.* Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(8): p. 3335-40.
 185. Calado, M., et al., *Coreceptor usage by HIV-1 and HIV-2 primary isolates: the relevance of CCR8 chemokine receptor as an alternative coreceptor.* Virology, 2010. **408**(2): p. 174-82.
 186. Tripathi, V., et al., *Differential expression of RDC1/CXCR7 in the human placenta.* J Clin Immunol, 2009. **29**(3): p. 379-86.
 187. Pollakis, G. and W.A. Paxton, *Use of (alternative) coreceptors for HIV entry.* Curr Opin HIV AIDS, 2012. **7**(5): p. 440-9.
 188. Lama, J. and V. Planelles, *Host factors influencing susceptibility to HIV infection and AIDS progression.* Retrovirology, 2007. **4**: p. 52.
 189. Berger, E.A., et al., *A new classification for HIV-1.* Nature, 1998. **391**(6664): p. 240.
 190. Schuitemaker, H., et al., *Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population.* J Virol, 1992. **66**(3): p. 1354-60.
 191. Fenyo, E.M., et al., *Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates.* J Virol, 1988. **62**(11): p. 4414-9.
 192. Kuhmann, S.E. and O. Hartley, *Targeting chemokine receptors in HIV: a status report.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2008. **48**: p. 425-61.
 193. Whitcomb, J.M., et al., *Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism.* Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(2): p. 566-75.
 194. Spudich, S.S., et al., *HIV-1 chemokine coreceptor utilization in paired cerebrospinal fluid and plasma samples: a survey of subjects with viremia.* J Infect Dis, 2005. **191**(6): p. 890-8.
 195. Fais, S., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 strains R5 and X4 induce different pathogenic effects in hu-PBL-SCID mice, depending on the state of activation/differentiation of human target cells at the time of primary infection.* J Virol, 1999. **73**(8): p. 6453-9.

196. Grivel, J.C., R.J. Shattock, and L.B. Margolis, *Selective transmission of R5 HIV-1 variants: where is the gatekeeper?* J Transl Med, 2011. **9 Suppl 1**: p. S6.
197. Hoffmann, C., *The epidemiology of HIV coreceptor tropism*. Eur J Med Res, 2007. **12**(9): p. 385-90.
198. Bomsel, M., *Premières étapes de la transmission du VIH à travers les muqueuses* Virologie, 2002. Volume 6, Numéro 5, , Septembre - Octobre 2002(363-78).
199. Patterson, B.K., et al., *Repertoire of chemokine receptor expression in the female genital tract: implications for human immunodeficiency virus transmission*. Am J Pathol, 1998. **153**(2): p. 481-90.
200. Lee, B., et al., *Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 5215-20.
201. Zaitseva, M., et al., *Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection*. Nat Med, 1997. **3**(12): p. 1369-75.
202. Bomsel, M. and V. David, *Mucosal gatekeepers: selecting HIV viruses for early infection*. Nat Med, 2002. **8**(2): p. 114-6.
203. Raymond, S., *Caractérisation du tropisme du VIH-1: Implications physiopathologiques et thérapeutiques 2010*.
204. Rose, J.D., et al., *Current tests to evaluate HIV-1 coreceptor tropism*. Curr Opin HIV AIDS, 2009. **4**(2): p. 136-42.
205. Poveda, E. and V. Soriano, *Resistance to entry inhibitors*, in *Antiretroviral Resistance in Clinical Practice*, A.M. Geretti, Editor. 2006: London.
206. Asin-Milan, O., et al., *Mutations in variable domains of the HIV-1 envelope gene can have a significant impact on maraviroc and vicriviroc resistance*. AIDS Res Ther, 2013. **10**(1): p. 15.
207. Tsibris, A.M., et al., *Quantitative deep sequencing reveals dynamic HIV-1 escape and large population shifts during CCR5 antagonist therapy in vivo*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5683.
208. Tilton, J.C., et al., *A Maraviroc-Resistant HIV-1 with Narrow Cross-Resistance to Other CCR5 Antagonists Depends on both N-Terminal and Extracellular Loop Domains of Drug-Bound CCR5*. J Virol, 2010. **84**(20): p. 10863-10876.
209. Sanchez, V., et al., *Performance of genotypic algorithms for predicting HIV-1 tropism measured against the enhanced-sensitivity Trofile coreceptor tropism assay*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(11): p. 4135-9.
210. Stahl-Hennig, C., et al., *The simian immunodeficiency virus deltaNef vaccine, after application to the tonsils of Rhesus macaques, replicates primarily within CD4(+) T cells and elicits a local perforin-positive CD8(+) T-cell response*. J Virol, 2002. **76**(2): p. 688-96.
211. Reeves, J.D., et al., *An enhanced sensitivity Trofile HIV coreceptor tropism assay for selecting patients for therapy with entry inhibitors targeting CCR5: a review of analytical and clinical studies*. . J Viral Entry 2009, 2009. **3**.
212. Landovitz, R.J., et al., *Phase II study of vicriviroc versus efavirenz (both with zidovudine/lamivudine) in treatment-naïve subjects with HIV-1 infection*. J Infect Dis, 2008. **198**(8): p. 1113-22.
213. Kitrinou, K.M., et al., *Virologic failure in therapy-naïve subjects on aplaviroc plus lopinavir-ritonavir: detection of aplaviroc resistance requires clonal analysis of envelope*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(3): p. 1124-31.

214. Gonzalez, N., et al., *A sensitive phenotypic assay for the determination of human immunodeficiency virus type 1 tropism*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(12): p. 2493-501.
215. Trouplin, V., et al., *Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using a recombinant phenotypic assay*. J Virol, 2001. **75**(1): p. 251-9.
216. Hamy F, V.V., Hubert S, Klimkait T *Hybridization-based assay and replicative phenotyping as diagnostic platform for determination of coreceptor tropism*. . 5th European HIV drug resistance workshop:, 2007. **Abstract 60**.
217. Van Baelen, K., et al., *HIV-1 coreceptor usage determination in clinical isolates using clonal and population-based genotypic and phenotypic assays*. J Virol Methods, 2007. **146**(1-2): p. 61-73.
218. Lin, N.H., et al., *The design and validation of a novel phenotypic assay to determine HIV-1 coreceptor usage of clinical isolates*. J Virol Methods, 2010. **169**(1): p. 39-46.
219. Paar, C., et al., *Genotypic prediction of human immunodeficiency virus type 1 tropism by use of plasma and peripheral blood mononuclear cells in the routine clinical laboratory*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(7): p. 2697-9.
220. Jensen, M.A.v.t.W., A. B., *Predicting HIV-1 coreceptor usage with sequence analysis*. AIDS Rev, 2003. **5**(2): p. 104-12.
221. Isaka, Y., et al., *Small amino acid changes in the V3 loop of human immunodeficiency virus type 2 determines the coreceptor usage for CXCR4 and CCR5*. Virology, 1999. **264**(1): p. 237-43.
222. Lenz, J.C. and J.K. Rockstroh, *S/GSK1349572, a new integrase inhibitor for the treatment of HIV: promises and challenges*. Expert Opin Investig Drugs, 2011. **20**(4): p. 537-48.
223. Cardozo, T., et al., *Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2007. **23**(3): p. 415-26.
224. Pramanik, L., et al., *Charged amino acid patterns of coreceptor use in the major subtypes of human immunodeficiency virus type 1*. J Gen Virol, 2011. **92**(Pt 8): p. 1917-22.
225. Naganawa, S., et al., *Net positive charge of HIV-1 CRF01_AE V3 sequence regulates viral sensitivity to humoral immunity*. PLoS One, 2008. **3**(9): p. e3206.
226. Pillai, S., et al., *A new perspective on V3 phenotype prediction*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2003. **19**(2): p. 145-9.
227. Jensen, M.A.L., F. S.van 't Wout, A. B. Nickle, D. C.Shriner, D.He, H. X.McLaughlin, S.Shankarappa, R.Margolick, J. B.Mullins, J. L., *Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences*. J Virol, 2003. **77**(24): p. 13376-88.
228. Jensen, M.A., et al., *A Reliable Phenotype Predictor for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Based on Envelope V3 Sequences*. J Virol, 2006. **80**(10): p. 4698-4704.
229. Brumme, Z.L., et al., *Clinical and immunological impact of HIV envelope V3 sequence variation after starting initial triple antiretroviral therapy*. AIDS, 2004. **18**(4): p. F1-F9.
230. Sing, T., et al., *Predicting HIV coreceptor usage on the basis of genetic and clinical covariates*. Antivir Ther, 2007. **12**(7): p. 1097-106.
231. Lengauer, T., et al., *Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage*. Nat Biotech, 2007. **25**(12): p. 1407-1410.
232. Voelkerding, K.V., S.A. Dames, and J.D. Durtschi, *Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 641-58.

233. Rothberg, J.M. and J.H. Leamon, *The development and impact of 454 sequencing*. Nat Biotech, 2008. **26**(10): p. 1117-1124.
234. Chou, T.C. and P. Talalay, *Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors*. Adv Enzyme Regul, 1984. **22**: p. 27-55.
235. Carpenter, C.C., et al., *Antiretroviral therapy for HIV infection in 1996. Recommendations of an international panel*. International AIDS Society-USA. JAMA, 1996. **276**(2): p. 146-54.
236. Fang, C.T., et al., *Life expectancy of patients with newly-diagnosed HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy*. QJM, 2007. **100**(2): p. 97-105.
237. Wang, X., et al., *Highly active antiretroviral therapy drugs inhibit in vitro cholesterol efflux from human macrophage-derived foam cells*. Lab Invest, 2009. **89**(12): p. 1355-63.
238. Briz, V., E. Poveda, and V. Soriano, *HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways*. J Antimicrob Chemother, 2006. **57**(4): p. 619-27.
239. Bruno, C.J. and J.M. Jacobson, *Ibalizumab: an anti-CD4 monoclonal antibody for the treatment of HIV-1 infection*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(9): p. 1839-41.
240. Bell, T.W., et al., *Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies of CD4 Down-Modulating Cyclotriazadisulfonamide (CADA) Analogues*. J Med Chem, 2006. **49**(4): p. 1291-1312.
241. Vermeire, K., et al., *Human Immunodeficiency Virus Type 1 Escape from Cyclotriazadisulfonamide-Induced CD4-Targeted Entry Inhibition Is Associated with Increased Neutralizing Antibody Susceptibility*. J Virol, 2009. **83**(18): p. 9577-9583.
242. Vermeire, K., et al., *CADA, a potential anti-HIV microbicide that specifically targets the cellular CD4 receptor*. Curr HIV Res, 2008. **6**(3): p. 246-56.
243. Morse, C. and F. Maldarelli, *Enfuvirtide antiviral activity despite rebound viremia and resistance mutations: fitness tampering or a case of persistent braking on entering?* J Infect Dis, 2007. **195**(3): p. 318-21.
244. Joly, V., et al., *Enfuvirtide: from basic investigations to current clinical use*. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2010. **11**(16): p. 2701-2713.
245. Tilton, J.C. and R.W. Doms, *Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection*. Antiviral Res, 2010. **85**(1): p. 91-100.
246. Tsibris, A.M. and D.R. Kuritzkes, *Chemokine antagonists as therapeutics: focus on HIV-1*. Annu Rev Med, 2007. **58**: p. 445-59.
247. Khatib, N. and S. Das, *PRO 140--a novel CCR5 co-receptor inhibitor*. Recent Pat Antiinfect Drug Discov, 2010. **5**(1): p. 18-22.
248. *Phase 2 clinical trials started on PRO 140*. AIDS Patient Care STDS, 2008. **22**(2): p. 159-60.
249. Wilken, J., et al., *Total chemical synthesis and high-resolution crystal structure of the potent anti-HIV protein AOP-RANTES*. Chem Biol, 1999. **6**(1): p. 43-51.
250. Veiga, A.S., N.C. Santos, and M.A. Castanho, *An insight on the leading HIV entry inhibitors*. Recent Pat Antiinfect Drug Discov, 2006. **1**(1): p. 67-73.
251. Kondru, R., et al., *Molecular interactions of CCR5 with major classes of small-molecule anti-HIV CCR5 antagonists*. Mol Pharmacol, 2008. **73**(3): p. 789-800.
252. Baba, M., et al., *A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(10): p. 5698-703.
253. Imamura, S., et al., *Discovery of a piperidine-4-carboxamide CCR5 antagonist (TAK-220) with highly potent Anti-HIV-1 activity*. J Med Chem, 2006. **49**(9): p. 2784-93.

254. Seto, M., et al., *Highly potent and orally active CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents: synthesis and biological activities of 1-benzazocine derivatives containing a sulfoxide moiety*. J Med Chem, 2006. **49**(6): p. 2037-48.
255. Klibanov, O.M., S.H. Williams, and C.A. Iler, *Cenicriviroc, an orally active CCR5 antagonist for the potential treatment of HIV infection*. Curr Opin Investig Drugs, 2010. **11**(8): p. 940-50.
256. Gathe, J.C., J DeJesus, E et al., *Week-24 Primary Analysis of Cenicriviroc vs Efavirenz, in Combination with Emtricitabine/Tenofovir, in Treatment-naïve HIV-1+ Adults with CCR5-tropic Virus* 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013). Atlanta, March 3-6, 2013., 2013. **Abstract 106LB**.
257. Tagat, J.R., et al., *Piperazine-based CCR5 antagonists as HIV-1 inhibitors. IV. Discovery of 1-[(4,6-dimethyl-5-pyrimidinyl)carbonyl]-4-[4-[2-methoxy-1(R)-4-(trifluoromethyl)phenyl]ethyl-3(S)-methyl-1-piperazinyl]-4-methylpiperidine (Sch-417690/Sch-D), a potent, highly selective, and orally bioavailable CCR5 antagonist*. J Med Chem, 2004. **47**(10): p. 2405-8.
258. Tagat, J.R., et al., *Piperazine-Based CCR5 Antagonists as HIV-1 Inhibitors. IV. Discovery of 1-[(4,6-Dimethyl-5-pyrimidinyl)carbonyl]-4-[4-{2-methoxy-1(R)-4-(trifluoromethyl)phenyl}ethyl-3(S)-methyl-1-piperazinyl]-4-methylpiperidine (Sch-417690/Sch-D), a Potent, Highly Selective, and Orally Bioavailable CCR5 Antagonist*. J Med Chem, 2004. **47**(10): p. 2405-2408.
259. Strizki, J.M., et al., *Discovery and characterization of vicriviroc (SCH 417690), a CCR5 antagonist with potent activity against human immunodeficiency virus type 1*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(12): p. 4911-9.
260. Perry, C.M., *Maraviroc: a review of its use in the management of CCR5-tropic HIV-1 infection*. Drugs, 2010. **70**(9): p. 1189-213.
261. Westby, M., et al., *Reduced maximal inhibition in phenotypic susceptibility assays indicates that viral strains resistant to the CCR5 antagonist maraviroc utilize inhibitor-bound receptor for entry*. J Virol, 2007. **81**(5): p. 2359-71.
262. Este, J.A. and A. Telenti, *HIV entry inhibitors*. Lancet, 2007. **370**(9581): p. 81-8.
263. Cooper, D.A., et al., *Maraviroc versus efavirenz, both in combination with zidovudine-lamivudine, for the treatment of antiretroviral-naïve subjects with CCR5-tropic HIV-1 infection*. J Infect Dis, 2010. **201**(6): p. 803-13.
264. Roche, M., et al., *A common mechanism of clinical HIV-1 resistance to the CCR5 antagonist maraviroc despite divergent resistance levels and lack of common gp120 resistance mutations*. Retrovirology, 2013. **10**: p. 43.
265. Cao, Y.J., et al., *Effect of low-dose ritonavir on the pharmacokinetics of the CXCR4 antagonist AMD070 in healthy volunteers*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(5): p. 1630-4.
266. Nyunt, M.M., et al., *Pharmacokinetic effect of AMD070, an Oral CXCR4 antagonist, on CYP3A4 and CYP2D6 substrates midazolam and dextromethorphan in healthy volunteers*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2008. **47**(5): p. 559-65.
267. Stone, N.D., et al., *Multiple-dose escalation study of the safety, pharmacokinetics, and biologic activity of oral AMD070, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in human subjects*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(7): p. 2351-8.
268. Murakami, T., et al., *The novel CXCR4 antagonist KRH-3955 is an orally bioavailable and extremely potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection: comparative studies with AMD3100*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(7): p. 2940-8.

269. Tilton, J.C., et al., *A maraviroc-resistant HIV-1 with narrow cross-resistance to other CCR5 antagonists depends on both N-terminal and extracellular loop domains of drug-bound CCR5*. J Virol, 2010. **84**(20): p. 10863-76.
270. Skerlj, R., et al., *Design of novel CXCR4 antagonists that are potent inhibitors of T-tropic (X4) HIV-1 replication*. Bioorg Med Chem Lett, 2011. **21**(5): p. 1414-8.
271. Stephenson, K.E. and D.H. Barouch, *A global approach to HIV-1 vaccine development*. Immunol Rev, 2013. **254**(1): p. 295-304.
272. Singh, M., K.T. Jeang, and S.M. Smith, *HIV vaccine development*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 2064-81.
273. Singh, M., *No vaccine against HIV yet-are we not perfectly equipped?* Virology Journal 2006. **3**(60).
274. Gilbert, P.B., et al., *Statistical interpretation of the RV144 HIV vaccine efficacy trial in Thailand: a case study for statistical issues in efficacy trials*. J Infect Dis, 2011. **203**(7): p. 969-75.
275. Pugach, P., et al., *HIV-1 clones resistant to a small molecule CCR5 inhibitor use the inhibitor-bound form of CCR5 for entry*. Virology, 2007. **361**(1): p. 212-28.
276. Pfeifer, N., H. Walter, and T. Lengauer, *Association between HIV-1 coreceptor usage and resistance to broadly neutralizing antibodies*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2014. **67**(2): p. 107-12.
277. Knapp, D.J., et al., *Factors influencing the sensitivity and specificity of conventional sequencing in human immunodeficiency virus type 1 tropism testing*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(2): p. 444-51.
278. Falkowska, E., et al., *PG V04, an HIV-1 gp120 CD4 binding site antibody, is broad and potent in neutralization but does not induce conformational changes characteristic of CD4*. J Virol, 2012.
279. Diskin, R., et al., *Increasing the Potency and Breadth of an HIV Antibody by Using Structure-Based Rational Design*. Science, 2011. **334**(6060): p. 1289-1293.
280. Tang, M.W. and R.W. Shafer, *HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications*. Drugs, 2012. **72**(9): p. e1-25.
281. Li, Y., et al., *Mechanism of neutralization by the broadly neutralizing HIV-1 monoclonal antibody VRC01*. J Virol, 2011. **85**(17): p. 8954-67.
282. Parker, C.E., et al., *Fine Definition of the Epitope on the gp41 Glycoprotein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 for the Neutralizing Monoclonal Antibody 2F5*. J Virol, 2001. **75**(22): p. 10906-10911.
283. Zwick, M.B., et al., *Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Antibodies 2F5 and 4E10 Require Surprisingly Few Crucial Residues in the Membrane-Proximal External Region of Glycoprotein gp41 To Neutralize HIV-1*. J Virol, 2005. **79**(2): p. 1252-1261.
284. Zwick, M.B., et al., *Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41*. J Virol, 2001. **75**(22): p. 10892-905.
285. *US Department of Health and Human Services. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents*. 2012
286. Hirsch, M.S., et al., *Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel*. Clin Infect Dis, 2008. **47**(2): p. 266-85.
287. Vandamme, A.M., et al., *European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing: 2011 update*. AIDS Rev, 2011. **13**(2): p. 77-108.

288. Schutten, M., *Resistance assays*, in *Antiretroviral Resistance in Clinical Practice*, A.M. Geretti, Editor. 2006: London.
289. Nutan and S.K. Gupta, *Microbicides: a new hope for HIV prevention*. Indian J Med Res, 2011. **134**(6): p. 939-49.
290. Puthcharoen, O., et al., *HIV-1 clinical isolates resistant to CCR5 antagonists exhibit delayed entry kinetics that are corrected in the presence of drug*. J Virol, 2012. **86**(2): p. 1119-28.
291. ONUSIDA. *Des investissements continus dans la recherche sur la prévention du VIH peuvent accélérer le développement de nouveaux moyens qui contribueront à éliminer l'épidémie*. <http://www.unaids.org/fr/resources/presscentre/pressreleaseandstatementarchive/2013/june/20130630prresourcetracking/>
292. Veazey, R.S., et al., *Protection of macaques from vaginal SHIV challenge by vaginally delivered inhibitors of virus-cell fusion*. Nature, 2005. **438**(7064): p. 99-102.
293. Veazey, R.S., et al., *Protection of rhesus macaques from vaginal infection by vaginally delivered maraviroc, an inhibitor of HIV-1 entry via the CCR5 co-receptor*. J Infect Dis, 2010. **202**(5): p. 739-44.
294. Deng, Y., et al., *Protein design of a bacterially expressed HIV-1 gp41 fusion inhibitor*. Biochemistry, 2007. **46**(14): p. 4360-9.
295. Brichacek, B., et al., *In vivo evaluation of safety and toxicity of a Lactobacillus jensenii producing modified cyanovirin-N in a rhesus macaque vaginal challenge model*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e78817.
296. Liu, X., et al., *Engineered vaginal lactobacillus strain for mucosal delivery of the human immunodeficiency virus inhibitor cyanovirin-N*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(10): p. 3250-9.
297. Soulie, C., et al., *Primary genotypic resistance of HIV-1 to CCR5 antagonists in CCR5 antagonist treatment-naïve patients*. AIDS, 2008. **22**(16): p. 2212-4.
298. Huskens, D., et al., *The candidate sulfonated microbicide, PRO 2000, has potential multiple mechanisms of action against HIV-1*. Antiviral Res, 2009. **84**(1): p. 38-47.
299. Yang, Q.-e., K.-g. Li, and J.A. Mikovits, *Eradication of Human Immunodeficiency Virus Type 1–Infected Cells by a Combination of Antimetabolic Cytotoxic Chemotherapy and Antiviral Chemotherapy In Vitro: A Pilot Study*. Journal of Infectious Diseases, 2002. **186**(5): p. 706-709.
300. Lu, X.F. and Z.W. Chen, *The development of anti-HIV-1 drugs*. Yao Xue Xue Bao, 2010. **45**(2): p. 165-76.
301. Clavel, F. and A.J. Hance, *HIV Drug Resistance*. New England Journal of Medicine, 2004. **350**(10): p. 1023-1035.
302. Larrouy. L, Brun-Vézinet. , and D. D., *Mutations au niveau des sites de clivage de gag et du changement de cadre de lecture gag-pol du VIH-1 et réponse virologique à un traitement par inhibiteurs de protéase*. Virologie., 2010. **14** (2) p. 119-28.
303. Veazey, R.S., et al., *Topically applied recombinant chemokine analogues fully protect macaques from vaginal simian-human immunodeficiency virus challenge*. J Infect Dis, 2009. **199**(10): p. 1525-7.
304. Jones, K.L., J.J. Maguire, and A.P. Davenport, *Chemokine receptor CCR5: from AIDS to atherosclerosis*. Br J Pharmacol, 2011. **162**(7): p. 1453-69.
305. Moore, J.P. and D.R. Kuritzkes, *A piece de resistance: how HIV-1 escapes small molecule CCR5 inhibitors*. Curr Opin HIV AIDS, 2009. **4**(2): p. 118-24.

306. Westby, M., et al., *Reduced Maximal Inhibition in Phenotypic Susceptibility Assays Indicates that Viral Strains Resistant to the CCR5 Antagonist Maraviroc Utilize Inhibitor-Bound Receptor for Entry*. J Virol, 2007. **81**(5): p. 2359-2371.
307. Cormier, E.G. and T. Dragic, *The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor*. J Virol, 2002. **76**(17): p. 8953-7.
308. MacArthur, R.D. and R.M. Novak, *Reviews of anti-infective agents: maraviroc: the first of a new class of antiretroviral agents*. Clin Infect Dis, 2008. **47**(2): p. 236-41.
309. Berro, R., et al., *V3 determinants of HIV-1 escape from the CCR5 inhibitors Maraviroc and Vicriviroc*. Virology, 2012. **427**(2): p. 158-65.
310. Anastassopoulou, C.G., et al., *Resistance to CCR5 inhibitors caused by sequence changes in the fusion peptide of HIV-1 gp41*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(13): p. 5318-23.
311. Berro, R., et al., *Two HIV-1 variants resistant to small molecule CCR5 inhibitors differ in how they use CCR5 for entry*. PLoS Pathog, 2009. **5**(8): p. e1000548.
312. Tilton, J.C., et al., *HIV type 1 from a patient with baseline resistance to CCR5 antagonists uses drug-bound receptor for entry*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2010. **26**(1): p. 13-24.
313. Bosch, B., et al., *Inhibition of Coreceptor-Independent Cell-to-Cell Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission by a CD4-Immunoglobulin G2 Fusion Protein*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(10): p. 4296-4304.
314. Burton, D.R., E.O. Saphire, and P.W. Parren, *A model for neutralization of viruses based on antibody coating of the virion surface*. Curr Top Microbiol Immunol, 2001. **260**: p. 109-43.
315. McNicholas, P., et al., *Characterization of emergent HIV resistance in treatment-naive subjects enrolled in a vicriviroc phase 2 trial*. J Infect Dis, 2010. **201**(10): p. 1470-80.
316. Tsibris, A.M., et al., *In vivo emergence of vicriviroc resistance in a human immunodeficiency virus type 1 subtype C-infected subject*. J Virol, 2008. **82**(16): p. 8210-4.
317. McNicholas, P.M., et al., *Mapping and characterization of vicriviroc resistance mutations from HIV-1 isolated from treatment-experienced subjects enrolled in a phase II study (VICTOR-E1)*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2011. **56**(3): p. 222-9.
318. De Vreese, K., et al., *Sensitivity of human immunodeficiency virus to bicyclam derivatives is influenced by the three-dimensional structure of gp120*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(12): p. 2616-20.
319. Labrosse, B., et al., *Cooperation of the V1/V2 and V3 domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120 for interaction with the CXCR4 receptor*. J Virol, 2001. **75**(12): p. 5457-64.
320. Cho, M.W., et al., *Identification of determinants on a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that confer usage of CXCR4*. J Virol, 1998. **72**(3): p. 2509-15.
321. Stora, D., *Les mécanismes d'action des médicaments. Éléments de Pharmacodynamie.*, in *Pharmacologie BP2010*, Wolters Kluwer: France. p. 26-27.
322. Kenakin, T. and M. Williams, *Defining and characterizing drug/compound function*. Biochem Pharmacol, 2014. **87**(1): p. 40-63.
323. Kenakin, T., S. Jenkinson, and C. Watson, *Determining the Potency and Molecular Mechanism of Action of Insurmountable Antagonists*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2006. **319**(2): p. 710-723.
324. Taiwo, B., R.L. Murphy, and C. Katlama, *Novel antiretroviral combinations in treatment-experienced patients with HIV infection: rationale and results*. Drugs, 2010. **70**(13): p. 1629-42.

325. Chou, T.C., *Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(3): p. 621-81.
326. Piscitelli, S.C. and K.D. Gallicano, *Interactions among drugs for HIV and opportunistic infections*. N Engl J Med, 2001. **344**(13): p. 984-96.
327. Hansten, P.D. and J.R. Horn, *Drug Interactions Monographs, 1996: (Applied Therapeutics)*. 1996: Lippincott Williams & Wilkins.
328. Jimenez-Nacher, I., et al., *Approaches for understanding and predicting drug interactions in human immunodeficiency virus-infected patients*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2011. **7**(4): p. 457-77.
329. Chou, T.C., *The mass-action law based algorithm for cost-effective approach for cancer drug discovery and development*. Am J Cancer Res, 2011. **1**(7): p. 925-54.
330. Zhao, L., J.L. Au, and M.G. Wientjes, *Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction*. Front Biosci (Elite Ed), 2010. **2**: p. 241-9.
331. Chou, T.C., *The median-effect principle and the combination index for quantitation of synergism and antagonism*. (Chou, T.-C. & Rideout, D. C., Eds),pp. 61–102. , in *In Synergism and Antagonism in Chemotherapy.*, T.-C.R. Chou, D. C., Eds, Editor. 1991, Academy Press.: New York, NY, USA. p. 61–102.
332. Chou, T.C. and P. Talalay, *Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors*. Eur J Biochem, 1981. **115**(1): p. 207-16.
333. Chou, T.-C., *The median-effect principle and the combination index for quantization of synergism and antagonism*. , in *In Synergism and antagonism in chemotherapy* T.-C.a.R. Chou, D.C., Editor. 1991, Academic Press New York, NY, USA. p. pp. 61-102.
334. Chou, T.C.T., P., *Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effect of multiple drugs or enzyme inhibitors*. . Advances in Enzyme Regulation 1984. **22**: p. 27–55.
335. Chou TC, M.N., *CompuSyn for drug combinations: PC software and user's guide: A computer program for quantitation for synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC50 and ED50 and LD50 values*. , 2005.
336. Tremblay, C.L., et al., *TAK-220, a novel small-molecule CCR5 antagonist, has favorable anti-human immunodeficiency virus interactions with other antiretrovirals in vitro*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(8): p. 3483-5.
337. Tremblay, C.L., et al., *Anti-human immunodeficiency virus interactions of SCH-C (SCH 351125), a CCR5 antagonist, with other antiretroviral agents in vitro*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(5): p. 1336-9.
338. Murga, J.D., et al., *Potent antiviral synergy between monoclonal antibody and small-molecule CCR5 inhibitors of human immunodeficiency virus type 1*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(10): p. 3289-96.
339. Nakata, H., et al., *Potent synergistic anti-human immunodeficiency virus (HIV) effects using combinations of the CCR5 inhibitor aplaviroc with other anti-HIV drugs*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(6): p. 2111-9.
340. Asin-Milan, O., et al., *Synergistic Combinations of the CCR5 Inhibitor VCH-286 with Other Classes of HIV-1 Inhibitors*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(12): p. 7565-9.
341. Reeves JD, C.E., Petropoulos CJ, Whitcomb JM, *An Enhanced-Sensitivity Trofile™ HIV Coreceptor Tropism Assay for Selecting Patients for Therapy with Entry Inhibitors Targeting*

- CCR5: A Review of Analytical and Clinical Studies*. Journal of Viral Entry. , 2009. **3**(3): p. 94-102.
342. Gonzalez-Serna, A., et al., *TROCAI (tropism coreceptor assay information): a new phenotypic tropism test and its correlation with Trofile enhanced sensitivity and genotypic approaches*. J Clin Microbiol, 2010. **48**(12): p. 4453-8.
343. Poveda, E. and V. Soriano, *Optimizing management of treatment-naive and treatment-experienced HIV+ patients: the role of maraviroc*. HIV AIDS (Auckl), 2010. **2**: p. 51-8.
344. Pfeifer, N. and T. Lengauer, *Improving HIV coreceptor usage prediction in the clinic using hints from next-generation sequencing data*. Bioinformatics, 2012. **28**(18): p. i589-i595.
345. Moyle, G., et al., *Proof of activity with AMD11070, an orally bioavailable inhibitor of CXCR4-tropic HIV type 1*. Clin Infect Dis, 2009. **48**(6): p. 798-805.
346. Genebat, M., et al., *Correlation between the Trofile® test and virological response to a short-term maraviroc exposure in HIV-infected patients*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009.
347. Petropoulos, C.J., et al., *A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(4): p. 920-8.
348. Raymond, S., et al., *Development and performance of a new recombinant virus phenotypic entry assay to determine HIV-1 coreceptor usage*. J Clin Virol, 2010. **47**(2): p. 126-30.
349. Coakley, E., et al., *Comparison of human immunodeficiency virus type 1 tropism profiles in clinical samples by the Trofile and MT-2 assays*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(11): p. 4686-93.
350. Braun, P. and F. Wiesmann, *Phenotypic assays for the determination of coreceptor tropism in HIV-1 infected individuals*. Eur J Med Res, 2007. **12**(9): p. 463-72.
351. Swenson, L.C., et al., *Deep sequencing to infer HIV-1 co-receptor usage: application to three clinical trials of maraviroc in treatment-experienced patients*. J Infect Dis, 2011. **203**(2): p. 237-45.
352. Soulié, C.e.C.V., *Les tests de tropisme du VIH à l'heure de la mise à disposition du 1er anti-CCR5*. Médecine et maladies infectieuses 2008. **38**: p. S7-S11.
353. Trkola, A., et al., *HIV-1 escape from a small molecule, CCR5-specific entry inhibitor does not involve CXCR4 use*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 395-400.
354. Kuhmann, S.E., et al., *Genetic and phenotypic analyses of human immunodeficiency virus type 1 escape from a small-molecule CCR5 inhibitor*. J Virol, 2004. **78**(6): p. 2790-807.
355. Marozsan, A.J., et al., *Generation and properties of a human immunodeficiency virus type 1 isolate resistant to the small molecule CCR5 inhibitor, SCH-417690 (SCH-D)*. Virology, 2005. **338**(1): p. 182-99.
356. Westby, M., et al., *Emergence of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4-using virus reservoir*. J Virol, 2006. **80**(10): p. 4909-20.
357. Carnec. X, Z.S., Amara. A., *Mécanismes moléculaires de l'entrée du VIH dans les cellules cibles* Virologie., 2007. **Volume 11, Numéro spécial : Les inhibiteurs d'entrée du VIH, Revue** p. 86-94.
358. Berro, R., et al., *Multiple CCR5 conformations on the cell surface are used differentially by human immunodeficiency viruses resistant or sensitive to CCR5 inhibitors*. J Virol, 2011. **85**(16): p. 8227-40.

359. Ogert, R.A., et al., *Mapping resistance to the CCR5 co-receptor antagonist vicriviroc using heterologous chimeric HIV-1 envelope genes reveals key determinants in the C2-V5 domain of gp120*. *Virology*, 2008. **373**(2): p. 387-399.
360. Lewis M, M.J., Simpson P, et al., *Changes in V3 loop sequence associated with failure of maraviroc treatment in patients enrolled in the MOTIVATE 1 and 2 trials* 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; , 2008. [abstract no. 871]. .
361. De Feo, C.J. and C.D. Weiss, *Escape from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) entry inhibitors*. *Viruses*, 2012. **4**(12): p. 3859-911.
362. Anastassopoulou, C.G., et al., *Resistance of a human immunodeficiency virus type 1 isolate to a small molecule CCR5 inhibitor can involve sequence changes in both gp120 and gp41*. *Virology*, 2011. **413**(1): p. 47-59.
363. Pfaff, J.M., et al., *HIV-1 resistance to CCR5 antagonists associated with highly efficient use of CCR5 and altered tropism on primary CD4+ T cells*. *J Virol*, 2010. **84**(13): p. 6505-14.
364. Baba, M., et al., *Isolation and characterization of human immunodeficiency virus type 1 resistant to the small-molecule CCR5 antagonist TAK-652*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(2): p. 707-15.
365. Platt, E.J., et al., *Variants of human immunodeficiency virus type 1 that efficiently use CCR5 lacking the tyrosine-sulfated amino terminus have adaptive mutations in gp120, including loss of a functional N-glycan*. *J Virol*, 2005. **79**(7): p. 4357-68.
366. Hansten, P.D. and J.R. Horn, *Drug interactions*. 1996, Vancouver, WA: Applied Therapeutics. vii, 736 p.
367. Reynolds, C.P. and B.J. Maurer, *Evaluating response to antineoplastic drug combinations in tissue culture models*. *Methods Mol Med*, 2005. **110**: p. 173-83.
368. Parren, P.W., et al., *The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity*. *AIDS*, 1999. **13 Suppl A**: p. S137-62.
369. Dorr, P., et al., *Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(11): p. 4721-32.
370. A Roldan, O.A.M., D Huskens, S May, T Miletti, O Nicolas, L Chan, D Schols, C Tremblay, and J Bedard, *VCH-286, a Novel CCR5 Antagonist: Binding Kinetics, Anti-HIV Activity, and in vitro Combination Studies*. 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2009), 2009.
371. Jonker, D.M., et al., *Towards a mechanism-based analysis of pharmacodynamic drug-drug interactions in vivo*. *Pharmacol Ther*, 2005. **106**(1): p. 1-18.
372. Merrill, D.P., et al., *Lamivudine or stavudine in two- and three-drug combinations against human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro*. *J Infect Dis*, 1996. **173**(2): p. 355-64.
373. Loewe, S., *Antagonisms and antagonists*. *Pharmacol Rev*, 1957. **9**(2): p. 237-42.
374. Prichard, M.N. and C. Shipman, Jr., *A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions*. *Antiviral Res*, 1990. **14**(4-5): p. 181-205.
375. Tsamis, F., et al., *Analysis of the mechanism by which the small-molecule CCR5 antagonists SCH-351125 and SCH-350581 inhibit human immunodeficiency virus type 1 entry*. *J Virol*, 2003. **77**(9): p. 5201-8.
376. Tremblay, C., *Effects of HIV-1 entry inhibitors in combination*. *Curr Pharm Des*, 2004. **10**(15): p. 1861-5.

377. Moore, J.P. and R.W. Doms, *The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10598-602.
378. Watson, C., et al., *The CCR5 receptor-based mechanism of action of 873140, a potent allosteric noncompetitive HIV entry inhibitor*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(4): p. 1268-82.