



HAL
open science

Contribution des protéines régulatrices Vif et Vpr du VIH-1 dans la résistance aux antirétroviraux chez des patients en échec virologique

Slim Fourati

► **To cite this version:**

Slim Fourati. Contribution des protéines régulatrices Vif et Vpr du VIH-1 dans la résistance aux antirétroviraux chez des patients en échec virologique. *Virologie*. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66188 . tel-00829510

HAL Id: tel-00829510

<https://theses.hal.science/tel-00829510v1>

Submitted on 3 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

SPECIALITE :
COMPLEXITE DU VIVANT

PRESENTEE PAR
SLIM FOURATI

POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

**Sujet de la thèse : CONTRIBUTION DES PROTEINES REGULATRICES
VIF ET VPR DU VIH-1 DANS LA RESISTANCE AUX
ANTIRETROVIRAUX CHEZ DES PATIENTS EN ECHEC
VIROLOGIQUE**

Soutenu le 06 Septembre 2012

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Vincent Maréchal
Madame de Docteur Anne-Genevieve Marcelin
Madame le Professeur Diane Descamps
Monsieur le Professeur Jacques Izopet
Monsieur le Docteur Serge Benichou

Président
Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur

Je remercie Monsieur le Professeur **Vincent Maréchal** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse

Un grand merci à Madame le Professeur **Diane Descamps** et Monsieur le Professeur **Jacques Izopet** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse

Je remercie vivement le Docteur **Serge Benichou** d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse et pour son enrichissante collaboration

Je remercie le Professeur **Vincent Calvez** de son accueil et de tout le soutien qu'il m'a accordé depuis mon arrivée au sein de l'équipe. Je le remercie de sa disponibilité, de son riche enseignement et de ses conseils

Je remercie sincèrement le Docteur **Anne-Geneviève Marcelin**, pour ses précieux conseils, ses compétences scientifiques et sa disponibilité. J'espère encore partager de nombreux projets scientifiques avec elle

Je remercie le Professeur **Henri Agut** de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je remercie le Professeur **Dominique Costagliola** de m'avoir accueilli dans l'unité INSERM U943 qu'elle dirige

Un très grand merci à **Cathia Soulié** et à **Sidonie Lambert** pour le soutien moral qu'elles m'ont accordé, leurs disponibilités, leurs contributions à la réalisation de ce travail et à la relecture du manuscrit

Je suis très reconnaissant à **Isabelle Malet** pour son enseignement et pour sa collaboration dans la réalisation de ce travail

Un très grand merci à **Sophie Sayon** pour son aide précieuse à la réalisation de ce travail

Merci **Marc Wirden**, **Nathalie Désiré**, **Djeneba Fofana Bocar**, pour leur aide de tous les instants et le plaisir de travailler à leur côtés

Enfin, merci à l'ensemble des **techniciens** du laboratoire de virologie de l'hôpital Pitié-Salpêtrière et plus particulièrement **Zaïna Ait-Arkoub** pour son investissement quotidien dans la réalisation des projets de recherche.

Résumé

Les protéines accessoires du VIH-1 Vif et Vpr jouent un rôle indirect dans la variabilité génétique virale. La protéine Vpr limite le taux d'erreurs induites par la TI en interagissant avec l'UNG2. La protéine Vif intervient en prévenant l'apparition de mutations résultant de l'activité des cytidines désaminases APOBEC3 sur l'ADN viral. La variabilité génétique induite par ces protéines pourrait jouer un rôle dans la résistance aux antirétroviraux. Dans une première partie de la thèse, nous avons identifié la mutation K22H dans *vif* chez des patients en échec thérapeutique. Cette mutation favorise l'apparition de mutations G-vers-A dans le génome viral (par perte partielle d'interaction avec la désaminase cellulaire APOBEC3G) et participe à l'apparition de mutations de résistance (M184I dans la TI) pouvant expliquer l'échec virologique chez ces patients. Dans un autre travail, nous montrons que deux mutations de résistance (E138K et M184I dans TI) fréquemment retrouvées en cas d'échec virologique à la combinaison emtricitabine-ténofovir et rilpivirine apparaissent de façon concomitante sous l'action d'APOBEC3 en dehors de tout traitement antirétroviral. Enfin, dans la dernière partie de ce travail, nous avons identifié la mutation E17A dans *vpr* associée aux « thymidin analog mutations » ou TAMs (M41L, L210W, et T215Y) dans la TI et à la prise antérieure de didanosine chez des patients en échec virologique. Des études phénotypiques ont montré que le virus E17A+TAMs confère une résistance à la didanosine significativement supérieure à celle conférée par les TAMs seules ou le virus E17A seul. Ce travail met en évidence un nouveau rôle de Vpr dans les mécanismes de résistance aux antirétroviraux.

Mots clés : VIH-1 ; Vif ; Vpr ; variabilité génétique ; résistance aux antirétroviraux ; didanosine ; rilpivirine

Abstract

HIV-1 Vif and Vpr proteins may play a role in viral genetic variability. Indeed, Vpr limits error-induced mutations by the viral reverse transcriptase by recruiting the nuclear form of Uracil DNA glycosylase (UNG2). On the other hand, Vif prevents APOBEC3-induced hypermutation on the viral genome. Genetic variability induced by these HIV accessory proteins might play a role in the appearance of drug resistance associated mutations. We first identified a mutation in *vif* (K22H) frequently found in patients failing antiretroviral treatment. Biochemical studies and viral replication kinetics demonstrated that this mutation favor the appearance of G-to-A mutations in proviral DNA (as a result of partial activity against APOBEC3G). K22H mutation led to the emergence of the drug resistance mutation M184I in the reverse transcriptase (RT) gene. In another study, we showed that E138K and M184I mutations in RT (often co-selected in patients failing emtricitabine/tenofovir/rilpivirine) concomitantly appear as a result of APOBEC3 editing in the absence of drug exposure, thus providing a new key towards understanding mechanisms of escape of this new drug combination. In a third study, we identified a mutation in *vpr* (E17A) associated to “thymidin analog mutations” TAMs (M41L, L210W, T215Y in RT) in patients failing HAART. Phenotypic assays demonstrated that viruses harboring E17A+TAMs conferred higher resistance to didanosine than virus harboring TAMs or E17A alone. This study highlights a novel role of Vpr in HIV drug resistance.

Keywords : HIV-1 ; Vif ; Vpr ; genetic variability ; antiretroviral resistance ; didanosine; rilpivirine

Abréviations

293T	cellules embryonnaires humaines de rein
A3G	APOBEC3G
A3F	APOBEC3F
aa	acide aminé
ABC	abacavir
ADN	acide désoxyribonucléique
Ag p24	antigène p24
AMM	autorisation de mise sur le marché
ANRS	agence nationale de recherche sur le SIDA
APOBEC	apolipoprotéine B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like editing complex
APV	amprénavir
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNv	ARN viral
ARV	Antirétroviraux
Asn	asparagine (N)
Asp	acide aspartique (D)
ATP	adénosine 5'-triphosphate
ATV	atazanavir
AZT	3'-azido-3'-désoxythymidine, zidovudine
CA	protéine de capsid = p24
CCR5	récepteur de chimiokines CCR5
CD4	Lymphocyte T CD4+
CD8	Lymphocyte T CD8+
CEM	lignées lymphocytaires exprimant A3G
CEM-SS	lignées lymphocytaires n'exprimant pas A3G
CI ₅₀ /CI ₉₀	concentration d'inhibiteur permettant d'atteindre 50%/90% d'inhibition de réplication virale
CRF	« <i>circulating recombinant form</i> »
coll.	collaborateurs
CXCR4	récepteur de chimiokines CXCR4
CYP3A	isoenzyme 3A du cytochrome P450
d4T	2', 3'-didéhydro-3'-désoxythymidine, stavudine
ddI	didésoxyinosine, didanosine
dNTP	2'-désoxyribonucléotide 5'-triphosphate
ddNTP	2', 3'-didésoxynucléotide 5'-triphosphate
DTG	Dolutégravir
DRV	darunavir
EFV	efavirenz
<i>env</i>	« <i>envelope</i> »
ETR	etravirine
EVG	elvitégravir
fosAPV	fosamprénavir
FTC	emtricitabine
<i>gag</i>	« <i>group-specific antigen</i> »
Gln	glutamine (Q)
Glu	acide glutamique (E)
Gly	glycine (G)
gp	glycoprotéine
HAART	highly active antiretroviral therapy
His	histidine (H)
HR1 et 2	heptad repeat region 1 et 2

HTLV	Human T cell Leukemia Virus
IAS-USA	international AIDS society USA
IDV	indinavir
Ile	isoleucine (I)
IN	intégrase
INI	inhibiteur de l'intégrase
INNTI	inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse
INTI	inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse
IP	inhibiteur de protéase
kDa	kilodalton
LPV	lopinavir
LPS	lipopolysaccharide
LTR	« <i>long terminal repeat</i> »
Lys	lysine (K)
MA	protéine de matrice = p17
Mg ²⁺	ions magnésium
MT-2	Cellules lymphocytaires humaines transformées par HTLV-1, non adhérentes
MVC	maraviroc
<i>nef</i>	« <i>negative factor</i> »
NC	protéine de nucléocapside = p7
nm	nanomètre
NLS	« <i>Nuclear localization sequence</i> » ou séquences de localisation nucléaire
nt	nucleotide
NVP	névirapine
OH	hydroxyle
P	phosphate
p51	sous-unité de la TI de PM = 51 kDa
p66	sous-unité de la TI de PM = 66 kDa
pb	paires de bases
PBMC	cellules mononuclées de sang périphérique
pbs	« <i>primer binding site</i> »
PCR	« <i>polymerase chain reaction</i> »
PIC	complexe de préintégration
Phe	phenylalanine (F)
<i>pol</i>	« <i>polymerase</i> »
ppt	« <i>polypurine tract</i> »
PR	protéase
RAL	raltégravir
RPV	rilpivirine
rtv	ritonavir
<i>rev</i>	« <i>regulator of virion expression</i> »
RMN	résonance magnétique nucléaire
RNase H	« <i>ribonuclease H</i> »
RPA	« <i>replication protein A</i> »
RTV	ritonavir
RVA	« <i>recombinant virus assay</i> »
Ser	serine (S)
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SQV	saquinavir
STI	strand tranfert inhibitor
SU gp120	gp 120 de Surface
Sup-T1	Cellules lymphocytaires humaines de lymphome T, non adhérentes
t	thymidine
T20	enfuvirtide

TAMs	« <i>thymidine analogue mutations</i> »
Tat	protéine Transactivatrice
TDF	ténofovir = PMPA
TI	transcriptase inverse
TM gp41	gp41 transmembranaire
Thr	thréonine (T)
TPV	tipranavir
3TC	lamivudine
Tyr	tyrosine (Y)
U3	élément de séquence unique à l'extrémité 3' de l'ARNv
U5	élément de séquence unique à l'extrémité 5' de l'ARNv
UNG	uracile-DNA-glycosylase
UNG-2	Forme nucléaire de l'uracile-DNA-glycosylase
vif	« <i>viral infectivity factor</i> »
VIH-1	virus de l'immunodéficience humaine de type 1
VIH-2	virus de l'immunodéficience humaine de type 2
vpr	« <i>viral protein r</i> »
vpu	« <i>viral protein u</i> »

Sommaire

INTRODUCTION	9
I. Le virus de l'Immunodéficience humaine (VIH)	11
1. Structure de la particule virale et organisation génomique du VIH-1	11
2. Cycle viral	13
II. Variabilité génétique du VIH-1 : principes généraux	14
1. Facteurs de variabilité génétique virale.....	14
2. Les sous-types circulants.....	16
III. Traitement antirétroviral et résistance aux antirétroviraux	16
1. Principe et objectifs	16
2. Molécules antirétrovirales	17
a. <i>Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTIs)</i>	17
b. <i>Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTIs)</i>	18
c. <i>Inhibiteurs de la protéase (IPs)</i>	18
d. <i>Autres antirétroviraux</i>	19
3. Résistance aux antirétroviraux	20
a. <i>Origine de la résistance aux antirétroviraux</i>	20
b. <i>Résistance aux différentes classes antirétrovirales</i>	22
4. Evaluation de la résistance	28
a. <i>Les tests génotypiques</i>	28
b. <i>Les tests phénotypiques</i>	29
c. <i>Utilisation des tests de résistance</i>	30
IV. Rôle des protéines accessoires du VIH-1 Vif et Vpr dans la variabilité génétique	30
1. La protéine Vif du VIH-1	30
a. <i>Généralités</i>	30
b. <i>Mécanismes d'action</i>	31

c.	<i>Fonctions de Vif et spécificité cellulaire</i>	34
d.	<i>Rôle de l'interaction Vif-APOBEC3 dans la variabilité génétique virale.....</i>	35
2.	La protéine Vpr du VIH-1	36
a.	<i>Généralités</i>	36
b.	<i>fonctions de Vpr.....</i>	37
c.	<i>Rôle de Vpr dans la variabilité génétique virale.....</i>	40
	OBJECTIFS.....	42
	RESULTATS	45
	DISCUSSION.....	52
	REFERENCES	61
	ANNEXES.....	73

INTRODUCTION

Le Virus de l'Immunodéficience humaine (VIH) a été identifié en 1983 comme agent responsable de l'épidémie de SIDA (syndrome d'immunodéficience humaine acquise) par l'équipe du professeur Montagnier (Institut Pasteur, Paris) [1]. D'après le dernier rapport ONUSIDA (<http://www.unaids.org>), plus de 33 millions de personnes vivaient avec ce virus en 2010. L'Afrique subsaharienne représente à elle seule les 2/3 de la population contaminée. Historiquement, le traitement contre le virus a commencé par l'AZT en 1987, puis plusieurs molécules de la même classe thérapeutique, dite des Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTIs), ont été développées. C'est en 1996 avec la mise sur le marché de deux nouvelles classes d'antirétroviraux: les Inhibiteurs de Protéase (IPs) et les Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INNTIs) que la trithérapie «hautement active» (HAART: Highly Active Antiretroviral Therapy) a considérablement amélioré la prise charge et réduit le taux de morbidité de la maladie de 80%. Depuis les dix dernières années, de nouvelles classes d'antirétroviraux ont vu le jour : les inhibiteurs d'entrée, les antagonistes du récepteur CCR5 et les inhibiteurs d'intégrase. Le nombre de molécules anti VIH est ainsi passé d'un composé en 1987 à plus de 20 antirétroviraux ce jour permettant grâce à de nombreuses combinaisons possibles de mieux contrôler la maladie. En France, plus de 80% des patients pris en charge reçoivent des combinaisons antirétrovirales et la réplication virale est contrôlée chez 87 % des patients traités depuis au moins 6 mois en 2008. Malheureusement, près de 30% des patients sont encore pris en charge tardivement et le nombre de personnes infectées qui ne connaîtraient pas leur infection par le VIH ou qui ne se font pas suivre peut être estimé aux alentours de 30.000 en 2011. Aussi malgré des progrès spectaculaires, beaucoup d'efforts doivent être réalisés dans les domaines de la prise en charge et du dépistage.

L'accès à tous les antirétroviraux n'est malheureusement possible que dans les pays riches et ne concerne donc qu'une petite minorité de la population mondiale infectée. Améliorer l'accès aux nouvelles classes d'antirétroviraux pour les pays pauvres doit être l'une des priorités de la communauté internationale.

I. Le virus de l'Immunodéficience humaine (VIH)

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) appartient à la famille des *Retroviridae* dont les virus se distinguent par la présence d'une enzyme virale caractéristique : la Transcriptase inverse TI ou en anglais, RT, 'reverse transcriptase'). Il appartient au genre *lentivirus*. Ce genre regroupe un grand nombre de virus non oncogènes qui provoquent la mort des cellules infectées et qui sont responsables de maladies à évolution lente. Ils infectent différentes espèces animales dont les primates (VIH, SIV), les félins (FIV) ou encore les bovins (BIV). A côté du VIH-1 responsable d'une pandémie mondiale, le VIH-2 est présent essentiellement en Afrique de l'Ouest, ces deux virus partageant environ 50% d'homologie.

1. Structure de la particule virale et organisation génomique du VIH-1

Le VIH-1 est un virus enveloppé de 90 à 120 nanomètres de diamètre, produits par bourgeonnement à la surface des cellules infectées (figure 1a). L'enveloppe virale est formée d'une double couche lipidique d'origine cellulaire et de deux glycoprotéines virales: la glycoprotéine transmembranaire (gp41) et la glycoprotéine d'enveloppe externe (gp120). Les spicules correspondent à des trimères de ces deux glycoprotéines. L'enveloppe protège la capsid interne ou « core » du virus qui renferme une matrice (MA) composée de protéines p17 puis une capsid (CA) composée de protéines p24. Le génome du VIH-1, contenu dans la capsid et associé à la nucléocapsid (NCp7), est constitué de deux molécules identiques d'ARN simple brin de polarité positive, liées de façon non covalente en 5'. Les trois enzymes virales indispensables à la réplication : la TI, l'intégrase (IN) et la protéase (PR) sont contenues dans le core viral. Des protéines accessoires du VIH tels que les protéines Vif et Vpr sont contenues dans les particules virales et jouent un rôle fondamental dans l'infectivité virale (figure 1A).

Le génome du VIH-1 de polarité positive a une longueur d'environ 9200 nucléotides (nt) (figure 1b). L'ARN viral coiffé en 5' et polyadénylé en 3' est encadrée par deux courtes séquences répétées R (« Repeat) adjacentes aux séquences uniques U5 et U3 présentes respectivement aux extrémités 5' et 3' de l'ARN. Dans la cellule hôte, la rétro-transcription de l'ARN viral simple brin en ADN double brin est complexe et génère une duplication des séquences U5 et U3 conduisant à la formation de séquences répétées directes aux deux extrémités du génome : les LTR (« Long Terminal Repeat »), constitués des régions U3, R et U5 (figure 1b)

Le génome du VIH-1 est constitué de trois gènes principaux appelés gag ('group antigen specific'), pol ('polymerase gene') et env ('enveloppe gene'), qui codent respectivement pour les antigènes de la nucléocapside, pour les enzymes nécessaires à la réplication virale et pour les protéines de surface du virion. Ils définissent la structure du virus et sont communs à tous les rétrovirus. Six autres gènes situés entre pol et env codent pour des protéines accessoires, dénommés Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu et Nef. Plusieurs de ces protéines interagissent avec des protéines cellulaires ou « partenaires cellulaires ». Elles jouent un rôle pivot dans l'orchestration du cycle viral du virus et sont essentielles à la réplication virale *in vivo* (figure 1b).

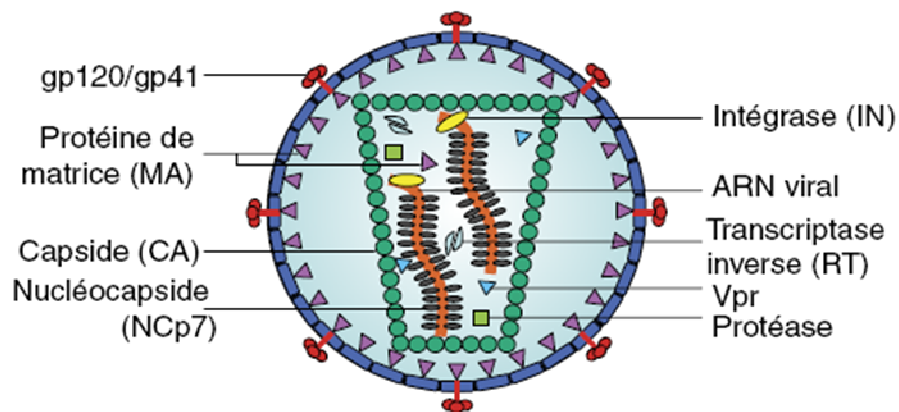


Figure 1a. Structure du VIH-1 (d'après « Import nucléaire du matériel génétique du VIH-1 » G.Jacquot, S. Benichou).

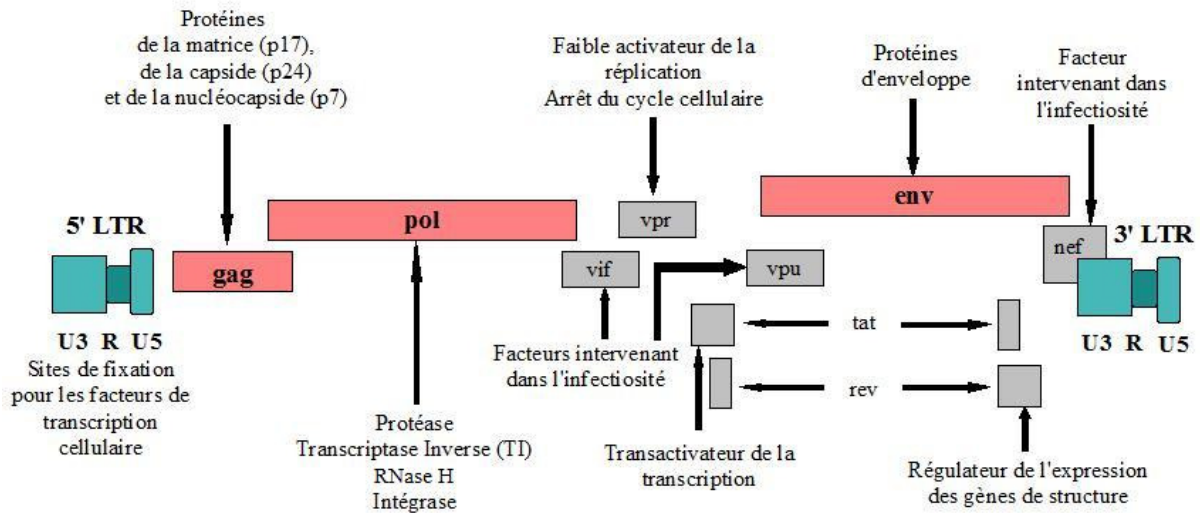


Figure 1b. Structure génomique de l'ADN proviral du VIH-1. L'ADN proviral est encadré par les deux LTR. En plus des trois gènes de structure gag, pol et env, codant respectivement les protéines structurales internes, les trois enzymes virales et les glycoprotéines d'enveloppe, le VIH-1 a six gènes supplémentaires, régulateurs de la réplication virale.

2. Cycle viral

Les différentes étapes de la réplication du virus sont les suivantes : l'entrée du virus dans la cellule est la conséquence d'une reconnaissance entre la glycoprotéine gp120 virale et son récepteur spécifique présent à la surface de la cellule cible, la molécule CD4. Cette liaison de très haute affinité entraîne un changement conformationnel de la gp120 qui permet à une région spécifique, la boucle V3 d'interagir avec des corécepteurs (CCR5 et CXCR4) également présents à la surface de la membrane cellulaire. Cette interaction met en contact la glycoprotéine gp41 virale avec la membrane cellulaire et il en résulte la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la cellule hôte. La capside du VIH pénètre alors dans le cytoplasme de la cellule et débute alors la rétro-transcription du génome viral. Les complexes VIH-1 intracytoplasmiques, depuis leur entrée dans la cellule jusqu'à l'achèvement de la rétro-transcription sont appelés « complexe de rétro-transcription ».

Au sein des « complexes de rétrotranscription », l'ARN viral est rétro-transcrit dans le cytoplasme par la TI en ADN complémentaire ou ADN (-) alors que l'ARN viral est dégradé par une activité ribonucléase H de la TI. C'est lors de cette synthèse d'ADN (-) que la TI, polymérase peu fidèle (car dépourvue d'une activité exonucléase 3' vers 5') introduit des erreurs qui seront à l'origine d'une grande part de la variabilité génétique du VIH. La TI permet ensuite la synthèse du second brin d'ADN ou brin (+), utilisant le brin (-) comme matrice. C'est également à ce niveau qu'interviennent certaines protéines accessoires du VIH-

1 (Vif et Vpr) dans le maintien de l'intégrité du génome viral et/ou la modulation du taux de mutation virale via des interactions avec des partenaires cellulaires (mécanismes détaillés au chapitre IV).

Pendant l'étape de la rétrotranscription, les complexes, sont transportés activement vers le noyau. L'achèvement de la rétrotranscription est concomitant à la décapsidation et la formation des complexes de pré-intégration nucléoprotéique appelé CPI contenant, outre l'ADN double brin, des protéines virales : l'intégrase, la matrice, la TI et la protéine Vpr ainsi que des protéines de l'hôte liant l'ADN. Au sein de ce complexe, l'intégrase assure sa première fonction de clivage d'un dinucléotide à chacune des deux extrémités de l'ADN viral (maturation). Le CPI traverse ensuite la membrane nucléaire et l'ADN viral s'intègre au sein de l'ADN cellulaire grâce à la deuxième fonction de l'intégrase appelée transfert de brin. Cette étape d'intégration dans le génome de la cellule hôte est très complexe et, dans un certain nombre de cas, l'ADN proviral reste sous forme linéaire et est dégradé ou se circularise en formant des formes à 1 ou 2 LTR.

Après cette phase dite précoce, la phase tardive va conduire à la libération de nouveaux virus par la cellule, dépendant du type et de l'état d'activation de la cellule infectée. Le virus utilise alors la machinerie cellulaire pour se répliquer : la transcription de l'ADN proviral en ARN génomique est assurée en effet par l'ARN polymérase II de la cellule hôte. Deux protéines virales interviennent alors : tat qui régule l'élongation de la transcription et rev qui joue un rôle dans le transport de l'ARN génomique complet ou épissé vers le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, les ARN messagers viraux de différentes tailles codent pour les polyprotéines env ou gag/pol et pour les protéines accessoires. Après l'assemblage de ces polyprotéines virales et l'encapsidation de l'ARN viral, les nouvelles particules formées bourgeonnent à la surface de la cellule avant d'être libérées dans le milieu extracellulaire. La maturation des protéines virales est assurée par la protéase virale.

II. Variabilité génétique du VIH-1 : principes généraux

Le VIH-1 étant un virus à ARN ayant un cycle de réplication rapide, le processus d'évolution est particulièrement rapide conduisant à un grand polymorphisme viral.

1. Facteurs de variabilité génétique virale

Cette grande variabilité résulte principalement des phénomènes suivants :

-des mutations aléatoires fréquentes. Le taux de mutations aléatoires est au moins 1000 fois plus important au niveau du génome du VIH qu'au niveau du génome humain. En effet, la TI qui permet au VIH de se répliquer, est une enzyme qui ne possède pas d'activité exonucléase de 3' vers 5'. La rétro-transcription de l'ARN génomique est initiée dans le « core » viral dans les étapes précoces du cycle viral. De plus, l'ARN polymérase II cellulaire contribue à l'apparition de mutations aléatoires au moment de la transcription du génome viral [2]. Les erreurs introduites au cours de la rétro-transcription sont donc fréquentes et sont estimées à une erreur tous les 10000 nucléotides copiés. Le génome étant composé d'environ 10000 nucléotides, il sera introduit environ une mutation à chaque cycle de réplication. Au sein de l'organisme d'une personne infectée et non traitée, on estime que 10 milliard de virions sont renouvelés chaque jour.

- Les recombinaisons génétiques. Le phénomène de recombinaison, mis en évidence en 1989 [3], est possible grâce à la capacité de la TI de « sauter » d'une molécule d'ARN à l'autre lors de la rétro-transcription, créant ainsi un ADN recombinant [4]. Ainsi, lorsqu'une seule cellule est infectée par deux virions génétiquement différents, les séquences peuvent donner naissance à des formes recombinantes.

- En plus de ces facteurs, d'autres mécanismes de variabilité génétique faisant intervenir certaines protéines accessoires du VIH (Vif et Vpr) sont également décrits. Ces mécanismes seront détaillés au chapitre IV.

Si un grand nombre de mutations entraîne la production de virions défectifs, certaines d'entre elles confèrent un grand pouvoir d'adaptation permettant au virus d'échapper au système immunitaire de son hôte. Seuls les virions les mieux adaptés seront sélectionnés et se multiplieront dans l'organisme. La prise d'un traitement antirétroviral entraînera également une sélection au sein de la population virale en favorisant l'émergence de variants résistants.

Ainsi, chez un même individu, le virus est présent sous forme d'une population virale polymorphe avec une multitude de génomes différents (ou « variants »), c'est ce qu'on appelle une «quasi-espèce». Chez le sujet récemment infecté, les virus circulants sont génétiquement très homogènes. Cette population virale va évoluer avec un taux global de changement estimé à 1% par an pour le gène *env* et 0,5% par an pour le gène *gag*. Un mélange complexe de variants va apparaître progressivement et évoluer de façon différente et indépendante au niveau des différents tissus et cellules [5].

2. Les sous-types circulants.

Sur la base des distances génétiques entre les VIH-1 retrouvés chez les patients, une classification des VIH-1, en quatre groupes distincts M ('Main'), N (non-M, non-O), O ('Outlier') et P a été établie. Le groupe M regroupe 11 sous-types (A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J et K) dont le sous-type majoritaire est le sous-type C qui représente 50% des infections dans le monde. La répartition géographique de ces différents sous-types est variable (<http://www.hiv.lanl.gov>). A titre d'exemple, le sous-type B est prédominant en Europe, en Australie et en Amérique du Nord. Le groupe O et le groupe N, beaucoup plus rares, sont retrouvés principalement au Cameroun. Un nouveau variant VIH-1 a été identifié chez une femme camerounaise amenant les auteurs à proposer un nouveau groupe appelé groupe P [6]. Dans le cas de co-infections par plusieurs sous-types de VIH-1, des phénomènes de recombinaison entre les virus distincts permettent l'émergence de virus recombinants ou « *circulating recombinant form* » (CRF). Leur nombre est en constante évolution et la base de données de Los Alamos en répertorie plus de 50 en 2011 (<http://hiv-web.lanl.gov>). Lorsqu'elles sont composées de plus de 2 sous-types, on parle de CRF complexe ou CRF_cpx. En France, la souche non B la plus fréquente est un recombinant des sous-types A et G: le CRF02.

III. Traitement antirétroviral et résistance aux antirétroviraux

1. Principe et objectifs

Dès sa pénétration dans l'organisme, le VIH se réplique de façon massive (1 à 10 milliards de particules virales produites par jour) et détruit une quantité à peu près équivalente de lymphocytes CD4. Ainsi l'infection conduit pratiquement toujours à la destruction progressive du système immunitaire et l'idée d'une possible éradication semble difficile au vu de l'établissement d'un important réservoir de cellules infectées de manière latente dès la phase précoce de l'infection. L'enjeu principal du traitement antirétroviral est d'empêcher la réplication virale afin d'éviter la destruction des cellules immunitaires qui conduit à l'immunodépression sévère définissant le stade SIDA. La réplication virale doit être, en fait, réduite à minima afin de préserver l'efficacité des antirétroviraux dans le temps en évitant au développement de mutations de résistance. Ainsi puissance et durabilité sont les deux objectifs du traitement antirétroviral pour la réduction de la morbidité et de la mortalité via le maintien ou la restauration du système immunitaire défini par un nombre de lymphocytes T

CD4+ supérieur à 500/mm³. La connaissance approfondie du cycle de réplication du VIH a permis de fournir de nombreuses cibles potentielles à des agents thérapeutiques. Ainsi la TI, la protéase, la gp41, le corécepteur CCR5 et l'intégrase, sont les cibles virales des molécules actuellement sur le marché français. Le premier antirétroviral utilisé en monothérapie fut la zidovudine ou AZT en 1987, un inhibiteur nucléosidique de la TI (INTI). Puis d'autres molécules de la même classe sont apparues et ont permis, en les combinant, de montrer une meilleure efficacité des bithérapies. A partir de 1996, est né, avec l'arrivée des inhibiteurs de protéase (IP), le concept de trithérapie qui combine deux INTIs et un IP. Ces associations puissantes appelées HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) ont montré une considérable efficacité tant sur le plan clinique que virologique et immunologique.

La mesure de la charge virale plasmatique est le meilleur marqueur pour évaluer l'efficacité d'un traitement. L'objectif est de rendre cette charge virale indétectable en quelques mois, en dessous de 50 copies/ml en 6 mois afin de limiter, d'une part, le nombre de lymphocytes T CD4+ infectés qui seraient rapidement détruits et, d'autre part, la sélection de virus résistants qui entraîneraient un rebond de la charge virale plasmatique. L'objectif immunologique est le retour à des valeurs normales de la numération des lymphocytes CD4 ou plus modestement de maintenir les CD4 au-dessus de 500 par mm³ pour éviter la survenue de maladies opportunistes. Enfin, le choix thérapeutique doit prendre en compte l'amélioration de la qualité de vie du patient avec des traitements simples et bien tolérés, afin d'assurer la meilleure adhésion, élément majeur du pronostic virologique (Yeni, 2010).

2. Molécules antirétrovirales

a. *Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTIs)*

Les molécules appartenant à cette famille agissent durant la phase précoce du cycle de réplication virale par inhibition de la TI. Ces composés ont constitué la première classe d'antirétroviraux mis sur le marché en 1987. Ils sont analogues des nucléosides naturels, mais privés d'un groupement hydroxyle en 3' (didésoxynucléosides ou ddNTP) les empêchant ainsi d'assurer la liaison 5'-3' avec le nucléoside suivant. Ils sont alors appelés « terminateur de chaîne » [7]. Ce sont des prodrogues qui subissent une triphosphorylation intracellulaire pour être actifs (en dehors du ténofovir). En se liant avec la TI, ces dérivés entrent en compétition avec les nucléosides naturels et sont incorporés dans le premier brin d'ADN proviral lors de

sa synthèse par la TI. L'arrêt de la synthèse d'ADN virale correspond à l'effet antiviral.

b. Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTIs).

De structure chimique différente des INTIs, ils ont des effets similaires avec une activité inhibitrice importante sur la TI du VIH-1, alors qu'ils sont inactifs sur le VIH-2 et le VIH-1 groupe O. A la différence des analogues nucléosidiques, ils inhibent la TI de façon non compétitive, en se fixant au niveau d'une poche hydrophobe située à proximité du site catalytique de l'enzyme. Ils inhibent la polymérisation par un mécanisme allostérique avec une activité inhibitrice importante sur la TI du VIH-1 [8]. Les INNTIs ont la particularité d'être métabolisés de façon prédominante par le foie avec une demi-vie longue permettant une prise unique quotidienne. Les INNTIs actuellement commercialisés sont au nombre de quatre : les molécules de première génération, dont la barrière génétique est faible et présentant des résistances croisées, que sont la névirapine (NVP) et l'efavirenz (EFV) ; d'autre part, les molécules de deuxième génération dont le chef de file est l'etravirine (ETR) capable d'inhiber des virus porteurs de mutations de résistance aux inhibiteurs de première génération lorsqu'il est associé à des antirétroviraux pleinement actifs. La rilpivirine, nouvelle molécule de deuxième génération a récemment obtenu l'autorisation de mise sur le marché chez les patients naïfs d'antirétroviraux. Cette nouvelle molécule semble avoir une barrière génétique plus faible [9, 10].

c. Inhibiteurs de la protéase (IPs)

La synthèse des protéines virales du VIH passe par des précurseurs comme les polyprotéines Gag et Gag-Pol. Le rôle de la protéase est de cliver ces deux précurseurs pour donner naissance aux protéines fonctionnelles. Ainsi, à l'inverse des inhibiteurs de la TI agissant à une phase précoce de l'infection, les inhibiteurs de protéase bloquent une phase plus tardive de la maturation virale. La majorité des IPs actuellement disponibles sont des peptidomimétiques qui se lient compétitivement sur le site actif de la protéase. La protéase ne peut plus cliver les précurseurs et les nouveaux virus seront donc immatures et non infectieux. Ils sont actifs sur le VIH-1 et VIH-2. L'efficacité et la puissance des IPs ont rapidement permis un meilleur contrôle de la charge virale dès 1997. [11, 12]. Ces composés ont tous un métabolisme hépatique utilisant la voie des cytochromes CYP3A. Ils font donc l'objet d'interactions médicamenteuses contre-indiquant l'utilisation concomitante de certains médicaments ou nécessitant des ajustements de doses [13]. C'est pourquoi le dosage des concentrations plasmatiques est souvent conseillé pour ajuster les doses au cas par cas. Le

ritonavir (RTV), un des premiers IPs mis sur le marché, n'est d'ailleurs plus utilisé comme antirétroviral proprement dit mais comme potentialiseur (« booster » en anglais) grâce à son important effet inhibiteur du CYP3A. Cet effet ralentit le catabolisme des autres IPs et augmente l'aire sous courbe de l'IP associé en augmentant soit sa demi-vie (fosamprénavir, indinavir) soit sa concentration maximale (lopinavir, saquinavir). Les ajustements de concentrations plasmatiques peuvent alors se réaliser en jouant sur les doses de l'IP ou du ritonavir selon l'IP utilisée. Actuellement, la classe des IPs est celle qui offre le plus d'options médicamenteuses avec 7 molécules actives contre le VIH : le saquinavir (SQV), l'indinavir (IDV), l'atazanavir (ATV), le fosamprénavir (fAPV), le lopinavir (LPV), le tipranavir (TPV) et le darunavir (DRV). Le nelfinavir (NFV), IP de première génération n'est plus utilisé en France depuis 2007.

d. Autres antirétroviraux

-Inhibiteurs d'entrée

Deux classes de molécules utilisées en clinique agissent sur l'étape d'entrée du virus dans la cellule : les inhibiteurs de fusion et les inhibiteurs du corécepteur CCR5.

-L'inhibiteur de fusion actuellement commercialisé est l'enfuvirtide (T20) [14]. Il s'agit d'un peptide synthétique de 36 acides aminés qui reproduit une partie de région répétée HR2 (heptad repeat region 2) de la gp41. L'enfuvirtide, en se fixant de façon compétitive au domaine protéique HR1, empêche l'interaction entre HR1 et HR2 et donc le repliement de la gp41 ce qui empêche la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire.

-L'inhibiteur du corécepteur CCR5 actuellement commercialisé est le maraviroc. L'utilisation de cette molécule nécessite la détermination préalable du tropisme des souches présentes chez un patient donné, les patients infectés par des souches à tropisme X4 ne pouvant bénéficier d'un traitement par maraviroc.

En plus de ces deux molécules commercialisées, le premier inhibiteur d'attachement (BMS-663068) a été récemment mis au point. Ce composé est une prodrogue administrée par voie orale. Son métabolite actif, se lie à la gp120 virale et inhibe l'attachement du virus au récepteur principal CD4. La sensibilité du VIH-1 à cette nouvelle molécule semble très variable en fonction des sous-types viraux.

-Inhibiteurs de l'intégrase

Les inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1 ont pour rôle de bloquer l'intégration de

l'ADN proviral dans l'ADN chromosomique de la cellule infectée et ainsi d'empêcher la réplication virale. Cette intégration est divisée en plusieurs étapes, chacune pouvant être bloquée indépendamment des autres : 1) formation du complexe enzyme-ADN viral, 2) préparation des extrémités 3' de l'ADN viral double brin par l'intégrase, 3) import du complexe de pré intégration du cytoplasme vers le noyau de la cellule infectée, 4) intégration de l'ADN viral dans l'ADN génomique (transfert de brin) et 5) réparation de l'ADN après intégration. Trois molécules appartenant à la famille des inhibiteurs sélectifs de transfert brins (STI, pour strand transfer inhibitors) ont été développées depuis quelques années : Le raltégravir et l'elvitegravir (de première génération) et plus récemment le dolutégravir (deuxième génération).

3. Résistance aux antirétroviraux

a. *Origine de la résistance aux antirétroviraux*

La résistance virale peut être définie comme la capacité du virus à se multiplier en présence d'une molécule antivirale à des concentrations qui inhibent la réplication d'un virus sensible. Elle résulte d'un compromis entre l'effet positif des mutations en présence de l'inhibiteur et l'effet négatif de ces mutations sur la fonction de l'enzyme ou de la cible antivirale [15, 16]. La sélection des mutations concerne les gènes codant les protéines cibles des antirétroviraux, la TI, la PR, la gp41, ou l'intégrase. Les protéines ainsi modifiées deviennent insensibles aux antirétroviraux concernés. L'apparition des mutations est liée au mécanisme de recombinaison et aux erreurs induites au hasard par la TI, avec en moyenne, l'introduction d'une mutation par virion produit. D'autres mécanismes impliquant des protéines accessoires Vif et Vpr interviendraient potentiellement dans la résistance aux antirétroviraux. En effet, ces protéines de régulation interviennent dans le processus de rétro-transcription de l'ARN viral et participent ainsi au maintien de l'intégrité du génome viral. Leur impact sur la résistance aux antirétroviraux *in vivo* fait l'objet de cette thèse.

Les mutations de résistance confèrent un avantage sélectif au virus en diminuant la sensibilité du virus aux antirétroviraux sans en empêcher la multiplication. Le haut degré de recombinaison du VIH-1 augmente encore la capacité d'émergence de variants porteurs de mutations de résistance. Ces phénomènes peuvent aboutir à un échec de traitement et peuvent être à l'origine de variants multi-résistants [17]. Ainsi l'antiviral n'est pas directement responsable des mutations mais exerce une sélection sur les populations de mutants préexistants. La capacité à sélectionner des virus résistants lorsque la réplication virale n'est

pas contrôlée peut être très différente selon les antirétroviraux, cette notion est communément appelée « barrière génétique d'un antirétroviral ». Cela comprend plusieurs notions combinant : (1) le nombre de changement nucléotidique nécessaire pour obtenir une mutation de résistance, (2) l'impact de cette mutation sur le niveau de sensibilité à l'antirétroviral, (3) l'impact de cette mutation sur la capacité répliquative virale ; l'ensemble conditionnant la vitesse de sélection des variants résistants.

On comprend ainsi tout l'intérêt de la trithérapie puisque qu'en augmentant le nombre de molécules, on diminue la probabilité qu'une souche puisse faire simultanément un nombre suffisant de mutations pour être résistant à l'ensemble des molécules incluses dans la combinaison. Cependant une même mutation peut conférer une résistance plus ou moins forte à plusieurs molécules d'une même classe : c'est la résistance croisée. C'est pourquoi une HAART doit comporter deux classes thérapeutiques différentes : le plus souvent 2 INTIs + 1 IP ou 2 INTIs + 1 INNTI. Cependant les derniers IPs mis sur le marché comme le darunavir par exemple, ont une barrière génétique souvent plus élevée que les IPs plus anciennes : il faut au virus plusieurs mutations pour le rendre résistant au darunavir alors qu'une seule pouvait suffire pour d'autres IPs (indinavir, nelfinavir,...), et cette sélection paraît plus lente.

La présence de souches résistantes parmi la quasi-espèce qui s'est développée dans l'organisme du patient, n'explique pas tout. Il est établi que même sous trithérapie efficace avec une charge virale plasmatique sous le seuil de détectabilité, une répllication résiduelle plus ou moins importante continue de se produire [18, 19]. L'une des raisons expliquant ce phénomène est que toutes les molécules ne peuvent pas pénétrer tous les compartiments de l'organisme à des concentrations efficaces [20]. Ces compartiments, « sanctuaires » pour le virus, peuvent représenter l'antichambre de la résistance où les concentrations suboptimales permettent la sélection plus ou moins rapide de variants qui accumuleront graduellement les mutations de résistance. Ces résistances conduiront à des souches de plus en plus aptes à répliquer en présence des molécules, jusqu'à l'obtention d'un profil génotypique de résistance suffisamment important pour atteindre un niveau de répllication conséquent et donc une charge virale plasmatique détectable et définir ainsi l'échec thérapeutique. Pendant ce processus dont la rapidité dépendra de la puissance des molécules utilisées, de leur pouvoir de diffusion, mais aussi de l'observance du patient et des interactions pharmacocinétiques, le réservoir proviral aura pu également s'enrichir de ces souches résistantes.

b. Résistance aux différentes classes antirétrovirales

-Résistance aux INTIs

La transcriptase inverse est un hétérodimère formé de deux sous unités (p66 et p51) comprenant respectivement 560 et 440 acides aminés. Alors que la sous-unité p51 a un rôle stabilisateur de la sous-unité p66, seule cette dernière est active. Elle a la forme d'une main ouverte, avec une gorge située entre les doigts, la paume et le pouce et où vient se loger la matrice d'ARN. Le site actif de polymérisation, situé au niveau de la paume, est formé d'un motif de quatre acides aminés (YMDD : tyrosine, méthionine, acide aspartique, acide aspartique) commun à d'autres polymérases. Les mutations de résistance peuvent être au site actif de polymérisation (M184V/I), au site de fixation des nucléosides naturels (dNTP) (K65R, Q151M) ou à distance (T215Y/F).

Pour les INTIs, deux mécanismes de résistance ont été identifiés [21]. Le premier concerne les mutations de résistance sélectionnées par les analogues de la thymidine que sont l'AZT et le d4T et qui sont appelées TAMs (thymidine analogue mutations). Leur présence sur le gène de la TI augmente la capacité de cette enzyme à exciser l'analogue terminateur de chaîne (la molécule antirétrovirale) venant d'être incorporé à l'ADN proviral en cours d'élongation : c'est la réaction de phosphorolyse. Cela consiste à détacher l'analogue par son phosphate en rattachant celui-ci à un accepteur externe pour former un complexe qui ne sera plus incorporable [22] (voir figure 2). Deux substrats sont susceptibles d'accepter ce phosphate : le pyrophosphate (PPi) produit lors de la synthèse d'ADN (voix minoritaire dite pyrophosphorolyse), et beaucoup plus fréquemment l'ATP (la phosphorolyse proprement dite) (figure 2). Les TAMs favorisent ces réactions. Elles sont huit et concernent six positions sur le gène de la TI : M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F et K219Q/E. Certaines études ont suggéré qu'elles pouvaient être séparées en deux profils distincts dits TAMs-1 et TAMs-2. La voie dite TAMs-1 comprend les mutations M41L, L210W, T215Y et occasionnellement la D67N alors que la voie dite TAMs-2 comprend la D67N, la K70R, la T215F et la 219E/Q [23]. Les mutations en position 67 et 70, situées au niveau des doigts sur la TI améliorent la flexibilité de l'enzyme [24, 25], tandis que la mutation en position 215 située dans la paume favorise la fixation de l'ATP [24, 26]. Ces changements facilitent ainsi la réaction de phosphorolyse. Bien que ces mutations ne soient sélectionnées que par l'AZT et le d4T, elles auront tout de même un impact sur l'efficacité des autres molécules de la classe : c'est la résistance croisée.

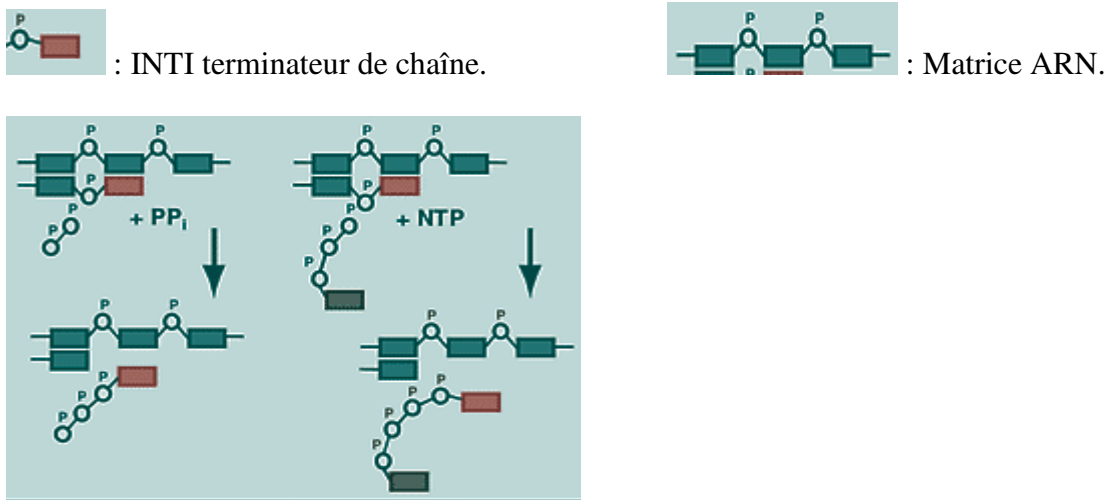


Figure 2. Représentation schématique des deux voies de la phosphorylation

Le deuxième mécanisme consiste à accroître la capacité de TI à discriminer les analogues terminateurs de chaîne. La TI incorpore alors beaucoup moins les terminateurs sans trop diminuer son affinité pour les analogues naturels. C'est la résistance par discrimination ou par perte d'affinité [27]. La mutation M184V confère *in vitro* un haut niveau de résistance au 3TC par ce mécanisme. L'incorporation du 3TC dans l'enzyme mutée est diminuée de 20 à 100 fois par rapport à son incorporation dans une enzyme sauvage. Cette diminution de l'incorporation est le résultat d'un encombrement stérique entre l'enzyme portant la M184V et le 3TC-TP. En effet, la chaîne latérale de la valine en position 184 empêche un positionnement correct du 3TC-TP pour la catalyse. Le mécanisme par perte d'affinité est également décrit pour d'autres mutations telles que K65R, L74V, Q151M et son complexe (A62V, V75I, F77L, F116Y). Elles sont situées dans le site de liaison des dNTP ou proche de celui-ci. La plupart de ces mutations diminue aussi plus ou moins la capacité répliquative des virus car l'incorporation des nucléosides naturels est également touchée.

Les molécules sélectionnant ces mutations sont les suivantes :

La didanosine (ddI) : en monothérapie elle sélectionne la L74V et plus rarement la K65R [28] [29]. Les virus portant un grand nombre de TAMs ont également montré un certain degré de résistance à la didanosine [30] [31]. Cependant, la résistance induite par les TAMs semble faible puisque des expériences réalisés *in vitro* montrent que l'excision de la didanosine induite par les TAMs est minimale, inférieure à celle induite pour les autres INTIs [32].

La 3TC et FTC : Ce sont les mutations M184I et M184V qui sont sélectionnée sous 3TC/FTC lorsque la charge virale dépasse les 200 copies/ml [33]. La mutation M184I apparaît la première et est remplacée par la M184V qui confère au virus une meilleure capacité répliquative que la M184I. Au cours d'un échec thérapeutique, l'absence de la M184I/V sur le génotype de résistance peut faire soupçonner une mauvaise observance du traitement. *In vitro*, la M184I/V conférerait aussi une certaine résistance à la ddI alors que des résultats cliniques supposent au contraire une resensibilisation [34]. *In vivo*, la M184V/I n'a d'impact sur l'abacavir que lorsqu'elle est associée à d'autres mutations. Sa présence sur le gène de la TI retarde l'émergence des TAMs [35]. Elle aurait un impact important sur la capacité répliquative du virus d'où une disparition rapide de la mutation lorsque que la molécule n'est plus dans le traitement [36]. L'équipe de Castagna montre que le maintien du 3TC seul, en présence de la M184V, favoriserait le maintien d'une charge virale plus basse qu'en l'absence de tout traitement [37]. Ces résultats s'expliqueraient par un effet fitness de la M184V ou une activité antivirale résiduelle de la 3TC. Une autre équipe a montré que dans le contexte d'un traitement inefficace le retrait de la 3TC aurait tendance à faire augmenter la charge virale malgré la présence de la M184V [38]. Ainsi l'utilisation du 3TC/FTC en présence de la M184V pourrait contribuer à contenir la réplication virale dans le cas où plus aucun traitement totalement efficace n'est envisageable. Enfin, une étude récente montre qu'en cas de traitement optimisé comprenant plusieurs molécules actives, le retrait du 3TC chez les patients infectés par un virus portant la M184V devrait être envisagée car il ne modifie pas l'efficacité du traitement antirétroviral [39].

L'abacavir (ABC) : Cette molécule sélectionne surtout la L74V mais aussi la K65R, Y115F et la M184V [40]. *In vitro*, la combinaison L74V+M184V augmenterait la susceptibilité aux analogues de la thymidine (AZT et d4T) et diminuerait l'efficacité des autres INTIs.

Le Tenofovir (TDF): la K65R est la mutation préférentiellement sélectionnée par cette molécule. Cette mutation impacte aussi l'activité de la 3TC, ABC et ddI. Sa prévalence reste faible en pratique clinique probablement à cause de l'effet négatif de cette mutation sur la réplication virale. Sa présence sur le gène de la TI semble également incompatible avec les TAMs et la L74V. La mutation K70E a également été très récemment associée au TDF mais elle est très rare en pratique clinique.

D'autres mutations de résistance ne peuvent être associées à un INTI en particulier. La mutation Q151M est la chef de file d'une série comportant quatre autres mutations : A62V, V75I, F77L et F116Y. Elles forment le complexe dit « MDR » (multi drug resistance) qui

provoque la résistance à tous les INTIs en épargnant cependant un peu le TDF et le 3TC. Cette mutation a été reportée essentiellement après des traitements comportant ddI+AZT ou ddI+d4T. Elle semble être facilement associée à la K65R peut être en alternative aux TAMs qui sont incompatibles avec cette dernière. Enfin la seule mutation qui ne soit pas une substitution mais une insertion est en position T69 : elle peut être observée après plusieurs lignes de traitement incluant des analogues de la thymidine. Sa présence, associée aux TAMs, confère une forte résistance à tous les INTIs.

-Résistance aux INNTIs

La résistance aux INNTIs est due à la sélection de mutations ponctuelles situées au niveau de leur site de fixation, la poche hydrophobe de la TI. Ces mutations sont situées dans deux régions distinctes (entre les codons 100 – 108 et 179 – 190) et sont communes aux deux INNTIs de première génération (névirapine et efavirenz) à quelques exceptions près et de deuxième génération (etravirine et rilpivirine). Récemment, une troisième position de résistance au résidu 138 de la TI a été récemment décrite comme étant impliquée dans la résistance aux INNTIs de deuxième génération (etravirine et rilpivirine).

Les mutations aux INNTIs de première génération confèrent une résistance croisée très forte. Les données disponibles suggèrent que des mutations ponctuelles comme la 103N sélectionnées pendant un traitement aux INNTIs de première génération, ont des effets limités sur la capacité virale mais confèrent des hauts niveaux de résistance et perdurent en l'absence de pression de la molécule [41]. Toutes ces données montrent l'inutilité de conserver cette classe en présence de mutations ou en l'absence de traitement suffisamment puissant pour maintenir la charge virale indétectable.

L'etravirine et plus récemment la rilpivirine sont les deux molécules de deuxième génération commercialisées. Ces deux molécules sont proches au niveau structural et partagent une moindre résistance croisée avec les composés de première génération. Alors que l'etravirine semble posséder une barrière génétique élevée, la rilpivirine sélectionnerait rapidement des mutations de résistance. Des études récentes de phase III chez des patients naïfs d'antirétroviraux (ECHO et THRIVE) ont comparé l'efficacité virologique d'une trithérapie comprenant 2 INTIs/efavirenz à une nouvelle trithérapie 2 INTIs/rilpivirine [9, 10]. Ces études montrent un pourcentage plus élevé d'échecs virologiques dans le bras rilpivirine (en association avec emtricitabine et ténofovir) par rapport au bras efavirenz (10% versus 6%). Dans ces études, la mutation E138K sélectionnée sous rilpivirine est fréquemment retrouvée avec la mutation M184I en cas d'échec virologique. Cette association a posé la

question d'une interaction entre la mutation E138K à la rilpivirine et la mutation M184I à l'emtricitabine. Ainsi, des expériences de mesure de l'activité de la TI *in vitro* ont montré que le mutant E138K/M184I posséderait une meilleure activité TI par rapport au mutant E138K/M184V [42]. D'autres études suggèrent que le mutant E138K/M184I développerait une résistance phénotypique plus élevée à la rilpivirine que le mutant E138K/M184V [43].

-Résistance aux inhibiteurs de protéase

La protéase du VIH-1 est l'enzyme responsable du clivage des polyprotéines précurseurs Gag et Gag-Pol lors de la maturation du virion, qui deviendront des protéines de structure et des enzymes de la particule virale [44]. La protéase du VIH est un homodimère composé de deux sous unités identiques de 99 acides aminés.

L'ensemble des IPs induit la sélection de mutations de résistance. Ces mutations sont principalement localisées dans la région du site de fixation du substrat de la protéase. Les changements conformationnels provoqués par ces mutations réduisent l'affinité de fixation entre l'enzyme et l'IP et/ou le substrat, conduisant à une activité réduite de la protéase et à une altération de la capacité répliquative virale. De façon générale, la résistance aux IPs est un phénomène progressif qui nécessite l'accumulation de plusieurs mutations. Par conséquent, la barrière génétique est élevée pour cette classe d'antirétroviraux. Sous la pression de sélection des IPs, on distingue deux types de mutations qui peuvent émerger : des mutations dites majeures ou primaires et des mutations dites mineures ou secondaires. Les mutations majeures comme les mutations D30N, G48V, I50L/V, V82A/F/L/S/T et I84V sont les premières à être sélectionnées et sont situées au niveau du site actif de l'enzyme. Une mutation majeure va changer la conformation du site actif de la protéase empêchant ainsi l'IP de s'y fixer [45]. Elles ont en général un effet délétère sur la répliquative du virus résistant [46-48]. Les mutations mineures surviennent secondairement et sont situées à l'extérieur du site actif. Ces mutations à elles seules ne sont pas responsables de la résistance mais, associées aux mutations majeures, augmentent le niveau de résistance et/ou permettent de compenser partiellement la capacité répliquative du virus. Alors que les mutations primaires sont assez spécifiques d'un inhibiteur donné, les mutations secondaires sont souvent communes aux différents IP. Cela explique en partie les problèmes de résistance croisée entre les molécules de cette classe.

-Résistance aux autres inhibiteurs

L'enfuvirtide ou T20 (Fuzeon®), inhibiteur de fusion est un polypeptide synthétique

dont la séquence correspond à la région HR2 de la gp41 et qui se fixe sur la région HR1 de cette même glycoprotéine. Les premières études *in vitro* ont mis en évidence le développement de mutations de résistance au niveau des trois codons 36, 37 et 38 [49] de cette région. Puis les études chez des patients en échec de T20 ont montré l'émergence de mutations sur un nombre plus large de positions: de l'acide aminé 38 à 45[50, 51].

En ce qui concerne la résistance aux antagonistes du CCR5 (Maraviroc), il a été montré que le VIH peut développer des résistances par sélection des mutations entraînant des changements phénotypiques et génotypiques (mutations dans la boucle V3 de la gp120) sans modification de tropisme du virus qui continue à utiliser le corécepteur CCR5 [52, 53]. Cependant les déterminants de résistance restent encore mal élucidés. Par ailleurs, il a été montré que les populations du virus à tropisme CXCR4, minoritaires et non détectées à l'instauration du traitement, pouvait émerger au cours du traitement par antagoniste de CCR5 [54].

Enfin, en ce qui concerne la résistance aux anti-intégrases, deux profils distincts comportant soit la mutation N155H soit la mutation Q148K/R/H associés à une ou plusieurs mutations secondaires sont décrits pour le raltégravir [55]. D'autres profils moins fréquents peuvent également être associés à la résistance [56]. Le profil Q148 semble plus fréquent et entraîne un très haut niveau de résistance. Le profil N155 est moins fréquent et entraîne également un haut niveau de résistance avec une altération de la capacité répliquative du virus. L'addition de mutations secondaires aux mutations primaires restaure en partie l'infectivité. En ce qui concerne l'elvitegravir, différents profils peuvent être sélectionnés, notamment E92Q ou N155H. Il existe une résistance croisée très importante entre raltégravir et elvitegravir. La barrière génétique de cette famille est faible et une seule mutation peut induire d'emblée une résistance complète à ces molécules. Il convient donc d'être très vigilant et de n'autoriser aucune répllication résiduelle sous traitement comportant un inhibiteur d'intégrase de première génération. Un nouvel inhibiteur d'intégrase, le dolutégravir (DTG, GSK-1349572) est actuellement en cours d'étude. Les résultats préliminaires de l'étude VIKING (évaluant ce nouvel inhibiteur) obtenus chez des patients prétraités en échec avec une résistance génotypique à au moins deux classes d'antirétroviraux et au raltégravir (RAL) ont montré une efficacité après 11 jours de traitement. L'efficacité antivirale est cependant réduite chez les patients porteurs d'un virus avec le profil Q148, comparé aux virus avec le profil N155H ou Y143C. Les résultats à 24 semaines de cette étude permettront de mieux conclure sur l'efficacité du dolutégravir chez les patients infectés par un virus résistant au raltégravir

(Eron, abstract MOAB010 IAC 2010).

4. Evaluation de la résistance

a. *Les tests génotypiques*

Ces tests consistent à rechercher par séquençage, dans le gène correspondant à la cible de l'antirétroviral, des mutations connues comme associées à la résistance. La technique de référence utilisée est le séquençage direct des gènes des protéines cibles des antirétroviraux afin de déterminer si les codons sont de type sauvage ou muté par rapport à une séquence de référence. Les avantages de cette technique sont sa rapidité d'exécution, sa reproductibilité et sa standardisation (évalués par des contrôles de qualité nationaux et internationaux). L'ARN viral plasmatique extrait est d'abord rétrotranscrit en ADN puis les gènes de la TI et de la protéase, de l'intégrase, de la boucle V3 ou de la gp41 sont amplifiés spécifiquement par PCR. La sensibilité correspond à une limite inférieure de détection qui varie actuellement entre 20 et 50 copies/ml de charge virale plasmatique dans le prélèvement initial. Les gènes sont alors séquencés directement à partir du produit de PCR au moyen de séquenceurs automatiques. Les séquences ainsi obtenues sont comparées à une séquence de référence, dite « sauvage », dénuée de mutations de résistance. La méthode consiste alors à identifier les substitutions ou insertions d'acides aminés impliquées dans la résistance aux antirétroviraux et l'interprétation s'appuie sur des règles ou algorithmes d'interprétation empiriques. La construction d'algorithmes d'interprétation, mis à jour régulièrement, permet de traduire le profil de mutation observé en « sensible », « résistance possible » ou « résistance » pour chaque molécule. On peut également établir le nombre de molécules encore actives dans une combinaison thérapeutique : c'est le GSS (genotypic sensitivity score) ou score de sensibilité génotypique.

Un point faible de ces tests est qu'ils ne tiennent pas compte de l'ensemble de la séquence génétique du virus et ne se réfèrent qu'à un certain nombre de mutations dont l'impact a pu être démontré *in vivo* via des essais cliniques. De plus, les mutations sont définies par rapport à une séquence VIH-1 consensus de sous-type B, majoritaire en France, aux USA et dans les pays occidentaux mais qui est rare en Afrique. De plus, cette technique standard de détermination du génotype ne permet d'analyser que la population majoritaire lorsqu'elle représente au moins 15 à 20% de la population virale totale circulante dans le plasma. Des approches différentes pour détecter des variants minoritaires, comme clonage moléculaire ou le pyroséquençage sont actuellement réservées aux protocoles de recherche.

b. Les tests phénotypiques

Ces tests consistent à évaluer le comportement du virus en culture cellulaire en présence d'un antirétroviral et de le comparer à une souche sauvage de référence. Le mode d'expression est la concentration inhibitrice 50 ou 90% (CI₅₀ ou CI₉₀), concentration d'antirétroviral réduisant la production du virus en culture cellulaire respectivement de 50% ou 90%. Le test phénotypique de référence utilise le virus isolé à partir de lymphocytes de sang périphérique (test de référence de l'AC11- ANRS). Il existe également le test RVA (pour « *recombinant virus assay* ») [57] : un virus VIH-1 artificiel est produit par l'insertion de la région du gène *pol* du virus du patient dans le génome d'un virus adapté à la croissance sur lignée cellulaire. Ce virus recombinant est cultivé en présence d'une concentration croissante d'antirétroviraux et le taux de réplication *in vitro* est mesuré. En utilisant ces techniques, le phénotypage a l'avantage de fournir des résultats quantitatifs (CI₅₀) et permet de prendre en compte toutes les mutations présentes *in vivo* sur les gènes étudiés. Cependant cette méthode est longue, complexe et coûteuse. Pour ces raisons, ces tests sont surtout utilisés dans le cadre d'essais thérapeutiques, pour l'étude de nouveaux antirétroviraux en particulier.

Différents autres protocoles de tests phénotypiques sont mis au point. Dans notre laboratoire, dans le cadre de protocoles de recherche, les tests phénotypiques sont réalisés sur cellules Hela P4 (figure 3). Ces cellules expriment le récepteur CD4 et comportent une copie intégrée du gène *LacZ* sous le contrôle du « *Long Terminal Repeat* » *LTR* viral. L'expression de *LacZ* est induite par la protéine transactivatrice Tat du VIH-1. Cette technique permet de quantifier l'infectiosité au cours d'un cycle de réplication virale. La révélation de l'infection sera réalisée 44h après infection par la mesure de l'activité β -galactosidase révélée par l'hydrolyse du substrat « chlorophenol red- β -D-galactopyranoside » ou CPRG (mesure de l'absorbance à 575 nm). La caractérisation phénotypique de résistance aux différents antirétroviraux est réalisée en utilisant ce système d'infection cellulaire en présence de concentrations croissantes de l'antiviral testé.

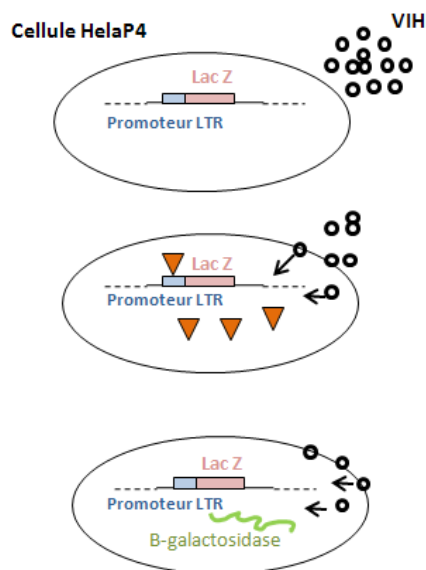


Figure 3: Représentation schématique de la mesure de l'infectivité virale dans les cellules HeLa P4.

c. Utilisation des tests de résistance.

Lors d'un échec thérapeutique, l'utilité des tests génotypiques de résistance pour prescrire une nouvelle combinaison antirétrovirale a été démontrée, des points de vue virologique et clinique, par plusieurs études [58-60]. Les recommandations françaises préconisent l'utilisation des tests génotypiques de résistance dans des situations cliniques précises au cours de suivi des adultes et enfants infectés par le VIH (Yeni 2010). La principale indication est la prise en charge des échecs thérapeutique : un test génotypique doit être effectué en cas d'échec virologique établi alors que le patient est sous traitement antirétroviral et que la décision d'un changement de traitement est envisagée. D'autres situations cliniques nécessitent la réalisation d'un génotype, par exemple lors de la découverte d'une séropositivité VIH, avant l'initiation d'un traitement antirétroviral ou en cas de grossesse.

IV. Rôle des protéines accessoires du VIH-1 Vif et Vpr dans la variabilité génétique

1. La protéine Vif du VIH-1

a. Généralités

La protéine Vif est une protéine de 198 acides aminés de 23 kDa, codée par le gène *vif* dont le cadre de lecture chevauche celui de l'*intégrase* et de *vpr*, respectivement en 5' et 3'. La protéine Vif est exprimée à la phase tardive du cycle viral. Vif est indispensable à la

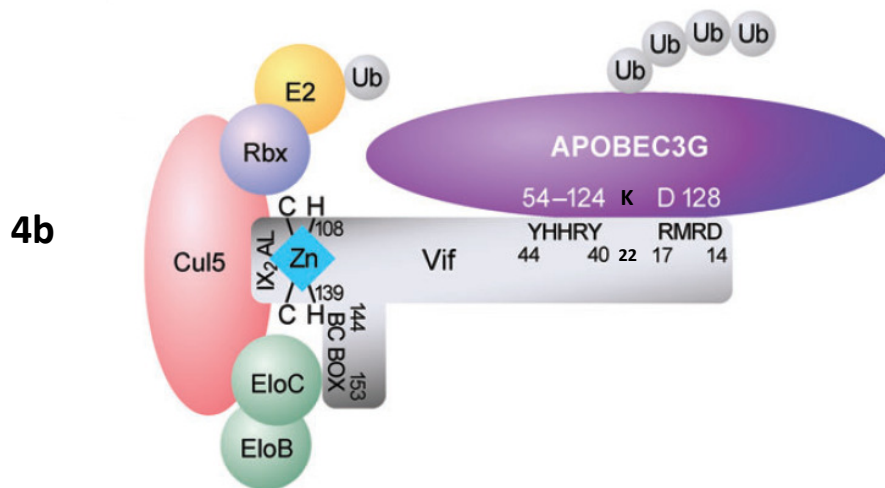
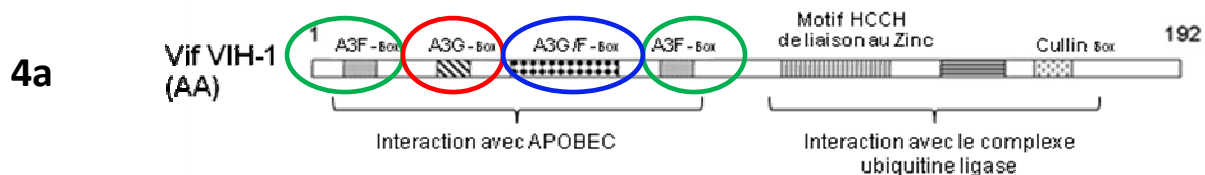
multiplication virale *in vivo* chez l'hôte infecté. Son rôle est resté longtemps inconnu jusqu'à la découverte de APOBEC3G en 2002 [61]. APOBEC3G ou A3G (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like editing complex 3) appartient à la famille des cytidines désaminases, enzymes cellulaires connues jusqu'alors pour leur fonction de désamination des cytidines en uridines (APOBEC1). L'équipe de Sheehy [61] a montré que A3G agissait comme facteur de restriction du VIH-1 et qu'en retour, Vif contrecarrait les activités antirétrovirales de cette enzyme. Après l'identification de A3G, les recherches se sont accélérées et l'effet antirétroviral de cette protéine ainsi que les mécanismes de neutralisation de cette protéine par Vif ont été rapidement caractérisés. D'autres protéines APOBEC3 ont été identifiées par la suite comme facteur de restriction du VIH-1 chez l'homme (APOBEC3B, APOBEC3DE, APOBEC3F, APOBEC3H). Parmi eux, APOBEC3G (A3G) et APOBEC3F (A3F) sont les principaux acteurs de restriction.

b. Mécanismes d'action

Dans la dernière étape du cycle viral, la protéine Vif contrecarre principalement les cytidines désaminases A3G et A3F en empêchant leur incorporation dans les virions et prévient ainsi leur activité de restriction lors de l'infection du cycle suivant. Pour cela, Vif recrute d'une part les protéines A3G et A3F et d'autre part un complexe protéique d'Ubiquitine ligase E3 (cullin5-elonginB-ElonginC). Vif induit alors une polyubiquitination des protéines A3G et A3F et il s'en suit leur dégradation par le protéasome [62].

Différents domaines dans la partie N-terminale de Vif sont impliqués dans la reconnaissance spécifique des protéines APOBEC3 [63-66]. Certains de ces domaines permettent une interaction spécifique avec l'une ou l'autre des enzymes A3G ou A3F alors que d'autres domaines interagissent avec les deux enzymes (figure 4a et 4b). Certains résidus au sein de ces domaines doivent être conservés pour que la fonction de Vif reste intacte (figure 4c). Ainsi, la mutation K22E altère totalement la capacité de Vif à contrecarrer A3G et à l'inverse, la mutation W11R altère la capacité de Vif à contrecarrer A3F [63].

D'autre part, l'interaction de Vif et de l'ubiquitine ligase E3 se fait au niveau de motifs conservés dans la partie C-terminale de Vif (figure 4a et 4b).



4c

Domaines d'interaction de Vif avec A3G/F	Position sur la protéine	Acides aminés conservés	Mutations décrites altérant l'interaction de Vif avec A3G et/ou A3F
A3F-box : Interagit avec A3F	aa 11-17 aa 74-79	$W^{11}_X D R M R^{17}$ $T^{74} G E R_X W^{79}$	W11R, T74A, E76A, R77A, W79A
A3G-box : Interagit avec A3G	aa 22-44	$K^{22}_X Y R H H Y^{44}$	K22E, Y40A, H43A
A3G/F-box : Interagit avec A3G et A3F	aa 55-72	$V^{55}_X I P L_{X4} L_{X\Phi X2} Y W_X L^{72}$	P58A, L59S, Y69A, W70A

Figure 4 : La protéine Vif contrecarre les voies antivirales APOBEC3 a) Représentation schématique des domaines fonctionnels de la protéine Vif du VIH-1. b) Représentation schématique de la polyubiquitination d'APOBEC3G induite par l'ubiquitine ligase E3 (cullin5-elonginB-ElonginC), recrutée par Vif. (d'après Chiu et al.2008) [67]. c) Domaines d'interaction de Vif avec A3G et A3F.

Mécanismes moléculaires de l'action antivirale d'APOBEC3G

Plusieurs mécanismes moléculaires de restriction antirétrovirale des enzymes A3G et A3F ont été décrits : le premier, qui sera développé dans la suite du chapitre, est la conséquence de l'activité de désamination de ces enzymes ; d'autres mécanismes ont été décrits tel que l'inhibition de l'élongation de la rétrotranscription [68] (figure 5). En l'absence

de Vif, les enzymes cellulaires A3G et A3F sont incorporées dans la particule virale dans les dernières étapes du cycle viral, ce qui permettra d'exercer leur activité de restriction au cycle d'infection suivant. Au cours de l'infection des cellules cibles, ces enzymes catalysent la désamination de cytidines (C) en uridines (U) sur le premier brin synthétisé (de polarité négative) après rétrotranscription de l'ARN viral [69]. Ceci aboutit, lors de la copie du deuxième brin d'ADN à des mutations de Guanidine (G) vers Adénine (A) dans le brin positif du VIH-1. Le taux élevé de mutations de (G) vers (A), définit l'« hypermutation » du génome viral. Ces mutations se réalisent préférentiellement dans un contexte nucléotidique particulier où la base mutée est influencée par le nucléotide en 3' : A3G induit préférentiellement des mutations dans le contexte « GG » vers « AG », A3F dans le contexte « GA » vers « AA ». Le virus est alors, dans la grande majorité des cas, non viable par apparition de codon faux sens ou de codons stop. L'ADN hypermuté subira deux destinées. Une partie sera reconnue par les enzymes cellulaires (uracyl DNA glycosylases et endonucléases), sera clivée et dégradée et ne sera donc pas intégrée dans le génome cellulaire. Une autre partie échappe à la dégradation et s'intégrera dans l'ADN cellulaire. Dans la majorité des cas, le taux très élevé de mutations empêchera alors la synthèse de protéines virales fonctionnelles et le cycle viral sera arrêté ([67] pour revue). Cependant, il a été démontré que les mutations G-ver-A induites par les protéines APOBEC3 peuvent se faire à un taux plus faible, n'atteignant pas le seuil d'extinction viral [70].

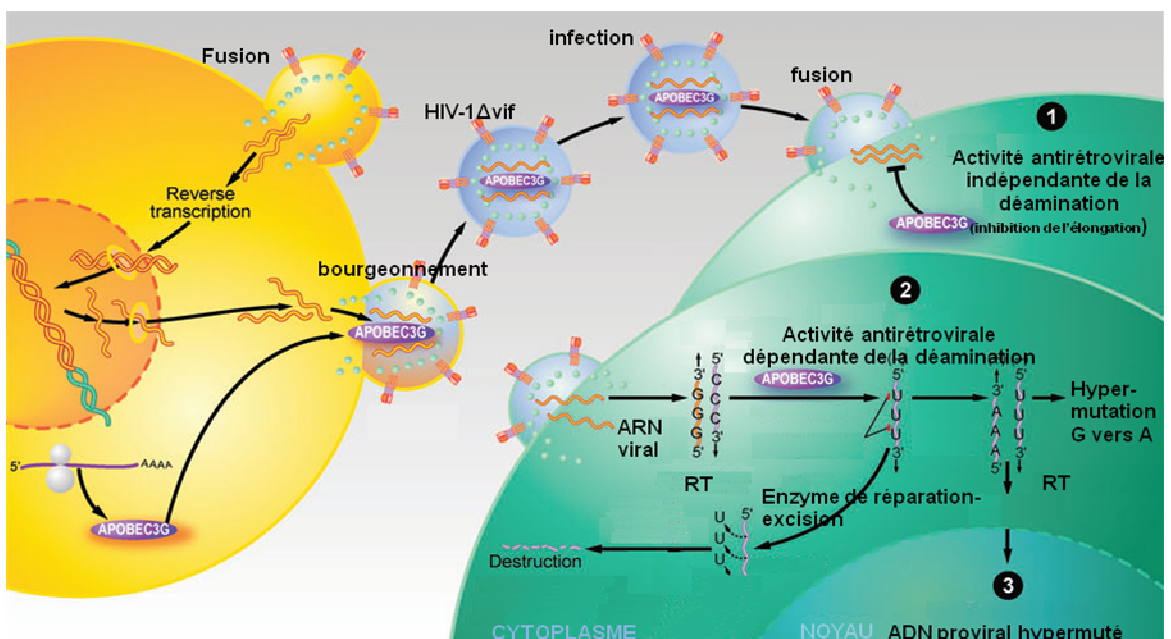


Figure 5 : Activités antivirales d'A3G incorporé dans les virions (d'après Chiu et al.2008) [67].

c. Fonctions de Vif et spécificité cellulaire

En culture cellulaire, on distingue deux types de cellules en ce qui concerne leur permmissivité vis-à-vis des virus dépourvus du gène *vif* : les cellules dites restrictives ou « non permmissives » (lymphocytes T et certaines lignées lymphocytaires MT-2 ou CEM par exemple) dans lesquelles le virus VIH-1 dépourvu du gène *vif* (VIH-1 Δ vif) est incapable de se répliquer (figure 6a) et les cellules dites « permmissives » (par exemple certaines lignées lymphocytaires : CEM-SS, Sup-T1) dans lesquelles le virus VIH-1 Δ vif se réplique normalement (figure 6b). Les virions produits en l'absence de Vif dans une cellule « non permmissive » ne présentent pas de pouvoir infectieux lors de l'infection d'une cellule cible. Les travaux de Sheehey [71] a montré que les cellules permmissives n'exprimaient pas le facteur de restriction A3G alors que les cellules non permmissives (CEM) exprimaient A3G. Dans les cellules non permmissives infectées par un virus VIH-1 Δ vif, les nouveaux virions produits encapsident A3G entraînant une hypermutation du génome viral lors de l'infection de la cellule cible et l'arrêt du cycle viral (figure 6b).

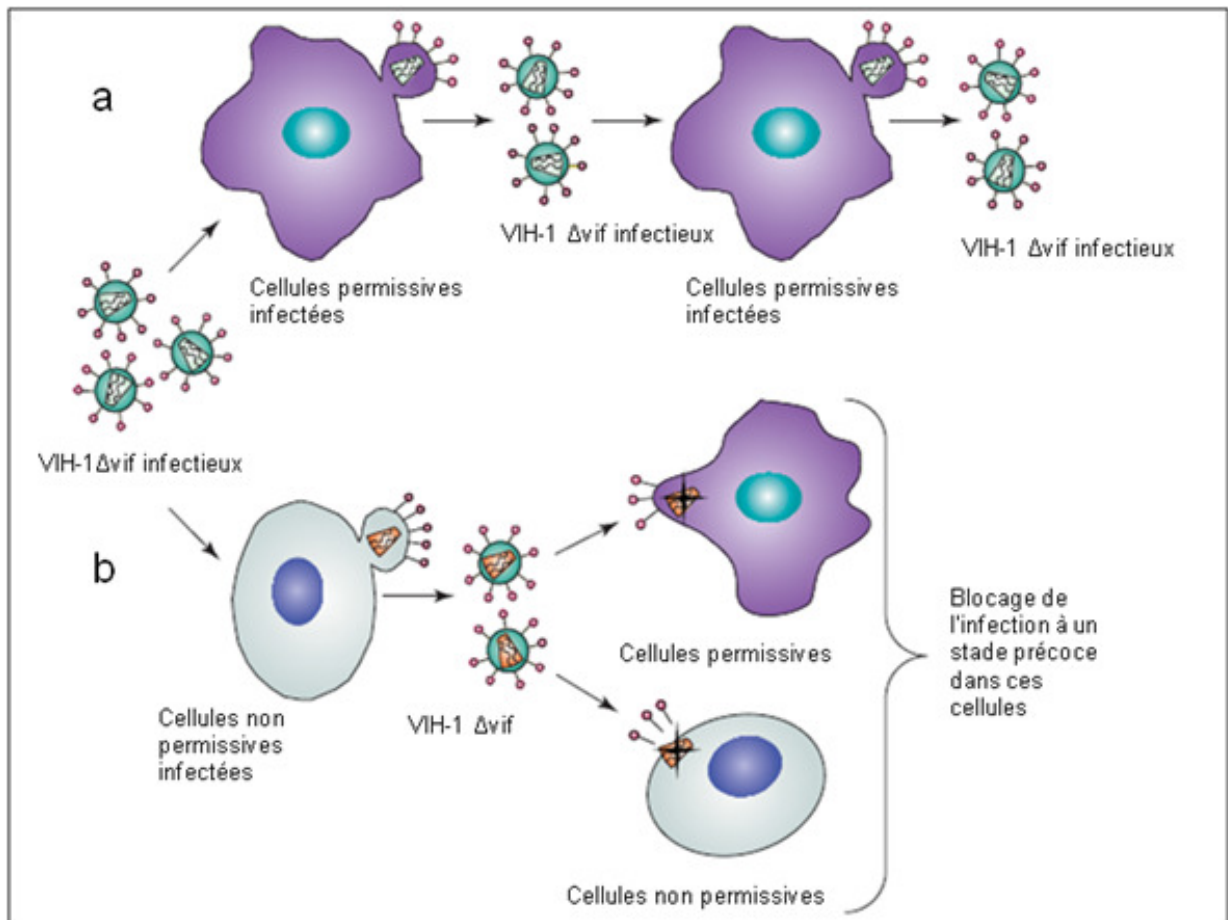


Figure 6 : Fonctions de Vif et spécificité cellulaire. (d'après K.Rose et al. 2004) [62]

In vivo, les cellules naturellement infectées par le VIH (lymphocytes T et macrophages) sont du type « non permissives ». Dans ces cellules, l'expression d'A3G et A3F est responsable de la survenue d'un grand nombre de mutations G-vers-A dans le génome proviral contribuant ainsi à la diversité virale (voir paragraphe « Implication des protéines Vif et Vpr du VIH-1 dans la variabilité génétique du VIH »).

d. Rôle de l'interaction Vif-APOBEC3 dans la variabilité génétique virale

Plusieurs arguments sont en faveur de l'implication des protéines APOBEC3 dans la diversité génétique du VIH-1. Il a été démontré qu'A3G à doses physiologiques pouvait induire des mutations subléthales *in vitro*, ce qui augmenterait la variabilité génétique sans induire une extinction virale. En effet, les virus mutés portant des mutations G-vers-A dans des contextes de désamination d'A3G étaient capables de produire des « progénitures » virales viables capables d'infecter de nouvelles cellules [70]. De même, *in vivo*, des séquences de VIH-1 portant des empreintes génétiques de désamination sont détectées dans les provirus VIH-1 de patients à différents étapes de la maladie [72-75]. Les mutations engendrées peuvent atteindre un nombre de 700 par cycle [76]. Parmi les hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène *in vivo*, l'absence de neutralisation absolue d'APOBEC3 par Vif semble être la plus plausible chez les patients infectés par le VIH-1. L'équipe de V. Simon a montré que des variants de Vif ayant une activité anti-A3G et anti-A3F suboptimale étaient fréquemment retrouvés dans les lymphocytes de patients infectés par le VIH-1 [63]. Le blocage des protéines A3G et A3F étant incomplet, celles-ci seraient incorporées dans les virions et il en résulterait alors une augmentation du taux de mutation de type G vers A. Ce mécanisme pourrait être mis en relation avec la composition en nucléotides riche en A du génome du VIH-1 [77].

L'implication probable des protéines APOBEC3 dans la diversité du VIH-1 *in vivo* a posé la question du rôle éventuel de ces enzymes dans l'émergence des mutations de résistance aux antirétroviraux. Les hypermutations de type G vers A pourraient accélérer l'apparition de mutation de résistance, notamment en augmentant la quantité de variants présentant les mutations de résistance avant l'instauration du traitement antirétroviral. L'équipe de V. Simon [78] a confirmé cette hypothèse *in vitro* concernant l'apparition de la mutation M184I avant et après traitement par le 2'-deoxy-3'-thiacytidine (3TC). Les variants de VIH-1 échappant au 3TC présentent une mutation au niveau de l'acide aminé 184 Méthionine (ATG) du gène de la

TI. Sous 3TC, la première mutation de résistance qui apparaît à ce niveau est la mutation 184 Isoleucine ou M184I (ATA), correspondant à une mutation de type G vers A, possible conséquence de désamination par A3G. L'équipe de V. Simon a réalisé des infections virales par des virus VIH-1 ayant une protéine Vif activité anti-A3G altérée (mutation Vif E45G) dans des cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC). Les auteurs ont étudié le taux de mutation G vers A dans les virions produits et ont observé qu'en dehors de toute exposition antirétrovirale, environ 1/3 des virions produits sont porteurs de la mutation de résistance M184I. De plus, la co-infection de lymphocytes par des virus sauvages et des virus hypermutés, provenant de l'infection par le VIH-1 Vif E45G permettait, même en présence d'une forte concentration de 3TC, l'émergence d'un variant viral résistant alors que dans ces mêmes conditions, le VIH-1 sauvage ne se réplique pas. Les auteurs ont montré que le variant résistant à une forte concentration de 3TC a pu émerger par recombinaison entre un virus hypermuté (ayant la M184I) et un virus sauvage [78]. Ces résultats montrent ainsi que dans certaines conditions *in vitro*, l'émergence de mutations de résistance peut être médiée par les protéines APOBEC.

Ainsi, il existe plusieurs mutations de résistance qui nécessitent des substitutions de type G vers A (22% de l'ensemble des mutations de résistance) [79] et qui peuvent potentiellement résulter de l'activité de A3G ou A3F (tableau 1).

Protéase	Transcriptase inverse	Intégrase	Enveloppe
V11I	M41L	E138K	G36S/D
G16E	D67N	G163R	
D30N	E138K		
V32I	M184I		
M36I	G190E/S		
M46I	M230L		
G73S			

Tableau 1 : mutations de résistance potentiellement induites par A3G ou A3F

2. La protéine Vpr du VIH-1

a. Généralités

La protéine Vpr est une protéine de 96 acides aminés de 14 kDa, codée par le gène *vpr*. Ce gène, dont le cadre de lecture chevauche celui de *vif* et de *tat* en 5' et 3' respectivement, est très conservé parmi les différents sous-types viraux du VIH-1. Vpr est exprimée tardivement au

cours d'un cycle viral et est incorporée dans les virions bourgeonnant des cellules infectées en interagissant avec le domaine p6 C-terminal du précurseur Pr55 codé par le gène *gag*.

Sur le plan structural, différents domaines de Vpr ont été mis en évidence grâce à des prédictions informatiques et à des études en résonance magnétique nucléaire (RMN) [80-82]. Ainsi, Vpr présente une région amino-terminale flexible suivie de trois hélices alpha et enfin une région carboxy-terminale flexible (figure 7). L'hélice alpha 1 est localisée entre l'acide aminé 17 et 33, une deuxième hélice alpha entre l'acide aminé 38 et 50 et une troisième hélice alpha se situe en aval, entre les acides aminés 53 et 83[83]. Des corrélations « structure-fonction » ont été déterminées par l'analyse fonctionnelle de certains mutants du gène *vpr* [84-87].

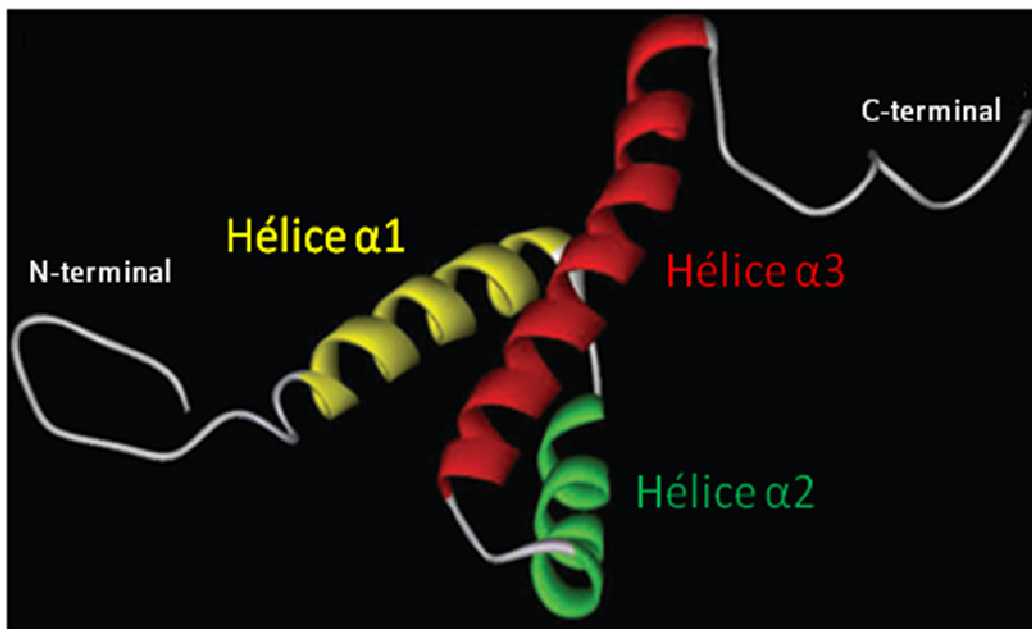


Figure 7 : Représentation tridimensionnelle de Vpr. Trois hélices alpha sont identifiées : une hélice alpha 1 est ainsi localisée dans la région amino-terminale entre l'acide aminé 17 et 33, une deuxième hélice alpha entre l'acide aminé 38 et 50 et une troisième hélice alpha se situe en aval, entre les acides aminés 53 et 78 (d'après Bizhan Romani and Susan Engelbrecht, 2009, *J Gen Virol*)

b. fonctions de Vpr

- *Modulation du taux de mutation viral : interaction avec la forme nucléaire de l'UNG*

La protéine Vpr est incorporée dans les particules virales bourgeonnant des cellules infectées et sa présence dans les particules est requise lors des étapes précoces de l'infection (figure 8). Les travaux du groupe de Louis Mansky ont montré que la présence de Vpr au sein du complexe de rétro-transcription réduisait le taux de mutation virale lors de la rétro-

transcription [88, 89]. Cet effet est particulièrement mis en évidence lors de l'infection de macrophages : en effet, le taux de mutations du VIH-1, mesuré au cours d'un cycle unique de réplication, est 16 à 18 fois inférieur à celui mesuré pour un virus dépourvu du gène *vpr* [87]. Les résultats rapportés dans l'équipe de S. Benichou ont montré que cette activité est liée à l'interaction directe de Vpr avec la forme nucléaire de l'« Uracile DNA Glycosylase » UNG (UNG2) [87, 90], enzyme de réparation de l'ADN dont la fonction est d'assurer l'élimination des bases uraciles présentes dans l'ADN, incorporées par erreur ou résultant de la désamination de la cytosine par les enzymes de restriction virale APOBEC3. Récemment, cette même équipe a montré que l'activité de modulation du taux de mutation virale induite par l'UNG-2 est indépendante de son activité catalytique et serait liée à son interaction avec un complexe RPA (pour « replication protein A ») ; ce complexe étant également impliqué dans la réparation de l'ADN [91].

- *Importation du VIH-1 dans le noyau*

L'import nucléaire du complexe de préintégration (PIC) est constitué des ARN génomiques viraux et de protéines virales : la protéine de matrice MA (ou p17) l'intégrase virale (IN) et Vpr ainsi que de protéines cellulaires [92-94]. Des séquences de localisation nucléaire (NLS) ont été reconnues dans IN et MA suggérant que ces protéines seraient responsables (du moins en partie) de l'adressage nucléaire du PIC, mais leur affinité pour la kariophérine alpha apparaît faible. La protéine virale Vpr ne possède pas de motif canonique de type NLS, mais possède une forte affinité pour l'enveloppe nucléaire [95] résultant de sa capacité à interagir avec la nucléopore hCG1, constituant du pore nucléaire (NPC). Cette interaction est responsable de l'ancrage de Vpr au NPC, et assurerait le recrutement du PIC à l'enveloppe nucléaire pour permettre ensuite sa translocation dans le noyau. Cette fonction de Vpr autoriserait donc l'infection productive d'un grand nombre de cibles cellulaires, et notamment les macrophages.

- *Autres fonctions de Vpr*

Une induction transcriptionnelle de Vpr sur le LTR du VIH-1, ainsi que sur d'autres promoteurs, avait été rapportée dès 1990 [96-98]. Cette induction est modérée, se traduisant par une multiplication d'un facteur 2 à 3 de l'activité de ces promoteurs. Elle est due à une interaction entre Vpr et certains facteurs de transcription (Sp1 : stabilisation des complexes promoteurs, p300 et TFIIB) [96, 98, 99]. De plus, il a été démontré que Vpr transactive les

promoteurs contenant les « glucocorticoid response elements » (GRE) et jouerait un rôle dans l'inflammation au cours de l'infection par le VIH [100].

Vpr est également capable d'induire un blocage du cycle cellulaire en phase G2 [101-103], empêchant ainsi la prolifération des cellules infectées. L'arrêt en G2 placerait le virus dans un contexte transcriptionnel favorable, lui permettant d'optimiser son expression avant la mort cellulaire. Les domaines de la protéine impliqués dans cette fonction se situent à son extrémité carboxy-terminale, mais d'autres régions semblent intervenir puisque certaines mutations ponctuelles localisées à l'extrémité amino-terminale abolissent également cette fonction de Vpr [85]. Physiologiquement, le changement de phase au cours d'un cycle cellulaire s'initie grâce à des phénomènes de phosphorylation de protéines cibles de kinases cellulaires (dépendantes de cyclines). Les mécanismes moléculaires impliqués dans le blocage du cycle cellulaire par Vpr ont fait l'objet de nombreuses études. Certaines études ont montré que Vpr inhibait directement l'activité d'une phosphatase CDC25 impliquée dans l'activation d'une cycline responsable de l'arrêt du cycle cellulaire. Ce mécanisme d'action ne semble pas être le seul responsable du blocage du cycle cellulaire : d'autres études montrent que Vpr peut détourner la machinerie cellulaire d'ubiquitination en recrutant DCAF1 (DDB1- and CUL4-associated factor 1), protéine adaptatrice de l'ubiquitine ligase Cul4A. Puisque ce complexe est impliqué dans la dégradation par le protéasome, il a été suggéré que Vpr induise la dégradation d'une protéine (encore non connue) indispensable à la transition de la phase G2 vers la mitose [104].

L'induction des processus apoptotiques par Vpr a fait l'objet de nombreux travaux [105-108]. Un effet pro-apoptotique est démontré sur lignées lymphoïdes T et sur des lymphocytes primaires, que ce soit après expression de la seule protéine, ou dans le contexte de l'infection provirale [107]. Vpr induit une perméabilité de la membrane mitochondriale en interagissant avec un complexe de perméabilité membranaire (« permeability transition pore complex ») et fait également intervenir d'autres protéines telles qu'un translocateur membranaire mitochondrial (adenine nucleotide translocator) et des protéines pro-apoptotiques membres de la famille BCL-2. Le domaine de Vpr impliqué dans l'apoptose semble se situer dans sa partie carboxy-terminale.

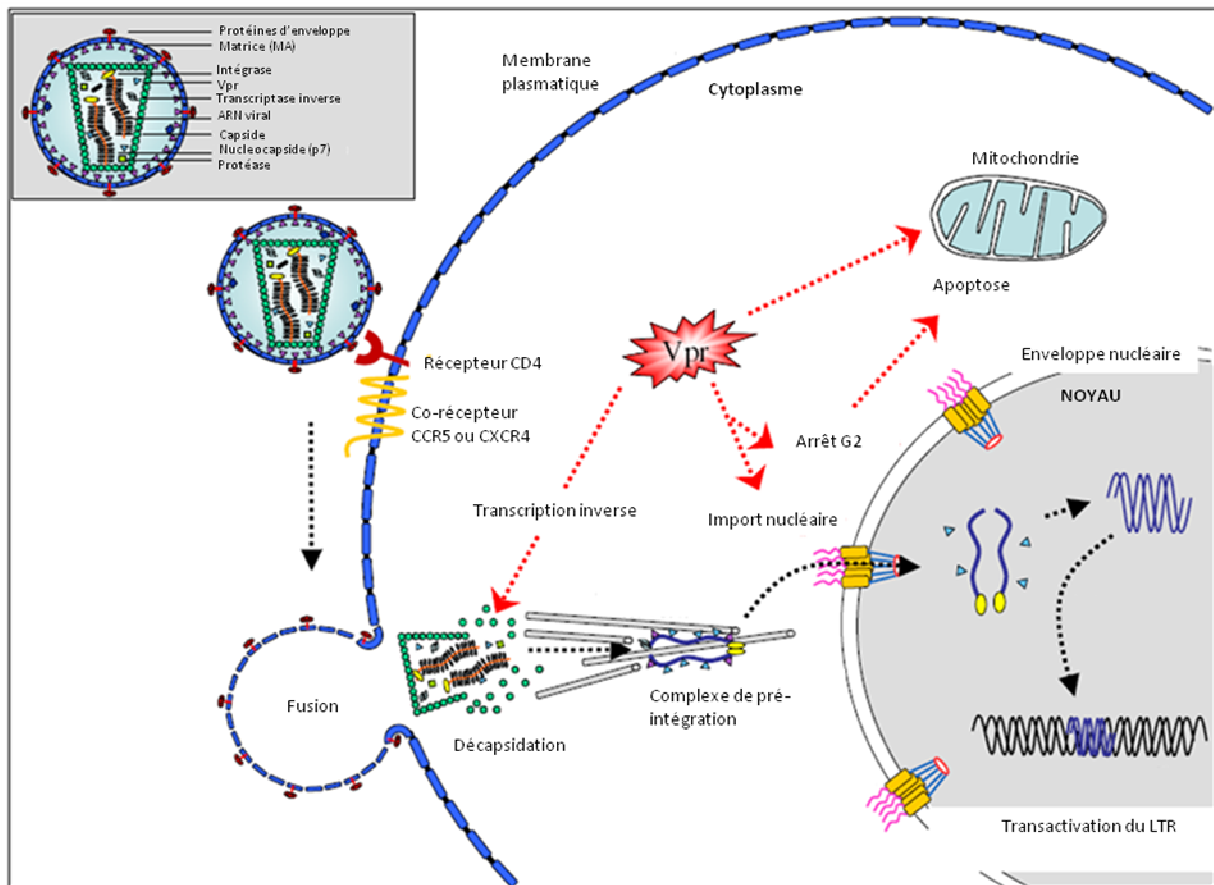


Figure 8 : Représentation schématique des principaux rôles de Vpr du VIH au cours d'un cycle viral (d'après « Import nucléaire du matériel génétique du VIH-1 » G.Jacquot, S. Benichou).

c. Rôle de Vpr dans la variabilité génétique virale

La TI du VIH-1 est une enzyme peu fidèle introduisant environ une erreur tous les 10000 nucléotides copiés au cours de la rétro-transcription. Celle-ci est initiée dans le « core » viral dans les étapes précoces du cycle viral, au sein d'un complexe nucléoprotéique comprenant outre le génome viral et les enzymes virales essentielles à la réplication virale (RT, protéase, intégrase), la protéine virale Vpr et certaines protéines de l'hôte telle que l'UNG2. Plusieurs études ont montré que le recrutement de l'UNG-2 par Vpr est corrélé à la capacité de Vpr à moduler le taux de mutation viral. En effet, l'accès de l'UNG2 au sein du complexe de rétrotranscription lors de la synthèse de l'ADN viral [87, 88] va limiter le taux d'erreurs induites par la RT du VIH-1. Alors que les premiers travaux suggéraient que la modulation du taux de mutation viral était la conséquence de l'activité catalytique de l'enzyme [87], une étude récente montre que cette action est liée à son interaction avec un complexe RPA (pour

« replication protein A ») ; ce complexe étant également impliqué dans la réparation de l'ADN [91].

Le rôle de Vpr dans la fidélité de la rétrotranscription a posé la question de son implication dans la variabilité génétique virale *in vivo*. En effet, il a été montré que des virus mutés dans Vpr (VprW54R) n'interagissent plus avec l'UNG-2. L'effet de cette mutation sur le taux de mutation du VIH-1 est alors exacerbé, puisqu'il est 16-18 fois supérieur à celui d'un virus sauvage dans les macrophages [87]. Ainsi certains variants de Vpr ont la capacité d'augmenter le niveau de variabilité génétique virale. En modulant le taux de mutation virale, le polymorphisme de *vpr* pourrait influencer la variabilité génétique virale *in vivo*. Etant donné l'étroite relation existant entre le taux de variabilité génétique et la vitesse d'apparition de mutation de résistance, il paraît possible que certains mutants de Vpr puissent accélérer l'apparition de mutation de résistance dans un contexte de traitement antirétroviral. L'impact de ce polymorphisme n'a cependant pas été étudié dans la littérature et fera l'objet d'une partie de cette thèse.

OBJECTIFS

Les protéines de régulation Vif et Vpr du VIH-1 interviennent dans le processus de rétro-transcription de l'ARN viral et participent ainsi probablement à la variabilité génétique virale. Le VIH-1 se caractérise par une diversité génétique importante, résultant de phénomènes de recombinaison du génome viral ainsi que du faible niveau de fidélité de la TI, enzyme virale permettant la réalisation du processus de rétro-transcription et la synthèse de l'ADN viral. Cette diversité génétique observée au cours de l'évolution de l'infection est notamment responsable des mécanismes d'échappement aux thérapeutiques antirétrovirales utilisées dans le traitement des infections par les VIH-1. La résistance du VIH-1 aux traitements antirétroviraux résulte en effet de l'apparition de mutations dans les séquences codantes des protéines virales ciblées par ces thérapeutiques (TI, Protéase, Intégrase et Glycoprotéines d'enveloppe). Les mécanismes responsables de la survenue de la résistance ne sont pas complètement élucidés, et pourraient être liés aux fonctions exercées par certaines protéines de régulation du VIH-1.

Les premiers travaux de cette thèse portent sur l'impact de la protéine accessoire Vif du VIH-1 dans la variabilité génétique et l'apparition de mutations de résistance aux antirétroviraux. Vif joue un rôle crucial dans la réplication virale en bloquant A3G et A3F, désaminases cellulaires impliquées dans l'immunité intrinsèque antirétrovirale, responsables d'hypermutation du VIH-1. Il a été démontré qu'*in vitro* comme *in vivo*, A3G et A3F jouent un rôle dans la diversité du VIH-1. Ceci a donc posé la question du rôle éventuel de ces enzymes dans l'émergence des mutations de résistance aux antirétroviraux. Les hypermutations de type Guanine (G) vers Adénine (A) pourraient en effet accélérer l'apparition de mutation de résistance, notamment en augmentant la quantité de variants minoritaires résistants avant l'instauration du traitement antirétroviral. Des travaux antérieurs ont montré que l'on retrouve dans les PBMCs de patients infectés, des variants de Vif peu ou non fonctionnels quant à leur capacité à contrecarrer APOBEC3. L'infection cellulaire par ces variants donne naissance à un grand nombre de mutants comprenant des mutations de résistance aux antirétroviraux tels que la mutation M184I (de la TI) au 3TC. Dans ce travail de thèse, notre premier objectif était d'explorer le polymorphisme du gène *vif* du VIH-1 isolé de patients en échec virologique et d'analyser les propriétés fonctionnelles de protéines Vif exprimées chez des patients en situation d'échec thérapeutique. Ce travail permet ainsi d'évaluer dans quelle mesure Vif intervient dans le développement des phénomènes d'échappement aux traitements antirétroviraux observés dans la pratique clinique.

Dans un autre travail, notre objectif était de caractériser le rôle du système d'interaction Vif-APOBEC3 dans la résistance à l'association rilpivirine et lamivudine/emtricitabine. Des études récentes évaluant la rilpivirine, nouvel INNTI chez des patients naïfs (ECHO et THRIVE) montrent un pourcentage plus élevé d'échecs virologiques dans le bras rilpivirine (en association avec emtricitabine et ténofovir) par rapport au bras éfavirenz. Dans ces études, la mutation E138K sélectionnée sous rilpivirine est fréquemment retrouvée avec la mutation M184I en cas d'échec virologique. Cette association a posé la question d'une interaction entre la mutation E138K à la rilpivirine et la mutation M184I à l'emtricitabine. Etant donné que ces deux mutations résultent de substitutions G vers A dans un contexte de désamination par APOBEC3, nous avons évalué dans ce travail la possible implication d'APOBEC3 dans l'apparition concomitante de ces deux mutations de résistance.

Enfin, l'objectif du troisième travail est d'analyser l'impact d'une autre protéine accessoire : la protéine Vpr dans la résistance aux antirétroviraux. La protéine Vpr, en interagissant directement avec la forme nucléaire de l'uracil ADN glycosylase (UNG2), pourrait moduler le taux d'erreurs induites par la TI au cours de la synthèse de l'ADN viral. D'autre part, des interactions entre Vpr et la TI sont fortement suggérées notamment au sein du complexe de rétro-transcription et au sein du complexe de pré-intégration. Notre travail reposait donc sur deux hypothèses : la première selon laquelle la cinétique d'apparition de mutations de résistance pourrait être modulée en fonction de certains allèles *vpr*. Il a été montré que certains mutants de Vpr (W54R) augmentait la variabilité virale dans les cellules lymphocytaires et surtout dans les macrophages. La deuxième hypothèse porte sur l'interaction supposée entre la TI et Vpr : des mutations de résistance dans la transcriptase inverse pourrait s'accompagner et être précédées de mutations dans Vpr. Le but de ce travail était donc dans un premier temps d'analyser chez des patients infectés par le VIH-1 en situation de multi-échec les séquences du gène *vpr*, puis de caractériser fonctionnellement les propriétés biochimiques et virologiques de Vpr dérivées de la séquence de ces allèles primaires.

RESULTATS

Article 1

AIDS 2010 Sep; 24:2313-21.

Partially active HIV-1 Vif alleles facilitate viral escape from specific antiretrovirals

Slim Fourati, Isabelle Malet, Mawuena Binka, Stephanie Boukobza, Marc Wirden, Sophie Sayon, Anne Simon, Christine Katlama, Viviana Simon, Vincent Calvez, Anne-Geneviève Marcelin

La protéine Vif du VIH-1 joue un rôle crucial dans la réplication virale en bloquant A3G et A3F, désaminases cellulaires impliquées dans l'immunité intrinsèque antirétrovirale. *In vivo*, des variants de Vif peu fonctionnels dans leur capacité à contrecarrer les protéines APOBEC3 ont été décrits, engendrant des hypermutations G vers A dans le génome proviral. Ces hypermutations pourraient jouer un rôle dans les mécanismes de résistance aux antirétroviraux.

Nous avons étudié la variabilité du gène *vif* chez des souches virales présentant des mutations de résistance aux antirétroviraux dans le gène de la TI et/ou la protéase isolées de patients en échec virologique. Dans le but de mettre en évidence des mutations spécifiques de la protéine Vif, les séquences du gène *vif* de VIH-1 sous-type B de 92 patients en échappement thérapeutique ont été comparées avec celles d'une population témoin naïve d'antirétroviraux. De façon globale, nous avons observé que la variabilité de *vif* était élevée aussi bien dans la population en échappement thérapeutique (degré de polymorphisme important pour 102/192 acides aminés de Vif) que dans la population de sujets naïfs d'antirétroviraux (degré de polymorphisme important pour 96/192 acides aminés de Vif). Afin de préciser la différence de polymorphisme de *vif* entre les deux populations de l'étude (en échec virologique *versus* non traités), nous avons calculé la différence de variation de séquence au niveau de chaque acide aminé entre les deux populations. Nous avons constaté une variabilité de séquence significativement plus élevée ($p < 0.05$) chez les patients en échappement thérapeutique (comparativement à celle chez les patients non traités) au niveau des résidus suivants : K22, Y30, L153 et K157. Parmi ces positions, la position K22 est décrite comme impliquée dans l'interaction de la protéine Vif avec A3G. Plus spécifiquement,

la mutation K22H est retrouvée chez 12% des patients en échappement thérapeutique alors qu'elle n'est présente que chez 1,5% des patients naïfs d'antirétroviraux ($p=0.01$).

L'analyse biochimique du variant K22H réalisée en collaboration avec le laboratoire de Viviana Simon a montré que cette mutation diminuait la capacité de Vif à contrecarrer l'activité d'A3G. Un système expérimental permettant d'évaluer le pouvoir infectieux de différents mutants de Vif en présence d'A3G au cours d'un cycle unique de réplication a montré que le variant K22H ne neutralise que partiellement A3G. Des expériences d'infection cellulaire multiples *in vitro* utilisant le virus NL4-3-sauvage et NL4-3-K22H obtenu par mutagenèse dirigée ont été réalisées sur des cellules MT-2 (exprimant A3G ou A3G+) et des cellules Sup-T1 (n'exprimant pas A3G ou A3G-). Alors que la production du virus K22H est similaire à celle du virus sauvage dans les cellules Sup-T1, elle est significativement moindre dans les cellules A3G+ confirmant que ce mutant est sensible à A3G. Pour étudier la variabilité génétique induite par le mutant Vif K22H, nous avons recherché une empreinte de désamination dans le génome proviral obtenu à partir de l'infection de cellules MT-2 (A3G+). Pour cela, nous avons extrait l'ADN proviral après deux cycles d'infection virale et réalisé une amplification, clonage et séquençage du gène de la TI. Alors que le virus sauvage comporte quelques rares mutations observées sur quelques clones, les provirus K22H étaient hypermutés G-vers-A dans un grand nombre de clones survenant majoritairement dans un « contexte » GG vers AG, qui est le contexte de prédilection de mutations induites par A3G. Parmi les mutations observées, le codon ATG codant la méthionine (M) 184 de la TI devient ATA codant l'Isoleucine (I) (25% des clones). Ainsi, l'infection cellulaire par le virus K22H fait apparaître la mutation de résistance M184I avant toute exposition au 3TC. Ces résultats expérimentaux sont concordants avec les résultats observés chez les patients de l'étude: en effet, les mutations G16E et M36I dans la protéase (résultant elles-mêmes de mutations G vers A dans le contexte de prédilection d'APOBEC3) sont plus fréquentes chez les patients infectés par le variant K22H que chez les patients infectés par le variant K22 sauvage ($p<0.05$).

Article 2:

AIDS 2012 (sous presse)

E138K and M184I Mutations in HIV-1 Reverse Transcriptase Co-Emerge as a result of APOBEC3 Editing in the Absence of Drug Exposure

Slim Fourati, Isabelle Malet, Sidonie Lambert, Cathia Soulie, Marc Wirden, Philippe Flandre, Djeneba Bocar Fofana, Sophie Sayon, Anne Simon, Christine Katlama, Vincent Calvez, Anne-Geneviève Marcelin

La rilpivirine, nouvel INNTIs de deuxième génération, a récemment obtenu l'Autorisation de Mise sur le Marché dans le traitement des patients naïfs d'antirétroviraux. Des études récentes de phase III chez des patients naïfs d'antirétroviraux (ECHO et THRIVE) ont comparé l'efficacité virologique d'une trithérapie comprenant 2 INTIs/efavirenz à une nouvelle trithérapie 2 INTIs/rilpivirine. Les résultats montrent un pourcentage plus élevé d'échecs virologiques dans le bras rilpivirine par rapport au bras efavirenz (EFV) (10 % versus 6%). Dans ces études, les mutations E138K et M184I sont fréquemment co-sélectionnées en cas d'échec virologique dans le bras rilpivirine. Cette association a posé la question d'une interaction entre les mutations à la rilpivirine (E138K) et les mutations à l'emtricitabine/3TC (M184I). Alors que des expériences de mesure de l'activité de la TI *in vitro* suggèrent que le mutant E138K/M184I posséderait une meilleure activité TI par rapport au mutant E138K/M184V [42], d'autres études suggèrent que le mutant E138K/M184I présenterait un avantage en terme de résistance à la rilpivirine comparé au mutant E138K/M184V [43].

Nous proposons dans ce travail une nouvelle hypothèse expliquant l'émergence concomitante des mutations E138K et M184I dans la TI en cas d'échec thérapeutique. Etant donné que ces deux mutations résultent sur le plan nucléotidique de substitutions Guanine (G) vers Adénine (A) dans le contexte de désamination par les enzymes cellulaires APOBEC3 (GG ou GA), nous avons évalué l'impact des facteurs de restriction virale APOBEC3 dans l'apparition de ces mutations de résistance. Pour cela, nous avons utilisé un variant Vif K22H (NL4-3 K22H) (variant partiellement défectif quant à sa capacité à dégrader A3G) et un virus sauvage

(NL4-3) pour infecter des cellules MT-2 (exprimant A3G) et des cellules Sup-T1 (n'exprimant pas A3G). Nous avons exploré la variabilité génétique des variants viraux présents dans l'ADN proviral dans ces différents systèmes d'infections. Les résultats obtenus montrent une grande variabilité virale dans les cellules A3G+ infectée par le variant K22H mais pas dans les cellules A3G-. Les mutations M184I et E138K étaient spécifiquement retrouvées de façon concomitante dans 8% des quasi-espèces virales dans les cellules A3G+ mais pas dans les cellules qui n'expriment pas A3G. Ces résultats *in vitro* démontrent que ces deux mutations de résistance peuvent résulter de la désamination induite par A3G en dehors de toute exposition antirétrovirale.

Afin de valider cette hypothèse *in vivo*, nous avons étudié un large nombre de séquences de TI analysées à partir de PBMCs de 572 patients sous traitement antirétroviral et nous avons recherché des « empreintes » de désamination par APOBEC3 sur les séquences analysées. Au total, 605 séquences indépendantes sont analysées, par mesure spécifique du degré d'hypermutation G vers A observé sur la TI (en utilisant le logiciel hypermut). L'analyse des séquences montre que 576 séquences ne contiennent pas de régions « hypermutées » sur la TI alors que 29 séquences étaient retrouvées significativement « hypermutées » G-vers-A dans le contexte de désamination par APOBEC3. Parmi les séquences non hypermutées, aucune ne contenait les mutations E138K et M184I de façon concomitante. En revanche, parmi les séquences retrouvées hypermutées G-vers-A, près d'un quart (24%) contenait les deux mutations E138K+ M184I dans la TI. Il est important de noter qu'aucun des patients présentant ces mutations n'avait reçu un INNTI de deuxième génération (etravirine ou rilpivirine). Ainsi, les expériences *in vitro* et *in vivo* présentées dans ce travail suggèrent fortement l'implication d'APOBEC3 dans l'émergence concomitante des mutations E138K et M184I en cas d'échec à la combinaison rilpivirine/emtricitabine.

Article 3:

Antiviral Research 2012 Jan; 93:167-74.

E17A mutation in HIV-1 Vpr confers resistance to didanosine in association with Thymidine Analogue Mutations

Slim Fourati, Isabelle Malet, Carolin Guenzel, Cathia Soulie, Priscilla Maidou-Peindara, Laurence Morand-Joubert, Marc Wirden, Sophie Sayon, Gilles Peytavin, Anne Simon, Christine Katlama, Serge Benichou, Vincent Calvez, Anne-Genevieve Marcelin

Vpr est une protéine accessoire du VIH-1 de 14 Kda (96 acides aminés) exprimée tardivement au cours du cycle de réplication du VIH-1. Cette protéine virale est incorporée spécifiquement (via une interaction avec gag-p6) dans les particules virales bourgeonnant des cellules infectées. Sa présence dans les particules virales est requise lors des étapes précoces de l'infection. Vpr interagit directement avec la forme nucléaire de l'uracil ADN glycosylase (UNG2) et recrute cette enzyme dans les particules virales. Il a été montré que cette fonction permettait de réduire significativement le taux de mutation induites par la TI lors de la synthèse de l'ADN viral au sein du complexe de rétro-transcription (Mansky, 2000, 2003). Ainsi, certains variants de Vpr sont capables d'augmenter le taux de mutation virale (par perte d'interaction avec l'UNG2) et par ce biais pourraient accélérer l'adaptabilité virale. De plus, des interactions intimes entre Vpr, l'intégrase et la TI sont avancées du fait que ces protéines soient co-localisées au sein du complexe de rétro-transcription et du complexe de pré-intégration. Ces données suggèrent que Vpr pourrait jouer un rôle dans les mécanismes de résistance aux antirétroviraux, soit en modulant le taux de mutations virales ou via une interaction intime avec la TI et/ou l'intégrase.

Dans un premier temps, nous proposons d'analyser les propriétés biochimiques (analyse des interactions avec les partenaires cellulaires) et virologiques (incorporations dans les virions, analyse de la réplication virale, phénotypes de résistance) des protéines Vpr dérivées des séquences primaires de virus de patients en échec thérapeutique. Pour cela, nous avons comparé le polymorphisme du gène *vpr* à partir de plasma de patients en échec virologique (n=98) à une population témoin naïve d'antirétroviraux (n=63). L'analyse statistique montre la présence d'une mutation dans Vpr : la mutation E17A plus fréquente dans la population en

échec virologique ($p=0,01$). L'étude biochimique du variant Vpr E17A, réalisée en collaboration avec le laboratoire de Serge Benichou à l'Institut Cochin, a porté sur l'incorporation de Vpr E17A dans les virions, l'interaction entre Vpr E17A et l'UNG2 ainsi que la localisation cellulaire de Vpr E17A. Les résultats ont montré que l'interaction de Vpr E17A avec l'UNG2 était conservée. De même le recrutement de Vpr E17A dans les particules virales se faisait correctement de manière similaire au virus sauvage.

L'analyse des séquences de TI et de protéase ainsi que les caractéristiques des patients portant les variants Vpr E17A ont montré que le mutant E17A était associé à la présence de 3 mutations de résistance particulières dans la TI (M41L, L210W et la T215Y) appelées « thymidine analogues mutations » (TAMs) et également à la prise antérieure de didanosine. Ainsi, afin de caractériser l'éventuel impact de cette mutation dans la résistance aux antirétroviraux, nous avons effectué des expériences de cinétique virale ainsi que des phénotypes de résistance à l'AZT et à la didanosine de plusieurs mutants : virus sauvage (NL4-3), portant la mutation E17A ou l'ensemble de mutations E17A+TAMs (M41L, L210W et la T215Y). Nous avons montré que le mutant Vpr E17A ne modifie pas le degré de résistance à l'AZT. En revanche, ce mutant augmente de manière significative le niveau de résistance à la didanosine lorsque le virus porte des TAMs : les phénotypes de résistance à la didanosine montrent une augmentation d'un facteur >3 de la concentration inhibitrice 50 (CI50) à la didanosine du mutant Vpr E17A+ TAMs par rapport au virus portant des TAMs seules. Ces résultats sont concordants avec l'association observée entre Vpr E17A et les TAMs de virus isolés des patients en échec thérapeutique ayant reçu un traitement comprenant la didanosine.

DISCUSSION

La diversité des populations virales observées chez les patients infectés au cours de l'évolution de l'infection par le VIH-1 résulte principalement de l'apparition de mutations ponctuelles liées au faible niveau de fidélité de la TI ainsi qu'à des phénomènes de recombinaisons. D'autres mécanismes de variabilité génétique virale faisant intervenir des protéines accessoires du VIH-1 (Vif et Vpr) sont également décrits. La protéine Vpr, en interagissant directement avec la forme nucléaire de l'uracil ADN glycosylase (UNG2), limite le taux d'erreurs induites par la TI au cours de la synthèse de l'ADN viral [87]. La protéine Vif intervient en prévenant l'apparition de mutations résultant de l'activité des protéines A3G et A3F sur l'ADN viral [109].

Plusieurs arguments sont en faveur de l'implication de l'interaction Vif-APOBEC3 dans la diversité génétique du VIH-1. Des séquences de VIH-1 portant des empreintes génétiques de désamination sont fréquemment détectées dans les provirus de patients [75] [110]. Les mutations engendrées peuvent atteindre un nombre de 700 par cycle [76]. Les facteurs de restriction rétroviral APOBEC3 semblent donc exercer une activité antirétrovirale (du moins une activité de désamination de cytidines) sur le génome viral *in vivo* malgré la présence de la protéine Vif. Une des hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène serait que la neutralisation d'APOBEC3 par Vif du VIH-1 n'est pas absolue *in vivo*. L'équipe de V. Simon a montré que des variants de Vif ayant une activité anti-A3G et anti-A3F suboptimale étaient fréquemment retrouvés dans les PBMCs de patients infectés par le VIH-1. Le blocage des protéines A3G et A3F étant incomplet, celles-ci seraient incorporées dans les virions au lieu d'être dégradées et il en résulterait alors une augmentation du taux de mutation de type G vers A [63]. Ce mécanisme pourrait être mis en relation avec la composition en nucléotides (riche en A) du génome du VIH-1 [77].

Dans ce travail, nous avons étudié plus spécifiquement dans quelle mesure la protéine Vif intervient dans les mécanismes de résistance aux antirétroviraux chez les patients en échec thérapeutique. Etant donné l'implication de Vif dans la variabilité génétique, nous avons émis l'hypothèse que certains variants de Vif pourraient moduler le taux de mutation virale et par cette voie accélérer l'apparition de mutations de résistance aux antirétroviraux. Nous avons mis en évidence la mutation K22H dans *vif*, retrouvée plus fréquemment chez les patients porteurs de virus avec des mutations de résistance aux antirétroviraux par rapport à la population naïve d'antirétroviraux. L'étude de cette mutation *in vitro* a montré que celle-ci augmentait la variabilité génétique virale et permettait l'émergence de la mutation de

résistance M184I sur la TI dans 25% de la sous-population virale K22H en absence d'exposition au 3TC/FTC. La mutation M184I résulte, en effet, d'une substitution G vers A dans le contexte de prédilection de désamination d'A3G. Les résultats de cette étude suggèrent que la mutation Vif K22H (via sa faible interaction avec A3G) peut faciliter l'apparition de mutations de résistance à certains antirétroviraux. Pour appuyer cette hypothèse, nous avons analysé la présence d'autres mutations de résistance résultant de substitutions G-vers-A chez les patients en échec thérapeutique portant la mutation Vif K22H (en comparaison avec une population en échec thérapeutique ne portant pas la mutation K22H) et nous avons observé que certaines mutations de résistance G-vers-A dans la protéase (G16E et M36I) étaient significativement plus fréquentes dans la population K22H. Ces résultats suggèrent que la variabilité du gène *vif* peut être à l'origine d'un réservoir de variants résistants avant même exposition antirétrovirale. Lorsque le traitement est instauré, les mutations de résistance pourraient être sélectionnées plus rapidement expliquant l'échappement viral chez certains patients. Afin de préciser le rôle de la variabilité du gène *vif* dans l'adaptabilité du virus, nous envisageons d'étudier l'évolution du polymorphisme du gène *vif* au cours de l'infection par une analyse longitudinale des patients infectés par le VIH-1 avant et après traitement. Un autre aspect non exploré dans cette première étude est l'impact du sous-type viral dans la variabilité de Vif et ses conséquences sur la variabilité génétique et l'échappement virologique. En effet, notre étude s'est exclusivement centrée sur des patients infectés par le VIH-1 de sous-type B.

Une étude espagnole a étudié la fréquence de la mutation Vif K22H sur une large base de séquences de sous-type non B du « Los Alamos National Laboratory Database » [111]. Ce groupe retrouve des résultats similaires aux nôtres. En effet, les auteurs confirment la forte association statistique entre cette mutation dans le gène *vif* et certaines mutations de résistance résultant de substitutions G-vers-A (M36I, M46I dans la protéase), appuyant ainsi le rôle d'APOBEC3 dans l'émergence de ces mutations de résistance. Ce groupe montre, par ailleurs, que la mutation K22H est plus fréquemment retrouvée dans les sous-types non-B que les sous-types B. Une autre étude réalisée par l'équipe de V. Simon a récemment montré que des protéines Vif de sous-types non B (A, C, D, F, G, CRF01) interagissaient différemment avec différentes protéines APOBEC3.

Dans un deuxième travail, nous avons exploré le mécanisme d'émergence de deux mutations de résistance E138K et M184I dans la TI. Ces deux mutations sont sélectionnées de manière concomitante en cas d'échec virologique à une nouvelle combinaison thérapeutique

rilpivirine/emtricitabine/ténofovir. Cette association thérapeutique avait posé la question d'une interaction éventuelle entre les mutations à la rilpivirine et les mutations à l'emtricitabine. Ainsi, plusieurs travaux ont exploré l'impact de l'association de ces deux mutations dans l'activité catalytique de la TI et dans la résistance à la rilpivirine. Des expériences de mesure de l'activité de la TI *in vitro* suggèrent que le mutant E138K/M184I posséderait une meilleure activité de TI par rapport au mutant E138K/M184V [42], alors qu'une autre étude montre que le mutant E138K/M184I présenterait un avantage en terme de résistance à la rilpivirine comparé au mutant E138K/M184V [43]. Dans ce travail, nous avons évalué un nouveau mécanisme pour expliquer cette association de mutations, en explorant l'impact des facteurs de restriction virale APOBEC3. En effet, ces deux mutations résultent sur le plan nucléotidique de substitutions Guanine (G) vers Adénine (A) dans le contexte de désamination par les enzymes cellulaires APOBEC3 (GG ou GA). Nous avons montré que dans des cellules exprimant les facteurs de restriction APOBEC3, ces mutations apparaissent dans l'ADN proviral en culture cellulaire de manière concomitante et ceci en absence d'exposition aux antirétroviraux. A l'inverse, dans les cellules Sup-T1 (qui n'expriment pas les protéines APOBEC3), ces mutations n'apparaissent pas spontanément après deux cycles d'infection. De même, ces résultats ont été confortés par l'analyse d'un large nombre de séquences de TI à partir de PBMCs de patients sous traitement antirétroviral. Près d'un quart des séquences « hypermutées » G-vers-A analysées à partir de PBMCs contenaient les deux mutations E138K et M184I dans le réservoir viral alors que les patients n'avaient jamais reçu un NNRTI de 2ème génération (rilpivirine ou etravirine). A l'inverse aucune des séquences « non hypermutées » ne contenait les mutations E138K et M184I. Ces résultats suggèrent fortement que les protéines APOBEC3 peuvent jouer un rôle dans l'émergence concomitante des mutations E138K et M184I en cas d'échec à la combinaison rilpivirine/emtricitabine. La localisation proche de ces deux mutations sur le génome viral faciliterait leur émergence concomitante en présence d'A3G. Il a été montré qu'A3G agissait de manière locale sur le génome viral, en « sautant » sur une région de l'ADN simple brin de polarité négative, néo-synthétisé au cours de la rétro-transcription [112]. De plus, la recombinaison virale entre un génome hypermuté contenant les mutations E138K et M184I et un génome non hypermuté pourrait favoriser l'émergence d'un variant non hypermuté [78] contenant ces 2 mutations de résistance, d'autant qu'elles sont proches sur le génome viral. Le mécanisme présenté dans ce travail n'est pas contradictoire, mais complémentaire aux résultats des travaux antérieurs explorant des mécanismes de co-sélection de ces deux mutations (soit en améliorant l'activité catalytique de la TI [42] soit en augmentant le niveau de résistance à la rilpivirine [43]). Le

« scénario » que nous proposons est le suivant : les protéines APOBEC3 favoriseraient l'apparition simultanée des mutations E138K et M184I qui sont « archivées » dans le réservoir proviral. Alors que la majorité des provirus hypermutés sont défectifs, certains seraient capables de produire des cycles infectieux [70]. Sous traitement antirétroviral efficace, des mutants résistants à la rilpivirine pourraient donc préexister et être à l'origine d'un échec virologique si la rilpivirine est administrée chez des patients naïfs à forte charge virale (CV>100000 copies/ml). Des études cliniques de « switch » sont en cours et il conviendra d'en analyser plus précisément les échecs virologiques. Une limite à cette étude est que nous n'avons pas réalisé de phénotypes de résistance à la rilpivirine dans des systèmes cellulaires exprimant ou pas les protéines APOBEC3 afin d'évaluer la cinétique d'apparition des mutations E138K et M184I.

De façon plus globale, le rôle des cytidines désaminases APOBEC3 dans la résistance aux antirétroviraux a été exploré par plusieurs autres équipes dans des systèmes *in vitro* [70, 78, 113] et chez des souris humanisées [114]. Ainsi, dans l'étude de Sadler, les auteurs montrent qu'en présence d'A3G, les sous-populations virales subissent un large « éventail » de mutation G-vers-A au cours d'un cycle virale générant un certain nombre de virions polymorphes dont certains viables capables d'infecter de nouvelles cellules et contribuent ainsi à la diversité et à l'adaptabilité virale. L'étude de Kim montre qu'A3G peut moduler la structure virale en fonction de la pression de sélection antirétrovirale. Dans cette étude, les auteurs étudient la cinétique virale dans différents systèmes cellulaires et montrent qu'en présence de 3TC, le virus présente une capacité répliquative supérieure dans les cellules A3G+ à celle obtenue dans des cellules n'en exprimant pas. Dans ce contexte, les mutations M184I et M184V sont rapidement sélectionnées et ont permis l'échappement virologique dans des cellules A3G+ (mais pas dans les cellules A3G-). Une troisième étude récemment présentée à la conférence internationale « Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections » (CROI 2012) [114], réalisée sur un modèle murin humanisé (produisant les précurseurs de cellules hématopoïétique CD34+) étudie le rôle d'A3G dans l'échappement virologique au 3TC. Dans cette étude, des souris humanisées sont infectées par un virus sauvage et un variant Vif E45G partiellement défectif dans sa capacité à contrecarrer A3G. En absence de 3TC, le virus sauvage a un avantage répliquatif en comparaison au mutant Vif E45G. Cependant un phénomène inverse est observé en présence de 3TC: le variant E45G présenterait alors un avantage répliquatif comparativement au virus sauvage. Egalement dans

ce travail, l'hypothèse avancée est l'apparition plus précoce de la M184I en présence d'A3G qu'en absence de cette enzyme cellulaire.

L'ensemble de ces études est concordant avec nos résultats montrant l'implication probable d'APOBEC3 dans la variabilité génétique virale et l'émergence des mutations de résistance aux antirétroviraux. La sélection de virus résistants provenant de la recombinaison entre un ARN génomique hypermuté (portant par exemple la M184I) et un ARN génomique non muté pourrait permettre une émergence rapide d'un variant résistant. L'équipe de V. Simon a ainsi montré que la présence concomitante dans une même cellule de provirus hypermutés transcriptionnellement actifs et de provirus non hypermuté répliatif peut produire des virions contenant deux copies d'ARN génomique hétérogènes ; au prochain cycle d'infection, la recombinaison entre les deux copies peut produire un virus répliatif résistant au 3TC (portant la M184I). Ainsi, la neutralisation incomplète d'APOBEC3 et la recombinaison du VIH permettraient, sous pression d'antirétroviral, une sélection de mutants de résistance plus rapidement que les mutations apparues du fait des erreurs de la TI. Cette hypothèse expliquerait l'apparition précoce de la M184I (résultant de la mutation G→A dans un contexte A3G) précédant la mutation M184V (résultant d'erreurs de la TI) au cours du traitement de patients par 3TC [115].

Dans la 3^{ème} partie de ce travail, nous avons analysé l'éventuelle implication de la protéine Vpr dans la résistance aux antirétroviraux. Deux fonctions de Vpr pourraient être reliées à cette hypothèse. D'une part, Vpr, en interagissant directement avec la forme nucléaire de l'uracil ADN glycosylase (UNG2), pourrait moduler le taux d'erreurs induites par la TI au cours de la synthèse de l'ADN viral et par ce biais faciliter l'émergence de mutations de résistance. D'autre part, des interactions entre Vpr, l'intégrase et la TI sont fortement suggérées notamment au sein du complexe de rétro-transcription et au sein du complexe de pré-intégration [116] [117].

Pour répondre à ces hypothèses, nous avons, dans un premier temps, comparé le polymorphisme de *vpr* chez des patients infectés par le VIH-1 en situation de multi-échec à une population infectée par le VIH-1 naïve d'antirétroviraux. Nous avons mis en évidence la présence d'une mutation *vpr* E17A associée à l'échec virologique. Le résidu 17 se situe dans la première hélice alpha (hélice α 1) de Vpr qui est impliquée dans un grand nombre de fonctions de Vpr dont le transport nucléaire et son incorporation dans les virions. L'équipe de S. Benichou [85] a montré que des mutations dans l'hélice alpha 1 (L23, K27M) altèrent l'adressage nucléaire de Vpr (par perte d'interaction avec une porine nucléaire). Une autre

étude montre que d'autres substitutions au niveau de cette même hélice (17P, E21P, E24P, E25 P, E29P) bloquent l'incorporation de Vpr dans les particules virales [118]; cette fonction jouant un rôle important dans la phase précoce du cycle cellulaire. D'autre part, les équipes de Serge Bénichou et Louis Mansky ont montré qu'une simple substitution dans *vpr* W54R pouvait altérer l'interaction de la protéine avec l'UNG2 [88]. Le défaut d'interaction avec l'UNG2 est corrélé à l'augmentation du taux de mutation du mutant W54R dans les cellules en division (lymphocytes T CD4) et surtout dans les macrophages [87]. Pour ces différentes raisons, nous avons procédé à l'étude fonctionnelle du mutant E17A (incorporation dans les virions, localisation nucléaire et interaction avec UNG2). Les résultats biochimiques sont néanmoins négatifs montrant que Vpr E17A est correctement incorporé dans les virions et que son interaction avec l'UNG2 reste intacte, écartant ainsi la première hypothèse qui impliquait la mutation E17A dans la modulation du taux de mutation virale. Cependant, il est intéressant de noter que parmi la population de patients traités en échec virologique, trois patients portaient l'allèle *vpr* (W54R). Cette mutation étant impliquée dans l'augmentation du taux de mutation virale *in vitro*, la présence de cette mutation *in vivo* pourrait participer à l'émergence de mutations de résistance chez ces patients en échec virologique.

Pour évaluer la deuxième hypothèse de ce travail dont les éléments sont basés sur les interactions possibles entre Vpr, l'Intégrase et la TI, nous avons recherché, chez la population en échec virologique, d'éventuelles associations entre la mutation *vpr* E17A et des mutations de résistance aux antirétroviraux notamment au niveau de la TI. Il est à noter que nous n'avons pas pu dans ce travail, faire une recherche sur les mutations de résistance aux anti-intégrases étant donné le très faible nombre de patients en échec d'anti-intégrases dans notre population. Nous avons montré que *vpr* E17A était associé à 3 mutations de résistance aux INTIs, les « thymidin analog mutations » (TAMs) M41L, L210W et T215Y dans la TI. De plus, en analysant l'historique thérapeutique des patients, nous avons observé une association unique entre *vpr* E17A et la prise antérieure de didanosine. En réalisant des tests phénotypiques, nous avons montré que le mutant E17A-*vpr*+ TAMs confère une résistance à la didanosine supérieure à celle induite par le mutant portant les TAMs seules ou le mutant E17A seul. Ces résultats indiquent qu'il existerait une « synergie » d'action entre ces mutations, ce qui induirait une résistance à la didanosine.

Le rôle des TAMs dans la résistance aux analogues de la thymidine (AZT, d4T) est bien caractérisé. Les TAMs induisent l'excision de l'analogue nucléosidique terminateur de chaîne venant d'être incorporé à l'ADN proviral en cours d'élongation (réaction de

phosphorolyse) [22]. Bien que ces mutations ne soient sélectionnées que par les analogues de thymidines, elles ont un impact sur l'efficacité des autres analogues nucléos(t)idiques. Cet impact est variable en fonction des INTIs. Des expériences réalisées *in vitro* montrent que l'excision de la didanosine induite par les TAMs est minime, inférieure à celle induite pour les autres INTIs [32]. Dans notre travail, l'observation d'une résistance phénotypique élevée à la didanosine du mutant E17A-*vpr*+ TAMs en comparaison au mutant portant les TAMs seule suggère que Vpr E17A potentialiserait l'excision de la didanosine induite par les TAMs. Ceci reste cependant hypothétique et du fait de la difficulté technique d'évaluer *in vitro* l'activité d'excision de la TI en présence de Vpr, nous n'avons pas pu explorer le mécanisme d'action sous-jacent à la résistance observée. Ce mécanisme suppose une interaction entre la TI et Vpr. Dans la littérature, quelques études ont porté sur les interactions entre Vpr et la TI [117], et entre Vpr et l'Intégrase [116, 117]. Dans le travail de Gleenberg, les auteurs ont observé une inhibition de l'activité de la TI par des peptides dérivés de Vpr. Les auteurs montrent que le domaine de Vpr impliqué dans l'interaction avec la TI se situe en C-terminal (Acides aminés 57-71) alors que les résidus de la TI impliqués dans cette interaction comprennent les positions 25, 93, 230, 266, 269 et 381 de la TI. Nos résultats suggèrent que d'autres domaines de Vpr (et notamment la première hélice alpha 1) pourraient être impliqués dans l'interaction avec la TI. Il serait intéressant dans nos projets futurs de caractériser les interactions entre Vpr et la TI, plus spécifiquement lorsque ces deux protéines portent les mutations observées dans notre travail (Vpr E17A et TAMs).

Cette étude est la première, à notre connaissance, qui évalue l'implication de Vpr dans la résistance aux antirétroviraux. Nos résultats suggèrent une interaction entre Vpr porteur de la mutation E17A et la TI comprenant des mutations de résistance (TAMs). D'éventuelles associations entre certains variants de *vpr* et *intégrase* portant des mutations de résistance n'ont pas pu être établies dans ce travail car peu de patients recevaient des anti-intégrases dans notre population étudiée. Dans les perspectives de ce travail nous projetons ainsi de caractériser les allèles primaires de *vpr* chez une population de patients en échec de raltégravir avec des virus portant des mutations de résistance dans l'intégrase. De manière similaire à ce travail, cette étude permettrait de déterminer d'éventuelles associations entre des mutations de résistance dans l'intégrase et un polymorphisme de *vpr*.

D'autre part, la modulation de la variabilité génétique virale par Vpr (notamment via son interaction avec l'UNG2) reste une hypothèse intéressante à explorer. Par exemple, le mutant Vpr W54R (déficient quant à sa capacité à interagir avec l'UNG2) a été mis en

évidence chez 3 patients en échec thérapeutique dans la population de notre étude alors que cette mutation semble très rare chez les patients non traités (prévalence de moins de 0,1% dans la base Los Alamos). Une telle mutation dans *Vpr* augmente de manière significative le taux de mutation virale et pourrait expliquer l'échec virologique chez ces patients porteurs de virus multirésistants. Afin de répondre à cette question, il nous semble intéressant, dans nos perspectives, de caractériser les allèles primaires de *vpr* chez ces patients de façon longitudinale afin de déterminer si cette mutation était présente avant traitement ou si elle apparaissait au moment de l'échec thérapeutique.

REFERENCES

REFERENCES

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983,**220**:868-871.
2. Moya A, Holmes EC, Gonzalez-Candelas F. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nat Rev Microbiol* 2004,**2**:279-288.
3. Clavel F, Hoggan MD, Willey RL, Strebel K, Martin MA, Repaske R. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *J Virol* 1989,**63**:1455-1459.
4. An W, Telesnitsky A. HIV-1 genetic recombination: experimental approaches and observations. *AIDS Rev* 2002,**4**:195-212.
5. Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995,**267**:483-489.
6. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, *et al.* A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 2009,**15**:871-872.
7. Furman PA, Fyfe JA, St Clair MH, Weinhold K, Rideout JL, Freeman GA, *et al.* 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* 1986,**83**:8333-8337.
8. Esnouf R, Ren J, Ross C, Jones Y, Stammers D, Stuart D. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol* 1995,**2**:303-308.
9. Molina JM, Cahn P, Grinsztejn B, Lazzarin A, Mills A, Saag M, *et al.* Rilpivirine versus efavirenz with tenofovir and emtricitabine in treatment-naive adults infected with HIV-1 (ECHO): a phase 3 randomised double-blind active-controlled trial. *Lancet* 2011,**378**:238-246.
10. Cohen CJ, Andrade-Villanueva J, Clotet B, Fourie J, Johnson MA, Ruxrungtham K, *et al.* Rilpivirine versus efavirenz with two background nucleoside or nucleotide reverse transcriptase inhibitors in treatment-naive adults infected with HIV-1 (THRIVE): a phase 3, randomised, non-inferiority trial. *Lancet* 2011,**378**:229-237.
11. Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, Eron JJ, Gonzalez C, McMahon D, *et al.* Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human

- immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1997,**337**:734-739.
12. Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS, *et al.* A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med* 1997,**337**:725-733.
 13. King JR, Wynn H, Brundage R, Acosta EP. Pharmacokinetic enhancement of protease inhibitor therapy. *Clin Pharmacokinet* 2004,**43**:291-310.
 14. Wild C, Greenwell T, Matthews T. A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993,**9**:1051-1053.
 15. Deeks SG, Wrin T, Liegler T, Hoh R, Hayden M, Barbour JD, *et al.* Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia. *N Engl J Med* 2001,**344**:472-480.
 16. Weber J, Rangel HR, Chakraborty B, Marotta ML, Valdez H, Fransen K, *et al.* Role of Baseline pol Genotype in HIV-1 Fitness Evolution. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003,**33**:448-460.
 17. Moutouh L, Corbeil J, Richman DD. Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996,**93**:6106-6111.
 18. Furtado MR, Callaway DS, Phair JP, Kunstman KJ, Stanton JL, Macken CA, *et al.* Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1999,**340**:1614-1622.
 19. Sigal A, Kim JT, Balazs AB, Dekel E, Mayo A, Milo R, *et al.* Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy. *Nature* 2011,**477**:95-98.
 20. Shehu-Xhilaga M, Tachedjian G, Crowe SM, Kedzierska K. Antiretroviral compounds: mechanisms underlying failure of HAART to eradicate HIV-1. *Curr Med Chem* 2005,**12**:1705-1719.
 21. Selmi B, Deval J, Boretto J, Canard B. Nucleotide analogue binding, catalysis and primer unblocking in the mechanisms of HIV-1 reverse transcriptase-mediated resistance to nucleoside analogues. *Antivir Ther* 2003,**8**:143-154.

22. Meyer PR, Matsuura SE, So AG, Scott WA. Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998,**95**:13471-13476.
23. Marcelin AG, Delaunay C, Wirden M, Viegas P, Simon A, Katlama C, *et al.* Thymidine analogue reverse transcriptase inhibitors resistance mutations profiles and association to other nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations observed in the context of virological failure. *J Med Virol* 2004,**72**:162-165.
24. Meyer PR, Matsuura SE, Mian AM, So AG, Scott WA. A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol Cell* 1999,**4**:35-43.
25. Arion D, Kaushik N, McCormick S, Borkow G, Parniak MA. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry* 1998,**37**:15908-15917.
26. Boyer PL, Sarafianos SG, Arnold E, Hughes SH. Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol* 2001,**75**:4832-4842.
27. Naeger LK, Miller MD. Mechanisms of HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance: is it all figured out? *Curr Opin Investig Drugs* 2001,**2**:335-339.
28. St Clair MH, Martin JL, Tudor-Williams G, Bach MC, Vavro CL, King DM, *et al.* Resistance to ddI and sensitivity to AZT induced by a mutation in HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 1991,**253**:1557-1559.
29. Kozal MJ, Kroodsma K, Winters MA, Shafer RW, Efron B, Katzenstein DA, *et al.* Didanosine resistance in HIV-infected patients switched from zidovudine to didanosine monotherapy. *Ann Intern Med* 1994,**121**:263-268.
30. Whitcomb JM, Parkin NT, Chappey C, Hellmann NS, Petropoulos CJ. Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. *J Infect Dis* 2003,**188**:992-1000.
31. Flandre P, Chappey C, Marcelin AG, Ryan K, Maa JF, Bates M, *et al.* Phenotypic susceptibility to didanosine is associated with antiviral activity in treatment-experienced patients with HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2007,**195**:392-398.
32. Naeger LK, Margot NA, Miller MD. ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 2002,**46**:2179-2184.

33. Eron JJ, Benoit SL, Jemsek J, MacArthur RD, Santana J, Quinn JB, *et al.* Treatment with lamivudine, zidovudine, or both in HIV-positive patients with 200 to 500 CD4+ cells per cubic millimeter. North American HIV Working Party. *N Engl J Med* 1995,**333**:1662-1669.
34. Marcelin AG, Flandre P, Pavie J, Schmidely N, Wirden M, Lada O, *et al.* Clinically relevant genotype interpretation of resistance to didanosine. *Antimicrob Agents Chemother* 2005,**49**:1739-1744.
35. Mouroux M, Descamps D, Izopet J, Yvon A, Delaugerre C, Matheron S, *et al.* Low-rate emergence of thymidine analogue mutations and multi-drug resistance mutations in the HIV-1 reverse transcriptase gene in therapy-naive patients receiving stavudine plus lamivudine combination therapy. *Antivir Ther* 2001,**6**:179-183.
36. Diallo K, Gotte M, Wainberg MA. Molecular impact of the M184V mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 2003,**47**:3377-3383.
37. Castagna A, Danise A, Menzo S, Galli L, Gianotti N, Carini E, *et al.* Lamivudine monotherapy in HIV-1-infected patients harbouring a lamivudine-resistant virus: a randomized pilot study (E-184V study). *AIDS* 2006,**20**:795-803.
38. Campbell TB, Shulman NS, Johnson SC, Zolopa AR, Young RK, Bushman L, *et al.* Antiviral activity of lamivudine in salvage therapy for multidrug-resistant HIV-1 infection. *Clin Infect Dis* 2005,**41**:236-242.
39. Trottier B MN, Longpré D, Dion H, Vézina S, Lavoie S, Murphy D, Nguyen VK, Thomas R. Removing an Inactive NRTI from an Effective Salvage Regimen is Safe, Maintains Virologic Suppression and Reduces Cost of Treatment: Week 24 Results from the VERITAS trial (TMC 114 HIV 4054). *13th European AIDS Conference Belgrade, Serbia Oct 12-15, 2011* 2011.
40. Miller V, Ait-Khaled M, Stone C, Griffin P, Mesogiti D, Cutrell A, *et al.* HIV-1 reverse transcriptase (RT) genotype and susceptibility to RT inhibitors during abacavir monotherapy and combination therapy. *AIDS* 2000,**14**:163-171.
41. Joly V, Descamps D, Peytavin G, Touati F, Mentre F, Duval X, *et al.* Evolution of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) resistance mutations in nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in HIV-1-infected patients switched to antiretroviral therapy without NNRTIs. *Antimicrob Agents Chemother* 2004,**48**:172-175.

42. Hu Z, Kuritzkes DR. Interaction of reverse transcriptase (RT) mutations conferring resistance to lamivudine and etravirine: effects on fitness and RT activity of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2011,**85**:11309-11314.
43. Kulkarni R, Babaoglu K, Lansdon EB, Rimsky L, Van Eygen V, Picchio G, *et al.* The HIV-1 Reverse Transcriptase M184I Mutation Enhances the E138K-Associated Resistance to Rilpivirine and Decreases Viral Fitness. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012,**59**:47-54.
44. Park J, Morrow CD. Mutations in the protease gene of human immunodeficiency virus type 1 affect release and stability of virus particles. *Virology* 1993,**194**:843-850.
45. Mahalingam B, Louis JM, Reed CC, Adomat JM, Krouse J, Wang YF, *et al.* Structural and kinetic analysis of drug resistant mutants of HIV-1 protease. *Eur J Biochem* 1999,**263**:238-245.
46. Quinones-Mateu ME, Arts EJ. Virus fitness: concept, quantification, and application to HIV population dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006,**299**:83-140.
47. Quinones-Mateu ME, Arts EJ. Fitness of drug resistant HIV-1: methodology and clinical implications. *Drug Resist Updat* 2002,**5**:224-233.
48. Nijhuis M, Deeks S, Boucher C. Implications of antiretroviral resistance on viral fitness. *Curr Opin Infect Dis* 2001,**14**:23-28.
49. Rimsky LT, Shugars DC, Matthews TJ. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *J Virol* 1998,**72**:986-993.
50. Poveda E, Briz V, Soriano V. Enfuvirtide, the first fusion inhibitor to treat HIV infection. *AIDS Rev* 2005,**7**:139-147.
51. Descamps D, Assoumou L, Masquelier B, Marcelin AG, Saidi S, Tamalet C, *et al.* HIV-1-infected patients from the French National Observatory experiencing virological failure while receiving enfuvirtide. *J Antimicrob Chemother* 2008,**62**:451-455.
52. Baba M, Miyake H, Wang X, Okamoto M, Takashima K. Isolation and characterization of human immunodeficiency virus type 1 resistant to the small-molecule CCR5 antagonist TAK-652. *Antimicrob Agents Chemother* 2007,**51**:707-715.
53. Kuhmann SE, Pugach P, Kunstman KJ, Taylor J, Stanfield RL, Snyder A, *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.

54. Moncunill G, Armand-Ugon M, Pauls E, Clotet B, Este JA. HIV-1 escape to CCR5 coreceptor antagonism through selection of CXCR4-using variants in vitro. *AIDS* 2008,**22**:23-31.
55. Delelis O, Malet I, Na L, Tchertanov L, Calvez V, Marcelin AG, *et al.* The G140S mutation in HIV integrases from raltegravir-resistant patients rescues catalytic defect due to the resistance Q148H mutation. *Nucleic Acids Res* 2009,**37**:1193-1201.
56. Reigadas S, Anies G, Masquelier B, Calmels C, Stuyver LJ, Parissi V, *et al.* The HIV-1 integrase mutations Y143C/R are an alternative pathway for resistance to Raltegravir and impact the enzyme functions. *PLoS One* 2010,**5**:e10311.
57. Hertogs K, de Bethune MP, Miller V, Ivens T, Schel P, Van Cauwenberge A, *et al.* A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1998,**42**:269-276.
58. Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, Delgiudice P, Porsin S, Simonet P, *et al.* Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet* 1999,**353**:2195-2199.
59. Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, Neaton JD, Hoover ML, Winters MA, *et al.* A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *AIDS* 2000,**14**:F83-93.
60. Cingolani A, Antinori A, Rizzo MG, Murri R, Ammassari A, Baldini F, *et al.* Usefulness of monitoring HIV drug resistance and adherence in individuals failing highly active antiretroviral therapy: a randomized study (ARGENTA). *AIDS* 2002,**16**:369-379.
61. Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* 2003,**9**:1404-1407.
62. Rose KM, Marin M, Kozak SL, Kabat D. The viral infectivity factor (Vif) of HIV-1 unveiled. *Trends Mol Med* 2004,**10**:291-297.
63. Simon V, Zennou V, Murray D, Huang Y, Ho DD, Bieniasz PD. Natural variation in Vif: differential impact on APOBEC3G/3F and a potential role in HIV-1 diversification. *PLoS Pathog* 2005,**1**:e6.

64. Zhang W, Chen G, Niewiadomska AM, Xu R, Yu XF. Distinct determinants in HIV-1 Vif and human APOBEC3 proteins are required for the suppression of diverse host anti-viral proteins. *PLoS ONE* 2008,**3**:e3963.
65. Russell RA, Smith J, Barr R, Bhattacharyya D, Pathak VK. Distinct domains within APOBEC3G and APOBEC3F interact with separate regions of human immunodeficiency virus type 1 Vif. *J Virol* 2009,**83**:1992-2003.
66. Russell RA, Pathak VK. Identification of two distinct human immunodeficiency virus type 1 Vif determinants critical for interactions with human APOBEC3G and APOBEC3F. *J Virol* 2007,**81**:8201-8210.
67. Chiu YL, Greene WC. The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements. *Annu Rev Immunol* 2008,**26**:317-353.
68. Bishop KN, Verma M, Kim EY, Wolinsky SM, Malim MH. APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathog* 2008,**4**:e1000231.
69. Suspene R, Sommer P, Henry M, Ferris S, Guetard D, Pochet S, *et al.* APOBEC3G is a single-stranded DNA cytidine deaminase and functions independently of HIV reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res* 2004,**32**:2421-2429.
70. Sadler HA, Stenglein MD, Harris RS, Mansky LM. APOBEC3G contributes to HIV-1 variation through sublethal mutagenesis. *J Virol* 2010,**84**:7396-7404.
71. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 2002,**418**:646-650.
72. Albin JS, Harris RS. Interactions of host APOBEC3 restriction factors with HIV-1 in vivo: implications for therapeutics. *Expert Rev Mol Med*,**12**:e4.
73. Piantadosi A, Humes D, Chohan B, McClelland RS, Overbaugh J. Analysis of the percentage of human immunodeficiency virus type 1 sequences that are hypermutated and markers of disease progression in a longitudinal cohort, including one individual with a partially defective Vif. *J Virol* 2009,**83**:7805-7814.
74. Janini M, Rogers M, Birx DR, McCutchan FE. Human immunodeficiency virus type 1 DNA sequences genetically damaged by hypermutation are often abundant in patient peripheral blood mononuclear cells and may be generated during near-simultaneous infection and activation of CD4(+) T cells. *J Virol* 2001,**75**:7973-7986.
75. Kieffer TL, Kwon P, Nettles RE, Han Y, Ray SC, Siliciano RF. G-->A hypermutation in protease and reverse transcriptase regions of human immunodeficiency virus type 1 residing in resting CD4+ T cells in vivo. *J Virol* 2005,**79**:1975-1980.

76. Vartanian JP, Henry M, Wain-Hobson S. Sustained G-->A hypermutation during reverse transcription of an entire human immunodeficiency virus type 1 strain Vau group O genome. *J Gen Virol* 2002,**83**:801-805.
77. Berkhout B, van Hemert FJ. The unusual nucleotide content of the HIV RNA genome results in a biased amino acid composition of HIV proteins. *Nucleic Acids Res* 1994,**22**:1705-1711.
78. Mulder LC, Harari A, Simon V. Cytidine deamination induced HIV-1 drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008,**105**:5501-5506.
79. Berkhout B, de Ronde A. APOBEC3G versus reverse transcriptase in the generation of HIV-1 drug-resistance mutations. *Aids* 2004,**18**:1861-1863.
80. Morellet N, Bouaziz S, Petitjean P, Roques BP. NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR. *J Mol Biol* 2003,**327**:215-227.
81. Wecker K, Morellet N, Bouaziz S, Roques BP. NMR structure of the HIV-1 regulatory protein Vpr in H₂O/trifluoroethanol. Comparison with the Vpr N-terminal (1-51) and C-terminal (52-96) domains. *Eur J Biochem* 2002,**269**:3779-3788.
82. Bukrinsky M, Adzhubei A. Viral protein R of HIV-1. *Rev Med Virol* 1999,**9**:39-49.
83. Schuler W, Wecker K, de Rocquigny H, Baudat Y, Sire J, Roques BP. NMR structure of the (52-96) C-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr: molecular insights into its biological functions. *J Mol Biol* 1999,**285**:2105-2117.
84. Andersen JL, Le Rouzic E, Planelles V. HIV-1 Vpr: mechanisms of G2 arrest and apoptosis. *Exp Mol Pathol* 2008,**85**:2-10.
85. Jacquot G, Le Rouzic E, David A, Mazzolini J, Bouchet J, Bouaziz S, *et al.* Localization of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope: impact on Vpr functions and virus replication in macrophages. *Retrovirology* 2007,**4**:84.
86. Planelles V, Benichou S. Vpr and its interactions with cellular proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009,**339**:177-200.
87. Chen R, Le Rouzic E, Kearney JA, Mansky LM, Benichou S. Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages. *J Biol Chem* 2004,**279**:28419-28425.
88. Mansky LM, Preveral S, Selig L, Benarous R, Benichou S. The interaction of vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 In vivo mutation rate. *J Virol* 2000,**74**:7039-7047.

89. Mansky LM, Le Rouzic E, Benichou S, Gajary LC. Influence of reverse transcriptase variants, drugs, and Vpr on human immunodeficiency virus type 1 mutant frequencies. *J Virol* 2003,**77**:2071-2080.
90. Selig L, Benichou S, Rogel ME, Wu LI, Vodicka MA, Sire J, *et al.* Uracil DNA glycosylase specifically interacts with Vpr of both human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus of sooty mangabeys, but binding does not correlate with cell cycle arrest. *J Virol* 1997,**71**:4842-4846.
91. Guenzel CA, Herate C, Le Rouzic E, Maidou-Peindara P, Sadler HA, Rouyez MC, *et al.* Recruitment of the nuclear form of uracil DNA glycosylase into virus particles participates in the full infectivity of HIV-1. *J Virol* 2012,**86**:2533-2544.
92. Fassati A, Goff SP. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2001,**75**:3626-3635.
93. Le Rouzic E, Benichou S. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology* 2005,**2**:11.
94. Farnet CM, Haseltine WA. Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J Virol* 1991,**65**:1910-1915.
95. Le Rouzic E, Mousnier A, Rustum C, Stutz F, Hallberg E, Dargemont C, *et al.* Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. *J Biol Chem* 2002,**277**:45091-45098.
96. Wang L, Mukherjee S, Jia F, Narayan O, Zhao LJ. Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat. *J Biol Chem* 1995,**270**:25564-25569.
97. Cohen EA, Dehni G, Sodroski JG, Haseltine WA. Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J Virol* 1990,**64**:3097-3099.
98. Agostini I, Navarro JM, Rey F, Bouhamdan M, Spire B, Vigne R, *et al.* The human immunodeficiency virus type 1 Vpr transactivator: cooperation with promoter-bound activator domains and binding to TFIIB. *J Mol Biol* 1996,**261**:599-606.
99. Felzien LK, Woffendin C, Hottiger MO, Subbramanian RA, Cohen EA, Nabel GJ. HIV transcriptional activation by the accessory protein, VPR, is mediated by the p300 co-activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998,**95**:5281-5286.
100. Hoshino S, Konishi M, Mori M, Shimura M, Nishitani C, Kuroki Y, *et al.* HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J Leukoc Biol* 2010,**87**:1133-1143.

101. Jowett JB, Planelles V, Poon B, Shah NP, Chen ML, Chen IS. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol* 1995,**69**:6304-6313.
102. Planelles V, Jowett JB, Li QX, Xie Y, Hahn B, Chen IS. Vpr-induced cell cycle arrest is conserved among primate lentiviruses. *J Virol* 1996,**70**:2516-2524.
103. Stivahtis GL, Soares MA, Vodicka MA, Hahn BH, Emerman M. Conservation and host specificity of Vpr-mediated cell cycle arrest suggest a fundamental role in primate lentivirus evolution and biology. *J Virol* 1997,**71**:4331-4338.
104. Casey L, Wen X, de Noronha CM. The functions of the HIV1 protein Vpr and its action through the DCAF1.DDB1.Cullin4 ubiquitin ligase. *Cytokine* 2010,**51**:1-9.
105. Fukumori T, Akari H, Yoshida A, Fujita M, Koyama AH, Kagawa S, *et al.* Regulation of cell cycle and apoptosis by human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *Microbes Infect* 2000,**2**:1011-1017.
106. Conti L, Rainaldi G, Matarrese P, Varano B, Rivabene R, Columba S, *et al.* The HIV-1 vpr protein acts as a negative regulator of apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line: possible implications for the pathogenesis of AIDS. *J Exp Med* 1998,**187**:403-413.
107. Stewart SA, Poon B, Jowett JB, Chen IS. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest. *J Virol* 1997,**71**:5579-5592.
108. Yao XJ, Mouland AJ, Subbramanian RA, Forget J, Rougeau N, Bergeron D, *et al.* Vpr stimulates viral expression and induces cell killing in human immunodeficiency virus type 1-infected dividing Jurkat T cells. *J Virol* 1998,**72**:4686-4693.
109. Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* 2003,**9**:1398-1403.
110. Pace C, Keller J, Nolan D, James I, Gaudieri S, Moore C, *et al.* Population level analysis of human immunodeficiency virus type 1 hypermutation and its relationship with APOBEC3G and vif genetic variation. *J Virol* 2006,**80**:9259-9269.
111. Yebra G, Holguin A. Mutation Vif-22H, which allows HIV-1 to use the APOBEC3G hypermutation to develop resistance, could appear more quickly in certain non-B variants. *J Antimicrob Chemother* 2011,**66**:941-942.
112. Chelico L, Pham P, Calabrese P, Goodman MF. APOBEC3G DNA deaminase acts processively 3' --> 5' on single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* 2006,**13**:392-399.

113. Kim EY, Bhattacharya T, Kunstman K, Swantek P, Koning FA, Malim MH, *et al.* Human APOBEC3G-mediated editing can promote HIV-1 sequence diversification and accelerate adaptation to selective pressure. *J Virol* 2010,**84**:10402-10405.
114. Gustavo Gers Huber AA, Marc Nischang, Duo Li, Mary-Aude Rochat, Stefan Regenass, Viviana Simon, Roberto F. Speck. APOBEC3 restriction of HIV Vif mutants in a humanized mouse model. *CROI* 2012.
115. Keulen W, Back NK, van Wijk A, Boucher CA, Berkhout B. Initial appearance of the 184Ile variant in lamivudine-treated patients is caused by the mutational bias of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Virol* 1997,**71**:3346-3350.
116. Bischerour J, Tauc P, Leh H, de Rocquigny H, Roques B, Mouscadet JF. The (52-96) C-terminal domain of Vpr stimulates HIV-1 IN-mediated homologous strand transfer of mini-viral DNA. *Nucleic Acids Res* 2003,**31**:2694-2702.
117. Gleenberg IO, Herschhorn A, Hizi A. Inhibition of the activities of reverse transcriptase and integrase of human immunodeficiency virus type-1 by peptides derived from the homologous viral protein R (Vpr). *J Mol Biol* 2007,**369**:1230-1243.
118. Mahalingam S, Collman RG, Patel M, Monken CE, Srinivasan A. Functional analysis of HIV-1 Vpr: identification of determinants essential for subcellular localization. *Virology* 1995,**212**:331-339.

ANNEXES

Article 1

AIDS 2010 Sep; 24:2313-21.

**Partially active HIV-1 Vif alleles facilitate viral escape from specific
antiretrovirals**

Slim Fourati, Isabelle Malet, Mawuena Binka, Stephanie Boukobza, Marc Wirden, Sophie Sayon, Anne Simon, Christine Katlama, Viviana Simon, Vincent Calvez, Anne-Geneviève Marcelin

Partially active HIV-1 Vif alleles facilitate viral escape from specific antiretrovirals

Slim Fourati^{a,b,c}, Isabelle Malet^{a,b,c}, Mawuena Binka^d,
Stephanie Boukobza^{a,b,c}, Marc Wirden^{a,b,c}, Sophie Sayon^{a,b,c},
Anne Simon^e, Christine Katlama^{a,b,f}, Viviana Simon^d,
Vincent Calvez^{a,b,c} and Anne-Geneviève Marcelin^{a,b,c}

Background: The HIV-1 Vif protein counteracts the antiviral activity of the cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3F. Natural variation in Vif may result in reduced efficacy against APOBEC3 proteins and in increased HIV-1 diversity. We speculated that this mechanism could facilitate viral escape from certain antiretroviral drugs.

Methods and results: We analyzed the protease, reverse transcriptase and Vif sequences of viruses from plasma obtained from 92 HIV-1-infected individuals failing antiretroviral treatment and 65 antiretroviral-naïve patients. Mutation K22H in Vif was more frequent in patients failing to antiretroviral compared to antiretroviral-naïve patients. In-vitro experiments showed that mutant K22H failed to completely neutralize APOBEC3G. Upon infection of MT-2 cells, most of the K22H proviral clones encoded increased numbers of G-to-A mutations. Among these mutations, the lamivudine drug-resistance-associated mutation M184I in reverse transcriptase was detected in 25% of clones in the absence of any lamivudine exposure. In our population, among pretreated patients, 72% of K22H viruses versus 42% in WT K22 viruses harbored at least two drug-resistance-associated mutations in a GA/GG dinucleotide context. More specifically, K22H viruses harbored significantly more G16E and M36I in protease than in those isolated from pretreated patients harboring WT K22 viruses.

Conclusions: This study provides evidence that patients experiencing virological failure frequently harbor Vif point mutants (i.e. K22H). Such Vif alleles lose their ability to counteract APOBEC3 proteins, leading to an increase of G-to-A viral mutations that can facilitate the emergence of some antiretroviral resistance mutations.

© 2010 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

AIDS 2010, **24**:000–000

Keywords: APOBEC3, drug resistance, HIV-1, Vif, viral diversity

Introduction

The extensive genetic diversity of HIV-1 provides the foundation for its ability to rapidly escape from antiretroviral drugs in treated HIV-1-infected individuals. Virologic failure occurs when viruses with drug-

resistance-associated amino acid substitutions in the targeted viral regions (reverse transcriptase, protease, integrase or envelope) are selected and outgrow the more susceptible strains. Viral properties such as the error rate of the reverse transcriptase enzyme [1] and recombination [2–4] underlie the rapid emergence of drug-resistant

^aUMR 943, ^bINSERM U943, ^cAP-HP, Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière, Laboratoire de Virologie, Paris France, ^dDepartments of Medicine and Microbiology, Global Health and Emerging Pathogens Institute, Mount Sinai School of Medicine, New York, USA, ^eAP-HP, Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière, Service de Medecine Interne, and ^fAP-HP, Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière, Service de Maladies Infectieuses, Paris, France.

Correspondence to Slim Fourati, Department of Virology, CERVI Pitie-Salpetriere Hospital, 83 boulevard de l'Hopital, 75013 Paris, France.

Tel: +33 142177418; fax: +33 142177411; e-mail: slim.fourati@psl.aphp.fr

Received: 20 May 2010; revised: 14 July 2010; accepted: 14 July 2010.

DOI:10.1097/QAD.0b013e32833e515a

variants. In addition, a novel mechanism mediated by human APOBEC3 (A3) cytidine deaminases (apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide-like 3) has been recently proposed to contribute to viral diversity in HIV-1-infected individuals [5,6] and possibly facilitate antiretroviral escape.

APOBEC3 molecules are cellular enzymes that inhibit various types of endogenous and exogenous retroviruses [7–9]. Several members of APOBEC family (A3A, A3B, A3C, A3DE, A3F, A3G and A3H) show varying degrees of antiviral potency with A3G and A3F generally regarded as exerting the strongest HIV-1 restriction [7,10–12]. APOBEC3 exert their HIV-1 restriction by, at least partially, catalyzing cytidine deamination in the HIV-1 minus-strand DNA during new target cell infection resulting in proviral guanosine (G) to adenosine (A) substitutions in the positive sense DNA strand [13–15]. These substitutions predominantly occur in a GG-to-GA (A3G) or GA-to-AA (A3F) dinucleotide context [8,12,14].

Viral replication in human cells expressing APOBEC3 molecules requires counteracting the antiviral activity of these deaminases by the viral protein Vif. HIV-1 Vif induces polyubiquitylation of APOBEC3 proteins and targets them for degradation by the proteasome, thereby preventing their incorporation into virions [16–18]. The N-terminal region of HIV-1 Vif is important for the specific association with APOBEC3 proteins suppression with several Vif-APOBEC3 interacting domains recently being mapped [19–22].

Polymorphisms in HIV-1 Vif could be important *in vivo* [5] since some Vif allelic variants display less anti-APOBEC activity than others [6,23]. Because some HIV-1 drug resistance mutations result from G-to-A substitutions in an A3G/A3F preferred dinucleotide context, recent investigations have focused on the possible contribution of partially active Vif mutants to viral escape from antiretroviral drugs [24,25]. Mulder *et al.* [24] demonstrated that partially active Vif alleles result in increased viral diversity and that cytidine deamination coupled with recombination can facilitate the emergence of antiretroviral drug resistance in cell culture.

We hypothesized that partially active Vif alleles should be found more frequently in patients failing antiretroviral treatment if partially defective Vif alleles contribute to the emergence of drug resistance *in vivo*. In this study we investigate Vif polymorphisms in circulating plasma viruses derived from HIV-1-infected individuals failing antiretroviral treatment and compared them to the Vif diversity found in antiretroviral-naïve patients. We show that certain Vif mutations are found expressly in the pretreated patient population and that a specific mutation (K22H) abrogates its antiviral activity in single cycle and spreading infections. We examined its consequences on

HIV-1 replication, the G-to-A mutation frequency and the appearance of drug-resistance mutations.

Materials and methods

Data collection

Plasma samples from 92 HIV-1-infected antiretroviral-experienced patients, for whom HIV-1 genotypic resistance was initiated because of highly active antiretroviral treatment (HAART) failure, were retrospectively analyzed. Resistance testing was performed by sequencing protease and reverse transcriptase regions following the French National consensus technique (www.hivfrenchresistance.org). As control group for this study, we analyzed 65 plasma samples from HIV-1-infected patients who were treatment-naïve and for whom HIV genotype testing was performed at the time of diagnosis. This study was approved by the ethical committee of the ANRS AC11.

Amplification and sequencing of patient-derived Vif alleles

RNA isolation, cDNA synthesis, and PCRs were performed as described previously [26]. For the first-round PCR, we used primer Vif1, 5'-cgggtttattacagggacagcag-3' (position 4899–4922 HxB2) and primer Vif2, 5'-cacccaattctgaaatgaa-3' (position 5774–5793 HxB2). The second-round PCR was performed using primer Vif3, 5'-tggaaagggtgaaggggca-3' (position 4956–4974 HXB2) and primer Vif4, 5'-ctagaaaatgtctaacagcttca-3' (position 5642–5666 HXB2). The PCR product was purified with an Amicon Microcon-100 centrifugal filter device (Millipore) for sequencing. Vif genes were sequenced in both directions.

Plasmids

LAI Vif was amplified from pLAI.2 (NIH Cat#2532) by PCR and cloned into the expression vector pCRV1 (Vif Eco+ 5'-atatgaattcgccatggaaaacagatggcaggt-3', Vif Not- 5'-agtcatagcggccgctagtgctcattcattgtatg-3'). The K22H mutation was introduced into LAI Vif by site-directed mutagenesis (Vif22H+ 5'-agaacatggcagactttagt-3', Vif22H- 5'-actaaactgtgccatgttct-3'). Additionally Vif mutation K22H was introduced into the molecular HIV-1 clone pNL4-3 by site-directed mutagenesis using QuickChange II XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene).

Virus stocks

HEK 293T were maintained in complete medium which consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with heat-inactivated fetal bovine serum (10%), 2 mmol/l glutamine, 170 mmol/l penicillin, and 40 mmol/l streptomycin at 37°C and 5% CO₂. Viral stocks were generated by transfecting 5 × 10⁶ 293T cells with plasmids using Lipofectamine Plus reagent (Invitrogen).

HIV-1 p24_{gag} antigen concentration in viral supernatants was determined after 48 h using Vidas Ag p24 II (Biomérieux).

Assessment of single-cycle infectivity using reporter cell lines

Viruses were generated by co-transfecting 500 ng of the NL4-3 delta Vif expression plasmid (NIH Cat#2481), 50 ng of Vif LAI or Vif mutant K22H expression plasmid and 100 ng of N-terminally FLAG-tagged human A3G into 293T cells. HEK 293T cells were plated at 1×10^5 cells per well in a 24-well plate and the transfection was done using polyethylenimine. Forty-four h later, the viruses were harvested and 20 μ l of the viral supernatant was used to infect TZM-bl reporter cells plated in a 96-well plate at 1×10^4 cells per well. Infections were done in duplicate and β -galactosidase activity was measured 48 h after infection with the Galacto-Star β -galactosidase Reporter Gene System (Applied Biosystems).

Spreading viral infections in T-cell lines

MT-2 T cells, which express A3G (termed 'nonpermissive') and Sup-T1 T cells, which express little or no A3G (termed 'permissive') were used for the multiple-round infection experiments. Cells were cultured in complete RPMI 1640 culture medium at 37°C and 5% CO₂. Viral stocks containing 25 ng of p24_{gag} antigen were added to 1×10^6 SupT-1 and MT-2 cells. Viruses produced were used to infect 5×10^5 SupT-1 and MT-2 cells for a second round of infection. Culture supernatants were collected every 1–3 days over 5 days and p24_{gag} antigen was quantified. Each experiment was performed in duplicate. Two independent experiments were performed.

Proviral DNA isolation, cloning and sequencing

Total DNA of infected cells was extracted using QIAamp blood DNA minikit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). To assess the frequency of proviral mutations, a 835-bp fragment encompassing a fragment of reverse transcriptase gene was amplified [primer 2pols, 5'-ccatacaactccag-tatttgc-3' (position 2712-2734 HxB2); PL1m 5'-cctgcttctgtatttctgctattaagtcttttg-3' (position 3514-3546 HxB2)]. Purified PCR products were cloned into the plasmid vector pCR4-TOPO (Invitrogen). Recombinant plasmid DNA was transformed into One Shot TOP10 chemically competent *Escherichia coli*. Clones DNA were reamplified by PCR for sequencing (546 nt-long-sequenced region). The PCRs and the cloning were repeated three times.

Degradation assay and Western blot

Vif activity with respect to A3G degradation was determined by co-transfection of 200 ng WT A3G-flag and 100 ng WT LAI Vif or K22H LAI Vif in 293T cells using polyethylenimine. 44 h later, the cells were lysed with 1% SDS lysis solution and the lysates were run a 10% Bis-Tris gel (NuPAGE, Invitrogen). The proteins were then transferred onto a PVDF membrane (Thermo

Scientific) and probed with anti-A3G C17 polyclonal antibody (NIH Cat# 10082) and anti-Vif polyclonal antibody (NIH Cat# 2221). The membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and then developed with SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce).

Statistical analyses

Comparisons between percentages were performed using the chi-squared or the Fisher's exact test when appropriate and comparisons between nominal and continuous variables were tested using the Mann-Whitney test. The 95% confidence intervals (CIs) were computed using the binomial distribution. Analyses were performed using Statview. Differences in the G-to-A mutation frequencies were analyzed using the Hypermut 2.0 program (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HYPERMUT/hypermut.html>). A sequence was considered hypermutated if it registered a *P* value of less than 0.05 on the Fisher's exact test that compared the number of G-to-A changes in APOBEC3 versus control contexts.

Results

Patient characteristics, antiretroviral treatment and drug-resistant variants

A total of 157 HIV-1 plasma viruses subtype B derived from infected patients (92 failing HAART and 65 treatment naive) were analyzed. The patient characteristics are listed in Table 1. The two groups were well balanced for sex, age and CD4+ cell count (CD4+ in HAART treated: 337 cells/ μ l, naive: 335 cells/ μ l). Differences between the two groups were noted with respect to plasma viremia (HAART-treated: HIV-1 RNA 4540 copies/ml; naive: 89505 copies/ml).

Patients failing treatment had been prescribed a median of eight different antiretroviral drugs since HAART initiation. All patients received nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitor (NRTI), non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) and protease inhibitor in their history. At the time of plasma sample collection, the frequency for mutations in reverse transcriptase and protease leading to reduced susceptibility to NRTI, NNRTI and protease inhibitor was 94.5, 53.3 and 64.1% respectively. We focused on the codon changes underlying drug resistance-associated mutations, in order to specifically screen G-to-A changes in GA/GG dinucleotides context. Such G-to-A changes result in G16E, D30N, M36I, M46I, G73S in PR and D67N, M184I and G190S in reverse transcriptase. Overall, these mutations accounted for 14.6% of all the observed HIV-1 drug-resistance mutations in the dataset. D67N, M46I and M36I were the most prevalent G-to-A mutations (48.9, 38 and 32.6%, respectively) followed by G190S, G73S, G16E and D30N (4–15%).

Table 1. Patient characteristics.

	Antiretroviral pretreated patients (<i>n</i> = 92)	Antiretroviral-naïve patients (<i>n</i> = 65)
Sex		
Male <i>n</i> , (%)	76 (82.6%)	61 (93.8%)
Female <i>n</i> , (%)	16 (17.4%)	4 (6.2%)
Age [median (IQR) years]	46 (32–82)	41 (24–60)
Plasma HIV-1 RNA copies/ml, median (IQR)	4540 (114–342 000)	89 505 (1034–43 29 802)
CD4 cell count cells/ μ l, median (IQR)	337 (9–1396)	335 (11–853)
No. of antiretroviral drugs previously received, median (IQR)	8 (2–19)	–
Antiretroviral treatment at plasma collection		
NRTI <i>n</i> , (%)	86 (93.5%)	–
NNRTI <i>n</i> , (%)	14 (15.2%)	–
PI <i>n</i> , (%)	66 (71.7%)	–
Drug resistance associated mutations (PR, RT) at plasma collection		
NRTI <i>n</i> , (%)	87 (94.5%)	1 (1.5%)
NNRTI <i>n</i> , (%)	49 (53.3%)	0
PI <i>n</i> , (%)	59 (64.1%)	1 (1.5%)

NRTI, nucleotide reverse transcriptase inhibitor; NNRTI, non-nucleotide reverse transcriptase inhibitor; PI, protease inhibitor.

HIV-1 Vif diversity among pretreated and antiretroviral-naïve patients

A total of 157 full-length Vif sequences, amplified from plasma viral RNA, were available for analysis. We compared the polymorphisms in the Vif alleles derived from individuals experiencing virologic treatment failure (*n* = 92) with those of therapy-naïve individuals (*n* = 65). Overall, the Vif proteins were highly polymorphic with at least half of the positions within the coding region

being variable (96/192 residues in therapy-naïve patients and 102/192 residues altered in pretreated patients). Using the entropy program (<http://www.hiv.lanl.gov/cgi-bin/ENTROPY>) to compare the Vif amino acids substitutions between the two populations we identified four single positions that were more polymorphic in pretreated patients: K22 ($P=0.01$), Y30 ($P=0.03$), L153 ($P=0.05$) and K157 ($P=0.05$; Fisher's exact test).

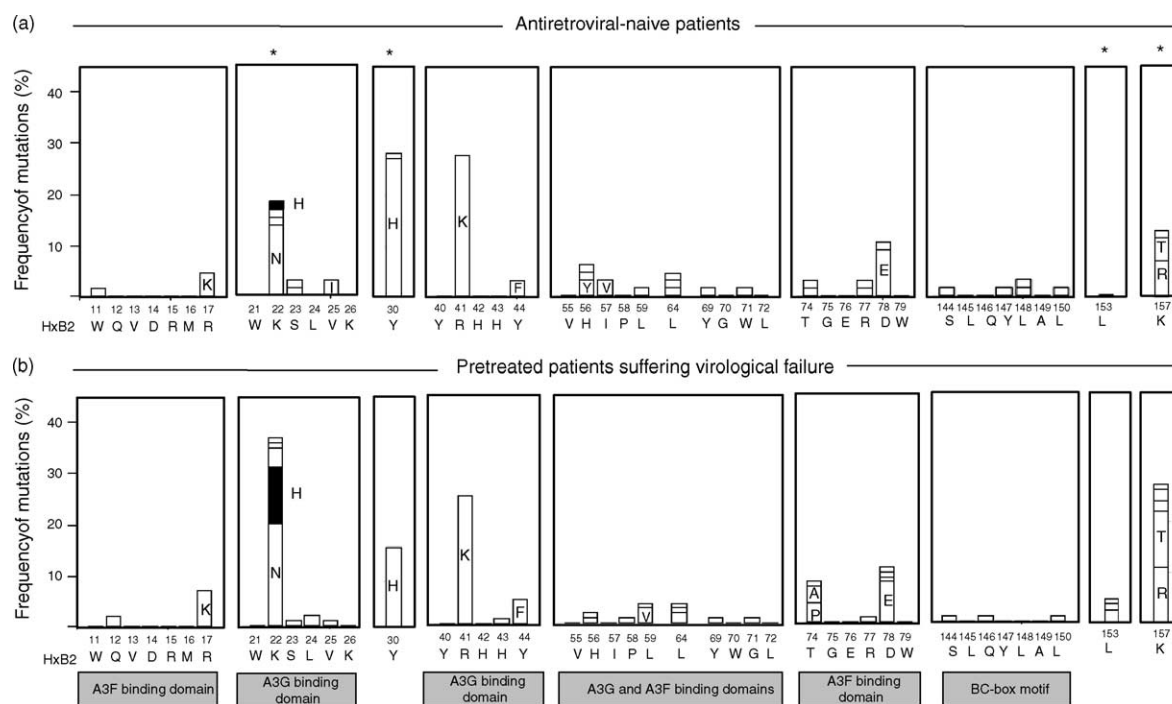


Fig. 1. Frequency of mutations in the functional domains of HIV-1 Vif. The amino acids variation shown is based on 65 sequences derived from naïve patients and 92 sequences derived from pretreated patients failing HAART. The variation in six functional Vif domains (Vif/APOBEC3 interacting domains and the BC-box motif) is shown for each of the two patient populations. Additionally, the four positions that were statistically more polymorphic in pretreated patients (K22, Y30, L153, K157) are also shown in the figure; they are indicated by asterisk (*). The amino acids representing at least 4% of the sequences are depicted and identified in the bars. HxB2 was used as reference sequence. HAART, highly active antiretroviral treatment.

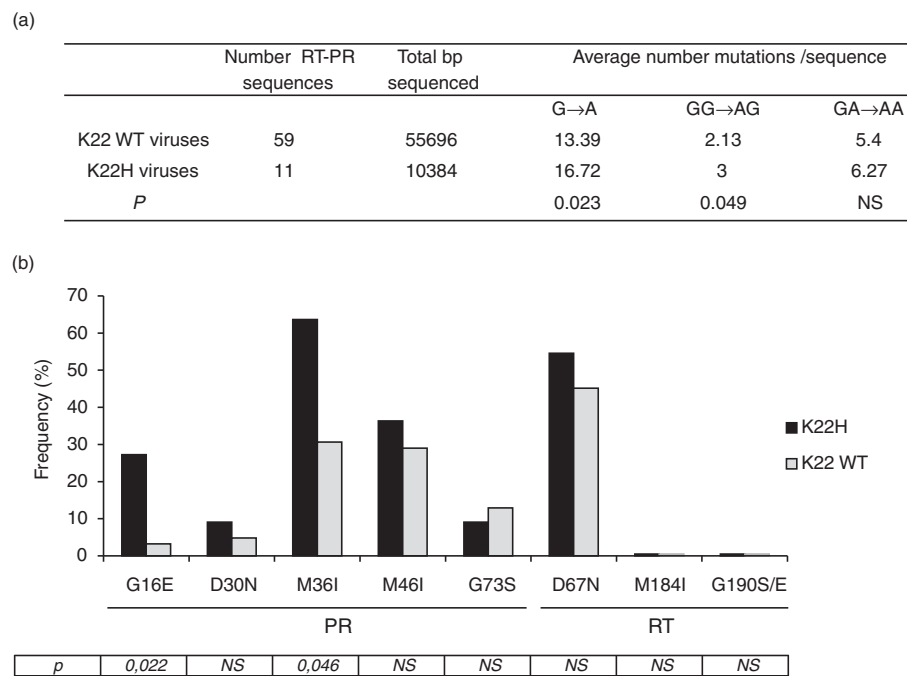


Fig. 2. G-to-A mutations are more frequent in patients derived HIV-1 K22H viruses. (a) The G-to-A mutation was assessed by analyzing a total of 70 sequences (944 bp each) of protease (PR) and reverse transcriptase (RT) derived from plasma K22H and K22 WT viruses. Comparisons between G-to-A mutations were tested using the Mann–Whitney test. (b) Frequency of drug-resistance mutations in PR and RT occurring in a GA/GG dinucleotide context in plasma K22H and K22 WT viruses. The mutations on the X-axis represent the G-to-A drug-resistance-associated mutations (GA/GG dinucleotide context) in PR or RT. The black and gray bars represent the frequency of mutations in pretreated patients infected by Vif_{K22H} viruses and WT K22 viruses, respectively. G16E and M36I mutations are more frequent in Vif_{K22H} viruses compared to other Vif variants. NS: not significant. Comparisons between percentages were performed using the Fisher’s exact test.

Because functional Vif domains are conserved [5] and mutations in these domains may control interactions with APOBEC3 enzymes, we focused our analysis on the genetic variation within these regions. Figure 1 shows the polymorphisms in six functional domains of Vif (Vif/APOBEC3 interacting domains and the BC-box motif). These regions were either very conserved or equally polymorphic (i.e. R17K, R41K, Y44F, D78E) in both patient populations with the exception of residue K22. Analyzing polymorphisms at position K22, we show that, whereas K22N is equally found in both populations (Fig. 1) and K22I, K22Q and K22T occasionally detected, substitution K22H was detected in 12% (11/92) of the patients failing HAART compared to only 1.5% (1/65) in treatment-naïve patients ($P=0.015$; Fisher’s exact test). Taken together, we identified four positions in Vif that are polymorphic in patients failing HAART (K22, Y30, L153, K157) with a specific substitution at one of these positions (K22H) being found 10 times more often in viruses derived from patients experiencing virologic failure.

Association of Vif K22H with G-to-A mutations in reverse transcriptase and protease derived from pretreated patients

Lysine (K) at position 22 is known to be important for A3G neutralization [23] and we next aimed to determine

whether the K22H mutation in Vif (Vif_{K22H}) is associated *in vivo* with a higher rate of G-to-A mutations. For this purpose, we analyzed the protease-reverse transcriptase (PR–RT) regions of the 11 patients failing HAART and harboring Vif_{K22H} viruses and compared them with the 59 PR–RT sequences from pretreated patients harboring Vif K22 WT viruses (Vif_{K22 WT}).

The PR–RT nucleotide sequences derived from Vif_{K22H} viruses displayed a 21% increase in G-to-A mutations ($P=0.023$; Mann–Whitney test). We observed a trend towards increased number of G-to-A mutations in an A3G context (GG-to-AG) compared to sequences from Vif_{K22 WT} variants (35% increase, $P=0.049$; Mann–Whitney test) (Fig. 2a). Interestingly, when focusing only on the drug-resistance-associated mutations, we noted that 72% ($n=8/11$) of Vif_{K22H} variants but only 44% ($n=26/59$) of Vif_{K22 WT} variants harbored at least two drug-resistance-associated mutations in a GA/GG dinucleotide context. Specifically, G16E and M36I were more prevalent ($P=0.022$ and $P=0.046$) in Vif_{K22H} viruses than in Vif_{K22 WT} variants (Fig. 2b).

Determination of the anti-A3G activity of Vif mutant K22H

We next assessed directly the anti-A3G activity of Vif mutant K22H using a single cycle infectivity assay.

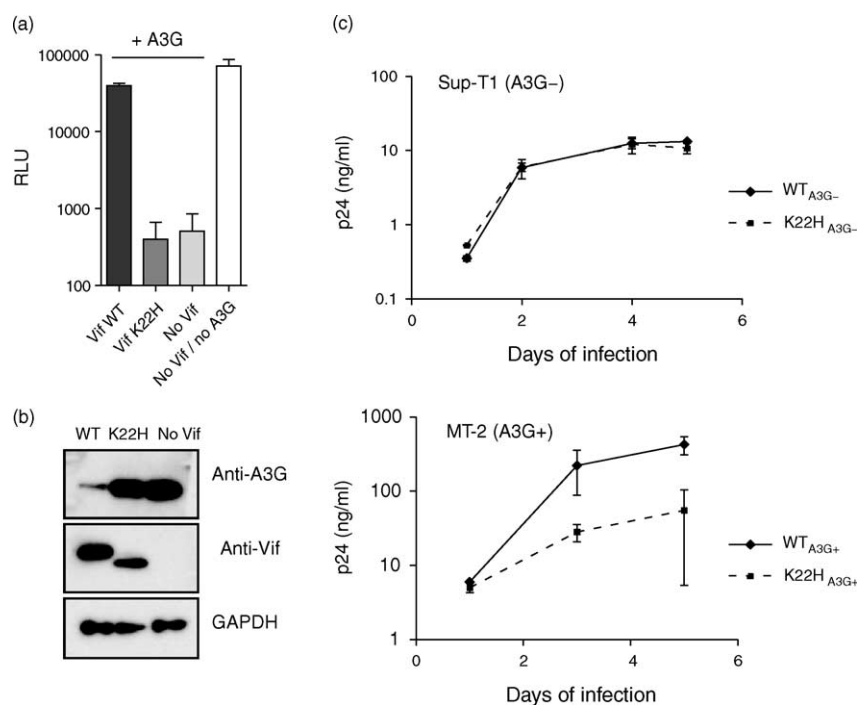


Fig. 3. Assessment of the anti-A3G activity of Vif mutant K22H. (a) Single cycle infectivity of viruses complemented with Vif K22H was assessed on TZM-bl reporter cells. Relative light units (RLUs) are shown. (b) Vif-mediated degradation of A3G was assessed by Western blotting of transfected cell lysates. In contrast to wild-type Vif, mutant K22H does not degrade A3G. The K-to-H substitution also alters the migration properties of the protein resulting in a seemingly shorter protein band. Three independent experiments were performed. (c) Replication kinetics of full-length HIV-1 WT and K22H in T-cell lines. HIV-1 WT_{A3G-} and K22H_{A3G-} mutant produced on the permissive Sup-T1 cells (equivalent 5 ng p24_{gag}) were used to reinfect Sup-T1 target cells. Similarly, HIV-1 WT_{A3G+} and K22H_{A3G+} mutant produced on the nonpermissive MT-2 cells (equivalent 15 ng p24_{gag}) were used to reinfect MT-2 target cells. Supernatants were collected every 2–4 days and assayed for viral p24 antigen. At the end of infection, cells were collected and proviral DNA WT_{A3G-}, K22H_{A3G-}, WT_{A3G+} and K22H_{A3G+} mutants were extracted for amplification, cloning and sequencing. Two independent experiments were performed.

Figure 3a shows that Vif mutant K22H fails to completely neutralize A3G (K22H: average RLU 279; No Vif: average RLU 399). As a control, we used wild-type Vif which, in the presence of A3G, resulted in the production of viruses with 50% infectivity (average RLU 39797) of viruses produced in the absence of A3G (average RLU 70848). This failure of Vif K22H to restore viral infectivity in the presence of A3G correlated with the lack of A3G degradation as assessed by Western blotting of transfected cell lysates (Fig. 3b). The Western blot also reveals that Vif K22H was less expressed than wild type and that the lysine-to-histidine substitution at position 22 affected the migration of the mutant protein (Fig. 3b). Taken together, the Vif mutant K22H is, at least partially, defective for A3G neutralization.

Replication kinetics of K22H Vif mutant NL4-3

We next examined the impact of the Vif K22H mutation on Vif function in the context of the full-length virus. WT NL4-3 and K22H Vif mutant NL4-3 viral stocks were used to infect permissive Sup-T1 cells resulting in the production of WT_{A3G-} and K22H_{A3G-} viruses, and MT-2 nonpermissive cells resulting in the production of WT_{A3G+} and K22H_{A3G+}. In the second round of

infection, measurement of the viral p24_{gag} antigen showed that viruses WT_{A3G-} and K22H_{A3G-} produced on the Sup-T1 cells exhibit similar replication abilities (Fig. 3c). In contrast, using viruses produced in MT-2 cells, K22H_{A3G+} replication was significantly reduced compared to WT_{A3G+} since the first days of infection. At day 5, fitness differences between WT_{A3G+} and K22H_{A3G+} mutant ranged between 6-fold and 17-fold in two independent experiments (Fig. 3c). These results suggest that NL4-3 Vif mutant K22H fails to neutralize A3G, findings which are in good agreement with the single cycle infectivity results.

Viral diversity in T cells infected with K22H_{A3G-} and K22H_{A3G+} Vif mutants

To determine the impact of the Vif K22H mutation on A3G-driven mutagenesis of the proviral archives, we collected Sup-T1 and MT-2 cells at the end of the spreading infection experiments, extracted proviral DNA PCR-amplified, cloned and sequenced a 546 nt-long portion of the RT region. A total of 183 clones were analyzed, 30 derived from proviral DNA WT_{A3G-}, 31 from DNA K22H_{A3G-}, 60 from proviral DNA WT_{A3G+}, and 63 from proviral DNA K22H_{A3G+}. As expected,

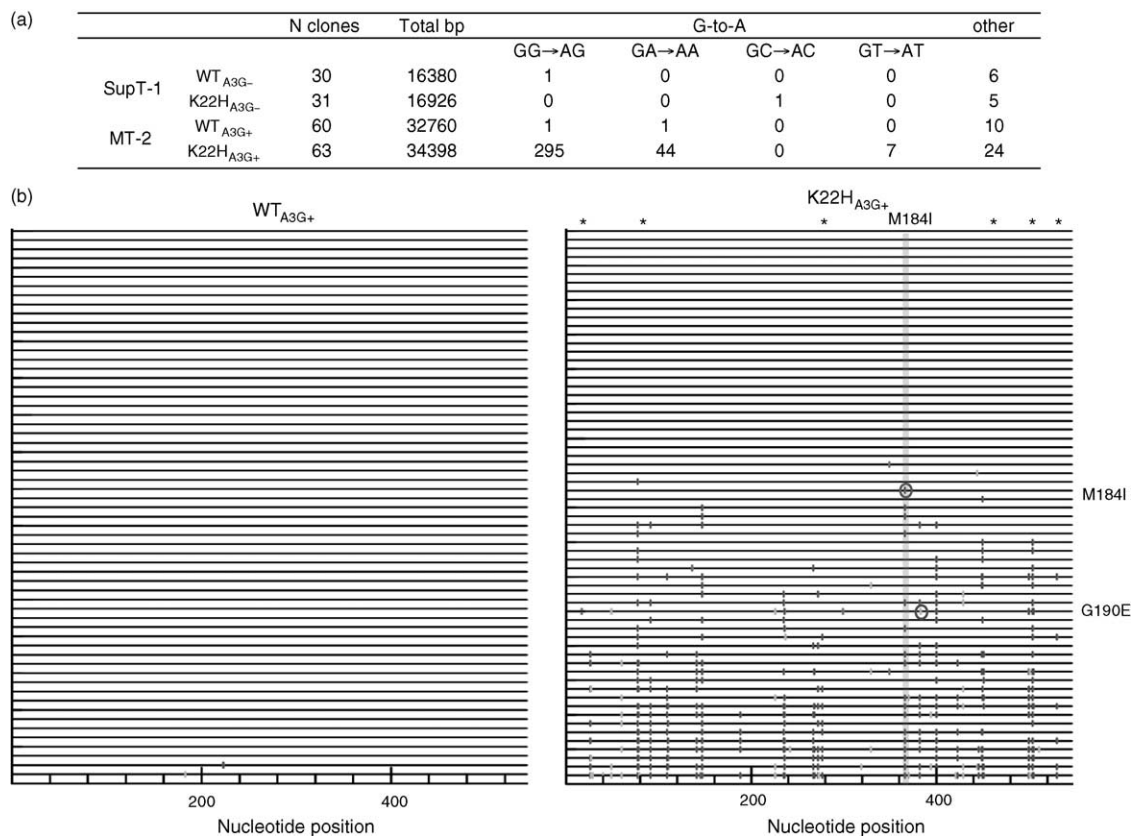


Fig. 4. Evidence of A3G-induced mutations in the RT regions of proviral clones derived from Vif K22H infections. (a) Summary of the mutations observed by wild-type and K22H viruses derived from parallel infections of supT1 (WT_{A3G-}, K22H_{A3G-}) and MT-2 (WT_{A3G+}, K22H_{A3G+}) cells. The number of G-to-A mutations (G-to-A), its dinucleotide context, the number of any other mutations (Other), the number of clones (N clones) and the number of sequenced nucleotides (total bp) are listed. (b) Graphic representation of the G-to-A changes in a panel of proviral DNA sequences of individual clones from MT2 infection of WT_{A3G+} and K22H_{A3G+}. Each bar represents one clone. The nucleotides are numbered at the bottom of each panel, indicating position within the 546-nucleotide region. G-to-A changes in each clone sequence compared to the consensus sequence are indicated by bars as follows: GG-to-AG (dark gray bars), GA-to-AA (light gray bars). M184I was detected in 16 proviral clones derived from K22H_{A3G+} infection (light gray column) and in not a single WT_{A3G+} proviral sequence. One clone displayed only one mutation M184I and another clone harbored an NNRTI G-to-A drug-resistant mutation G190E. The PCRs and the cloning were repeated three times. * indicates stop codons. Differences in the G-to-A mutation frequencies were analyzed using the Hypermut 2.0 program (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HYPERMUT/hypermut.html>). NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; RT, reverse transcriptase.

proviral clones derived from WT_{A3G-} and K22H_{A3G-} infections showed very few G-to-A mutations since these infections were conducted in Sup-T1 permissive cells. Among the WT_{A3G+} proviral clones, only two (1.5%) harbored a single G-to-A mutation (Fig. 4a, 4b).

In contrast, proviral clones derived from K22H_{A3G+} were highly variable with 57% of the clones ($n = 36$) harboring at least one G-to-A mutation with the majority of these clones exhibiting a wide range of G-to-A substitutions (range 1–34, mean 9.6) (Fig. 4a, b). Using the Hypermut 2.0 program, 28.5% ($n = 18$) were scored as heavily hypermutated ($P < 0.05$; Fisher's exact test). The observed substitutions were almost entirely restricted to G-to-A mutations in a GG or GA dinucleotide context. All severely mutated sequences encoded one or several

premature stop codons. These stop codons occurred in the context of a tryptophan codon (TGG-to-TGA) at positions 71, 88, 153, 212, 229, 239 of reverse transcriptase. However, four of the modestly mutated sequences ($n = 18$, not characterized as 'hypermutated' by Hypermut program) encoded an open reading frame (see next paragraph for drug resistance in these clones).

We focused next on drug-resistance mutations in reverse transcriptase that may occur as result of A3G deamination. Mutation M184I in reverse transcriptase associated with high level resistance to the 2',3'-didéoxy-3'-thiacytidine (3TC) [8] was detected in 25% ($n = 16$) of the proviral clones derived from K22H_{A3G+} infection but not in a single WT_{A3G+} proviral sequence. Most of the proviruses encoding M184I also harbored stop codons although

three of these sequences encoded an intact protein open reading frame with one sequence displaying only one mutation, M184I (Fig. 4b). Interestingly, one clone contained one more drug-resistance-associated mutation resulting from G-to-A change in an A3F favored context: G190E in reverse transcriptase which is known to confer resistance to NNRTIs (Fig. 4b). Taken together, K22H increases considerably the proviral diversity and creates a pool of proviruses encoding specific resistance associated mutations. The emergence of drug-resistance-associated mutations was, under these experimental conditions, fully independent of any drug exposure.

Discussion

Our understanding on the effects of APOBEC3 on HIV-1 adaptation and diversification in infected patients is currently incomplete [25,27,28]. This study investigates whether mutations in Vif (and indirectly endogenous expression levels of APOBEC3G) facilitates emergence of HIV-1 drug resistance mutations *in vivo*.

We found four polymorphic positions in Vif (K22, Y30, L153, K157) to be associated with antiretroviral treatment failure by comparing Vif sequences from 92 patients failing antiretroviral treatment and from 65 antiretroviral-naïve patients (Fig. 1). We focused on the K22H mutation since it was ten times more frequent in patients failing HAART and, moreover, it was the only one of the four polymorphic positions mapping to a known functional domain of Vif. Future studies will dissect the putative contributions of Vif polymorphisms at positions Y30, L153 and K157.

In addition to genotyping the Vif alleles, we employed a functional test to determine the anti-A3G activity of the K22H mutant and demonstrated that this mutant fails to completely neutralize A3G with evident lack of A3G degradation, suggesting that its interaction with A3G is at least partially altered. It is well established that HIV-1 Vif inactivates A3G and A3F through distinct motifs and that single-nucleotide substitutions in these domains may alter partially or totally the cytidine deaminases suppression [23]. In particular, at position 22, it has been demonstrated that changes in AA can have an impact on Vif function [22,23,29]. Substituting alanine (A) or arginine (R) at this position in Vif retained the ability to interact with A3G and A3F proteins, whereas aspartate (D) or glutamate (E) substitutions abolished interaction with A3G but not A3F [22,29]. Here, we show that histidine (H) 22 also alters Vif function against A3G.

We monitored viral replication of a NL4-3 virus harboring mutation K22H in permissive A3G(-) (Sup-T1) and nonpermissive A3G(+) (MT-2) cells. In good agreement

with other studies [24], we show that this attenuated Vif variant displayed reduced fitness when passaged repeatedly in A3G (+) cells (MT2) but not in A3G (-) cells (SupT1). Contrary to WT NL4-3, infection of MT-2 cells by Vif K22H resulted in a proviral population characterized by a wide spectrum of G-to-A mutations, predominantly in a GG-to-AG context. GG dinucleotides are the specific target for A3G, suggesting that A3G is mainly responsible for the G-to-A mutations.

As a consequence of G-to-A substitutions, a quarter of the K22H proviruses recovered from MT2 cells encoded the 3TC resistance-associated mutation M184I in reverse transcriptase. Similarly, sequences derived from HIV-infected patients [30] as well as other *in-vitro* studies [24] have described M184I in the reverse transcriptase region of G-to-A hypermutated proviruses in the absence of any lamivudine exposure. Although premature stop codons detected in most of these clones likely result in nonfunctional proteins, it is interesting to point to the fact that 18.7% of the M184I carried clones harboring no or only one supplemental substitution (Fig. 4). Furthermore, we analyzed the *in-vivo* impact of Vif K22H mutation on G-to-A changes observed in sequences derived from pretreated patients failing HAART. Reverse transcriptase and protease bulk sequencing of plasma variants with Vif_{K22H} showed a higher frequencies of G-to-A mutations compared to those from Vif_{K22 WT} variants and, importantly, we show that these Vif variants harbored significantly more G-to-A-encoded drug-resistance mutations in protease. However, the increased frequency G-to-A mutations observed in sequences derived from plasma HIV-1 K22H RNA was less obvious than what we observed in proviral DNA recovered from *in-vitro* spreading infections by K22H virus. This observation is in agreement with a recent study describing that proviral DNAs contained the highest level of G-to-A mutations and viral RNA genome contained the least G-to-A mutations [31]. We also need to consider that the population sequencing approach used for genotypic drug resistance testing fails to detect minority populations and we cannot exclude that a small proportion of the plasma viruses K22H carry a higher number G-to-A mutations and/or other G-to-A drug-resistance mutations.

In conclusion, the evidence that patients failing antiretroviral treatment frequently harbored a specific Vif variant (K22H) suggests an important role of APOBEC3 proteins in development of HIV-1 drug resistance *in vivo*. Patients harboring viral strains encoding Vif K22H could be more likely to develop resistance to certain antiretroviral agents as this mutation is able to decrease the efficacy of Vif function and to promote the selection of some G-to-A drug-resistance mutations. Future studies are needed to establish the predictive value of Vif mutations for treatment failure and establish a causal correlation between Vif function and drug escape during HIV-1 infection.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS), the Association de Recherche en Virologie et Dermatologie (ARVD) and the European Community's Seventh framework Program (FP7/2007–2013) under the project 'Collaborative HIV and Anti-HIV Drug Resistance Network (CHAIN)'. Viviana Simon is a Sinsheimer Scholar and this work was supported by the NIH/NIAID grant R01 AI064001.

Author contributions: S.F., V.S., V.C. and A.-G.M. designed research, were involved in interpretation of the data and wrote the paper.

S.F., I.M., M.B., S.B., M.W. and S.S. performed research.

A.S. and C.K. were responsible for patient management.

V.S., V.C., A.-G.M., S.F., I.M., M.B., S.B., S.S., M.W., A.S. and C.K. did the critical revision of the article. All authors approved the final version of the article.

References

- Mansky LM, Temin HM. **Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase.** *J Virol* 1995; **69**:5087–5094.
- Moutouh L, Corbeil J, Richman DD. **Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**:6106–6111.
- Jetz AE, Yu H, Klarmann GJ, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP. **High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome.** *J Virol* 2000; **74**:1234–1240.
- Levy DN, Aldrovandi GM, Kutsch O, Shaw GM. **Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**:4204–4209.
- Pace C, Keller J, Nolan D, James I, Gaudieri S, Moore C, Mallal S. **Population level analysis of human immunodeficiency virus type 1 hypermutation and its relationship with APOBEC3G and vif genetic variation.** *J Virol* 2006; **80**:9259–9269.
- Piantadosi A, Humes D, Chohan B, McClelland RS, Overbaugh J. **Analysis of the percentage of human immunodeficiency virus type 1 sequences that are hypermutated and markers of disease progression in a longitudinal cohort, including one individual with a partially defective Vif.** *J Virol* 2009; **83**:7805–7814.
- Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. **Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein.** *Nature* 2002; **418**:646–650.
- Bishop KN, Holmes RK, Sheehy AM, Davidson NO, Cho SJ, Malim MH. **Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins.** *Curr Biol* 2004; **14**:1392–1396.
- Esnault C, Heidmann O, Delebecque F, Dewannieux M, Ribet D, Hance AJ, *et al.* **APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses.** *Nature* 2005; **433**:430–433.
- Wiegand HL, Doehle BP, Bogerd HP, Cullen BR. **A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins.** *EMBO J* 2004; **23**:2451–2458.
- Zheng YH, Irwin D, Kurosu T, Tokunaga K, Sata T, Peterlin BM. **Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication.** *J Virol* 2004; **78**:6073–6076.
- Liddament MT, Brown WL, Schumacher AJ, Harris RS. **APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo.** *Curr Biol* 2004; **14**:1385–1391.
- Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, *et al.* **DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection.** *Cell* 2003; **113**:803–809.
- Yu Q, Konig R, Pillai S, Chiles K, Kearney M, Palmer S, *et al.* **Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome.** *Nat Struct Mol Biol* 2004; **11**:435–442.
- Miyagi E, Opi S, Takeuchi H, Khan M, Goila-Gaur R, Kao S, Strebel K. **Enzymatically active APOBEC3G is required for efficient inhibition of human immunodeficiency virus type 1.** *J Virol* 2007; **81**:13346–13353.
- Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH. **The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif.** *Nat Med* 2003; **9**:1404–1407.
- Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D. **HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation.** *Nat Med* 2003; **9**:1398–1403.
- Coticello SG, Harris RS, Neuberger MS. **The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G.** *Curr Biol* 2003; **13**:2009–2013.
- Dang Y, Davis RW, York IA, Zheng YH. **Identification of 81LGxGxxIxW89 and 171EDRW174 domains from human immunodeficiency virus type 1 Vif that regulate APOBEC3G and APOBEC3F neutralizing activity.** *J Virol* 2010; **84**:5741–5750.
- He Z, Zhang W, Chen G, Xu R, Yu XF. **Characterization of conserved motifs in HIV-1 Vif required for APOBEC3G and APOBEC3F interaction.** *J Mol Biol* 2008; **381**:1000–1011.
- Russell RA, Pathak VK. **Identification of two distinct human immunodeficiency virus type 1 Vif determinants critical for interactions with human APOBEC3G and APOBEC3F.** *J Virol* 2007; **81**:8201–8210.
- Chen G, He Z, Wang T, Xu R, Yu XF. **A patch of positively charged amino acids surrounding the human immunodeficiency virus type 1 Vif SLVx4Yx9Y motif influences its interaction with APOBEC3G.** *J Virol* 2009; **83**:8674–8682.
- Simon V, Zennou V, Murray D, Huang Y, Ho DD, Bieniasz PD. **Natural variation in Vif: differential impact on APOBEC3G/3F and a potential role in HIV-1 diversification.** *PLoS Pathog* 2005; **1**:e6.
- Mulder LC, Harari A, Simon V. **Cytidine deamination induced HIV-1 drug resistance.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**:5501–5506.
- Albin JS, Harris RS. **Interactions of host APOBEC3 restriction factors with HIV-1 in vivo: implications for therapeutics.** *Expert Rev Mol Med* 2010; **12**:e4.
- Malet I, Delelis O, Valantin MA, Montes B, Soulie C, Wiriden M, *et al.* **Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro.** *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**:1351–1358.
- Berkhout B, de Ronde A. **APOBEC3G versus reverse transcriptase in the generation of HIV-1 drug-resistance mutations.** *AIDS* 2004; **18**:1861–1863.
- Pillai SK, Wong JK, Barbour JD. **Turning up the volume on mutational pressure: is more of a good thing always better? (a case study of HIV-1 Vif and APOBEC3).** *Retrovirology* 2008; **5**:26.
- Dang Y, Wang X, Zhou T, York IA, Zheng YH. **Identification of a novel WxSLVK motif in the N terminus of human immunodeficiency virus and simian immunodeficiency virus Vif that is critical for APOBEC3G and APOBEC3F neutralization.** *J Virol* 2009; **83**:8544–8552.
- Kieffer TL, Kwon P, Nettles RE, Han Y, Ray SC, Siliciano RF. **G→A hypermutation in protease and reverse transcriptase regions of human immunodeficiency virus type 1 residing in resting CD4+ T cells in vivo.** *J Virol* 2005; **79**:1975–1980.
- Russell RA, Moore MD, Hu WS, Pathak VK. **APOBEC3G induces a hypermutation gradient: purifying selection at multiple steps during HIV-1 replication results in levels of G-to-A mutations that are high in DNA, intermediate in cellular viral RNA, and low in virion RNA.** *Retrovirology* 2009; **6**:16.

Article 2

AIDS 2012 (sous presse)

**E138K and M184I Mutations in HIV-1 Reverse Transcriptase Co-Emerge as
a result of APOBEC3 Editing in the Absence of Drug Exposure**

Slim Fourati, Isabelle Malet, Sidonie Lambert, Cathia Soulie, Marc Wirden, Philippe Flandre,
Djeneba Bocar Fofana, Sophie Sayon, Anne Simon, Christine Katlama, Vincent Calvez, Anne-
Geneviève Marcelin. Geneviève Marcelin

E138K and M184I mutations in HIV-1 reverse transcriptase co-emerge as a result of APOBEC3 editing in the absence of drug exposure

Slim Fourati^{a,b,c}, Isabelle Malet^{a,b,c}, Sidonie Lambert^{a,b,c}, Cathia Soulie^{a,b,c}, Marc Wirden^{a,b,c}, Philippe Flandre^{a,b}, Djeneba Bocar Fofana^{a,b,c}, Sophie Sayon^{b,c}, Anne Simon^{a,b,c}, Christine Katlama^{a,b,c}, Vincent Calvez^{a,b,c} and Anne-Geneviève Marcelin^{a,b,c}

Background: Recent clinical trials with rilpivirine combined with emtricitabine and tenofovir revealed that patients failing treatment frequently harbored viruses encoding resistance associated mutations in the HIV-1 reverse transcriptase at position E138K and M184I. We show here that APOBEC3 proteins play a role in the emergence of these drug resistance mutations.

Methods: We used a Vif mutant that has suboptimal activity against APOBEC3 to assess the *in vitro* frequency of APOBEC3-induced resistance mutations in reverse transcriptase. To assess the degree of *in vivo* G-to-A viral hypermutation, a large data of HIV-1 RT proviral sequences from PBMCs recovered from infected patients under HAART was analyzed.

Results : *In vitro* replication experiments in cell lines with and without APOBEC3 expression suggest that APOBEC3 driven mutagenesis contributes to the generation of both M184I and E138K within HIV proviral repository in the absence of drug exposure. Additionally, analysis of 601 patients PBMCs sequences revealed that the co-presence of mutations E138K and M184I were never detected in non-hypermutated sequences whereas these mutations were found at a high frequency (24%) in the context of APOBEC3 editing and in the absence of exposure to etravirine/rilpivirine.

Conclusion: We demonstrate using *in vitro* experiments and analyzing patients PBMCs sequences that M184I and E138K resistance associated mutations may pre-exist in proviral reservoir at a high frequency prior to drug exposure, as a result of APOBEC3 editing. Thus, incomplete neutralization of one or more APOBEC3 proteins may favor viral escape to rilpivirine-emtricitabine.

© 2012 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

AIDS 2012, **26**:000–000

Keywords: APOBEC3, resistance-associated mutations, reverse transcriptase, rilpivirine, viral diversity

^aUniversité Pierre et Marie Curie-Paris, France, ^bINSERM UMR S-943, Paris, France, and ^cAP-HP, Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière, Laboratoire de Virologie, Paris France.

Correspondence to Slim Fourati, MD, INSERM U943, 83, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

Tel: +33142177418; fax: +33142177411; e-mail: slim.fourati@psl.aphp.fr

Received: 6 February 2012; revised: 24 April 2012; accepted: 17 May 2012.

DOI:10.1097/QAD.0b013e3283560703

Introduction

HIV-1 variation results from a combination of factors including the error proness of the reverse transcriptase, recombination and rapid rates of viral replication [1–3]. In addition, APOBEC3 restriction factor family (A3) is likely to contribute to HIV sequence diversification [4–10]. The A3 proteins comprise seven cytidine deaminases (A3A–A3H); some of the members of this family (eg. A3G, A3F, A3H) have the ability to cause HIV-1 guanine-to-adenine (G-to-A) hypermutation [7,11]. G-to-A hypermutation mostly occur in GG or GA dinucleotide contexts, attributed predominantly to A3G and A3F respectively. Despite being counteracted by HIV-1 Vif protein, A3 proteins are incompletely neutralized *in vivo* as evidenced for infected patients harboring G-to-A hypermutated proviruses [7,12–15]. Although hypermutated genomes are usually thought to be defective, A3G has been shown to induce sublethal mutagenesis at physiological levels: *in vitro* mutated viruses carrying mutations at A3G hot spots were able to produce infectious replication-competent progeny [10]. Additionally, HIV can shape new diversity through recombination of a non-hypermutated replication-competent virus with lethally hypermutated genome residing in the same cell [5]. Such sequences certainly contribute to viral diversity and have been shown to lead to drug resistance [5,8,9].

In the era of highly active antiretroviral therapy (HAART), viral escape to antiretrovirals (ARV) becomes rare and is usually the consequence of the accumulation of specific drug resistance mutations to a drug regimen. ARV failure may be facilitated if several drug resistance mutations pre-exist or appear in the same context. Clinical trials of Rilpivirine (RPV), a novel nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), in association with two nucleos(t)ides reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), emtricitabine (FTC) and tenofovir (TDF) in treatment naïve patients (ECHO and THRIVE) showed that E138K and M184I were the most frequent mutations to co-emerge in patients who failed this combination [16,17]. E138K and M184I mutations both result from G-to-A transitions in APOBEC3 contexts (GA and GG respectively). M184I has been extensively studied [18,19] and its appearance before M184V in patients failing lamivudine/emtricitabine has been attributed to APOBEC3G editing [5,8]. In contrast, E138K is a recently identified drug resistance mutation that has been shown to emerge under selection of second-generation NNRTIs (etravirine (ETR) and rilpivirine (RPV)) [20–23]. Because E138K and M184I mutations may occur as a result of APOBEC3 editing and because both mutations are often co-selected in patients failing RPV-FTC-TDF, we propose here to investigate the potential role of APOBEC3 as a source of viral escape to this drug combination. We used a well-characterized *in vitro* system to show that both M184I and E138K mutations in RT are archived in proviral DNA as a result of APOBEC3 editing. We further assessed the relevance of the observed mutations *in vivo*, based on our patients PBMCs sequence database.

in vitro system to show that both M184I and E138K mutations in RT are archived in proviral DNA as a result of APOBEC3 editing. We further assessed the relevance of the observed mutations *in vivo*, based on our patients PBMCs sequence database.

Methods

To assess viral diversity and drug resistance associated-mutations (DRAMs) imposed by APOBEC3G *in vitro*, we used a NL4–3 Vif K22H mutant that has suboptimal activity against A3G [9] to infect MT-2 [24] (A3G-expressing cell lines) and Sup-T1 cells (cell lines that express little or no A3G) as previously described [9]. HIV-1 viral stocks were obtained by transfection of HEK 293 T cells [9]. Viral stocks were used to infect either SupT1 or MT2 cells. At day 5 post-infection, supernatants were collected to re-infect new cells from the same lineage (either SupT1 or MT2) for 5 days. At the end of the second infection, proviral DNA was extracted using QIAamp blood DNA minikit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Each experiment was performed in duplicate and 3 independent experiments were performed. The identity and frequency of proviral mutations in HIV quasi-species recovered from MT2 and SupT1 cells were analyzed using molecular cloning and sequencing on the reverse transcriptase region as previously described [9]. We pooled three PCR for each cloning to avoid amplification bias. A total of 123 clones were analyzed (30 to 38 clones per experiment).

Furthermore, to assess the degree of *in vivo* G-to-A hypermutation of HIV-1 and consequent diversity, 601 HIV-1 RT proviral sequences from PBMCs recovered from HIV-1 infected patients under HAART were analyzed. Differences in the G-to-A mutation frequencies were analyzed using the Hypermut 2.0 program (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HYPERMUT/hypermut.html>). A sequence was considered hypermutated if it registered a P value of less than 0.05 on the Fisher's exact test that compared the number of G-to-A changes in APOBEC3 versus control contexts. HIV-1 RT sequences recovered from PBMCs related to this work have been submitted to GenBank and were given accession numbers JQ395570 through JQ396170.

Results

As expected, infection of Sup-T1 cells (APOBEC3G-) in the absence of drugs with either WT or partially active (against APOBEC3G) Vif K22H mutant results in minor diversity in proviral quasi-species after two rounds of infections because these cells do not express APOBEC3G

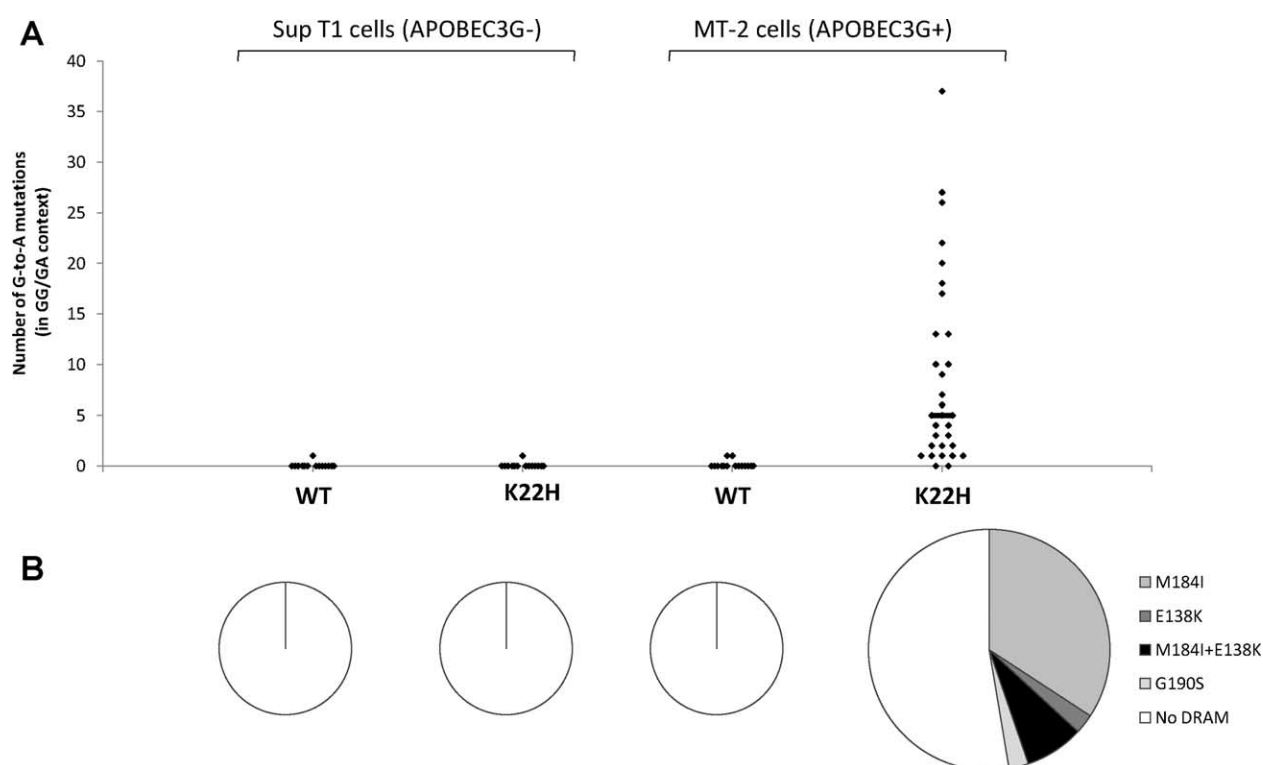


Fig. 1. Drug resistance mutations E138K and M184I are induced by APOBEC3G concomitantly *in vitro* in the absence of drug exposure. **A**) G-to-A mutation frequency of WT and Vif K22H clonal proviruses derived from Sup-T1 cells (APOBEC3G-) and MT2 cells (APOBEC3G+) are analyzed using molecular cloning and sequencing on the reverse transcriptase region. One hundred and twenty nine RT clone sequences are analyzed (WT_{SupT1}, n = 30; K22H_{SupT1}, n = 31; WT_{MT2}, n = 30; K22H_{MT2}, n = 38). Each clone is represented by a lozenge and the median number of G-to-A mutations in GG/GA context is depicted by a horizontal line. **B**) Drug resistance mutations are analyzed in each clone in each experiment. Only defective Vif K22H proviruses in MT2 cells exhibited high viral diversity with co-emergence of M184I and E138K in 3 independent clones (8%), M184I was found in 13 clones (34%), E138K in one clone (3%). DRAM: Drug Resistance Associated Mutation.

(Fig. 1). Similarly, because WT NL4-3 carries a functional vif gene, infection of APOBEC3G expressing cells (MT2 cells) resulted in rare G-to-A mutations in WT proviral clones. In these three experiments, substitutions occurred at low frequencies in some proviral clones (range of 1 to 2 mutations per sequence) found at random locations. The low number of G-to-A mutations likely reflects mistakes made during the reverse transcriptase process [1] or by RNA polymerase II [25]. Of note, no drug resistance associated mutation in RT was detected in these experiments performed in the absence of drugs.

In contrast, defective Vif K22H proviruses produced in APOBEC3G expressing cells exhibited a high rate of G-to-A substitutions (94%) at APOBEC3 hotspots (92% in GG/GA dinucleotides) showing that such sequences underwent an inordinate number of identical G-to-A transitions attributed to APOBEC3 editing. Using hypermut program (Hypermut is designed to detect hypermutation induced by APOBEC3 enzymes) some of the sequences were particularly highly attributed to APOBEC3 editing ($p < 0.001$). Fig. 1a shows that the number of G-to-A mutated sequences and the average

number of mutations per sequence were remarkably high ($n = 36$, 95%; median of mutations per sequence = 5) ($p < 0.001$). In such conditions, viral diversity resulted in the generation of both M184I and E138K in RT that co-emerged in 8% of clones ($n = 3$) (Fig. 1b). Additionally, M184I was found in 34% of clones ($n = 13$) and E138K in 3% of clones ($n = 1$) (Fig. 1b). Despite the observation of in-frame stop codons in many clones at tryptophan positions (as a result of TGG to TAG) indicating that such proviruses are defective, different degrees of mutation loads were observed with some clones not harboring a single stop codon, suggesting a complex selection of viable A3G-induced mutations that can produce infectious particles. Three independent experiments were performed. Overall, these results suggest that APOBEC3G is able to induce the appearance of E138K and M184I in a specific clone presumably during the same reverse transcription process, in the absence of any drug exposure.

To validate this hypothesis, we further analyzed a large number of HIV-1 RT bulk sequences ($n = 601$) derived from PBMCs from 567 patients under HAART followed

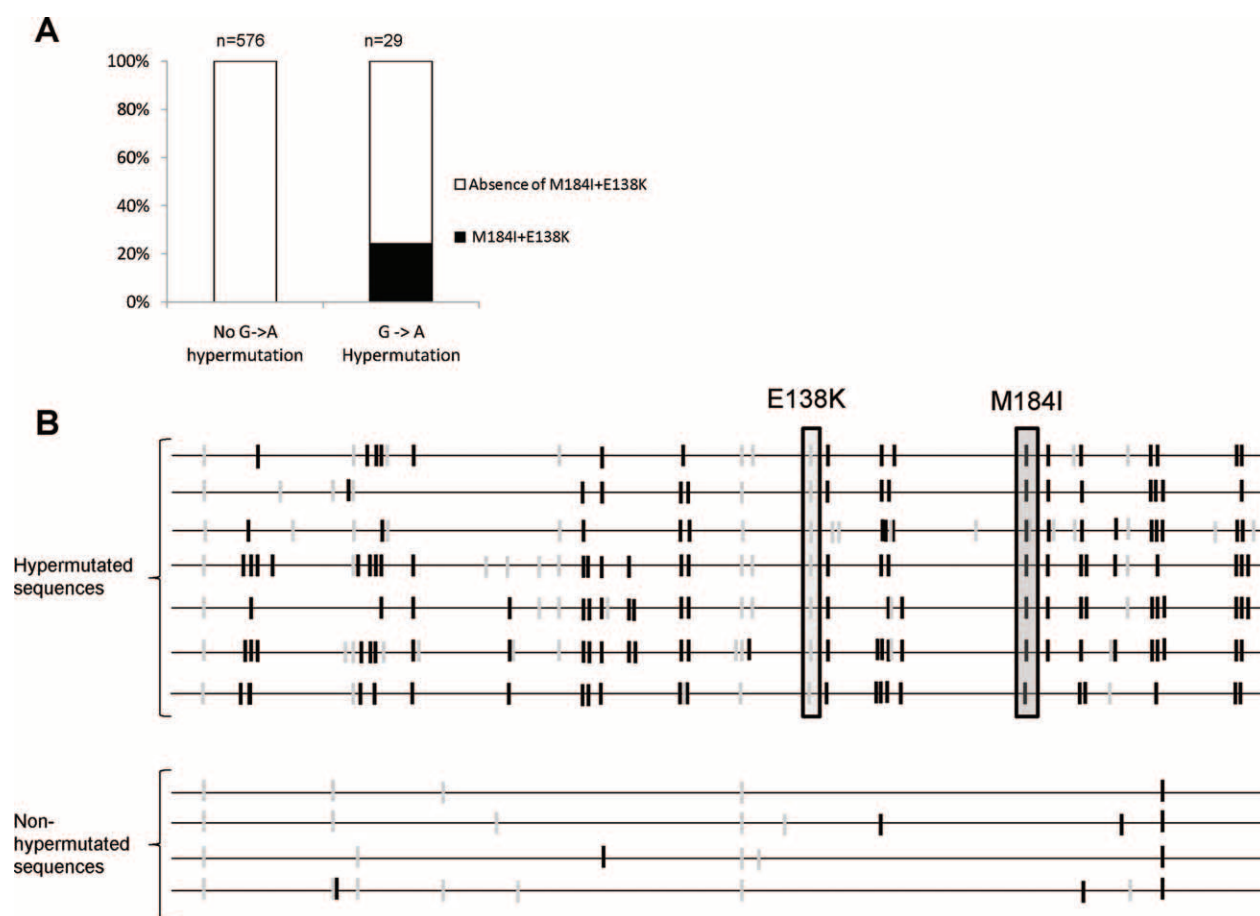


Fig. 2. Drug resistance mutations E138K and M184I are archived in naturally occurring G-to-A hypermutated RT sequences derived from PBMCs from patients with no prior exposure to etravirine nor rilpivirine. **A)** 601 RT sequences from PBMCs derived from patients under HAART were analyzed. Among these, 572 sequences were not found hypermutated in APOBEC3 contexts and not a single sequence contained E138K and M184I mutations in RT. In contrast, 29 sequences were G-to-A hypermutated ($p < 0,05$ using Hypermut program), 7 of which (24%) harbored both M184I and E138K, with one patient sequence not harboring a single stop codon, suggesting the dormant provirus is replication-competent. **B)** RT sequences derived from the 7 patients harboring hypermutated HIV sequences with E138K and M184I are shown. Additionally, four non-hypermutated sequences (selected at random from patients PBMCs database) are depicted. Individual patient sequences are displayed as horizontal lines. Only G-to-A mutation in GG/GA contexts are represented. Black vertical dashes represent GG-to-AG substitutions, and grey vertical dashes represent GA-to-AA substitutions. HXB2 sequence was used as a reference sequence.

in our hospital. At the time of genotyping, 91% of patients were receiving nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), 24% non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) and 79% protease inhibitors (PIs). Main combinations of NRTIs consisted of tenofovir/emtricitabine (33%), zidovudine/lamivudine (20%), abacavir/lamivudine (18%) and Stavudine/lamivudine (8%). Our sequences analysis showed that most of them ($n = 572$) were not found hypermutated in APOBEC3 contexts, suggesting in these cases that APOBEC3 editing is minimal. Of these sequences, not a single one contained both E138K and M184I mutations in RT (Fig. 2a). In contrast, 29 patients harbored G-to-A hypermutated proviral sequences ($p < 0,05$ using Hypermut program) and among these sequences, 7 (24%) harbored both M184I and E138K, with one patient

sequence not harboring a single stop codon (Fig. 2). Of note, there were no significant differences between the groups of patients harboring hypermutated sequences and other patients in terms of HAART regimen and NRTIs use. Additionally, none of the patients harboring both M184I and E138K had received one of the second generation NNRTI (ETR or RPV) which are the only ARV drugs known to select E138K [20–22].

Discussion

The HIV-1 population within an infected individual is characterized by an extraordinary viral variation. Recent studies have shown that APOBEC3 contribute to this

viral diversification and have the potential to facilitate HIV-1 drug resistance [5,8–10] probably because of naturally occurring defective HIV Vif variants [4], and also because polymorphisms in APOBEC3 gene family members has been shown to influence HIV-1 sequence variation. For example, HIV-1 infected patients with certain A3H haplotypes displayed less G-to-A mutations and lower viral loads [26]. More generally, a large number of HIV-1 infected patients have been shown to harbor hypermutated proviruses attributed to APOBEC3. Pace *et al.* described hypermutated proviral DNA in 12% out of 136 HIV-1 infected individuals by use of a bulk PCR sequencing [12]. Another study using clonal approaches show that APOBEC3-induced hypermutation is very often detected in patients' proviral quasiespecies [13].

In our study, we demonstrate that APOBEC3 editing results in the co-selection of drug resistance associated mutations M184I and E138K *in vitro* and confirmed these results by analyzing a large dataset of patients' PBMCs sequences. M184I and E138K were only detected in the context of APOBEC3 editing in the absence of exposure to ETR/RPV. Additionally, analyzing patients' HAART regimen, we found no significant differences in antiretroviral treatment in patients harboring hypermutated proviruses and other patients suggesting that no specific treatment contributes to hypermutation *in vivo*. Specifically, as NRTIs backbone is similar in the two groups of patients, RT inhibitors are not likely to induce a mutational bias in this context.

Combined with previous findings that APOBEC3-induced hypermutation is frequent *in vivo* [12,13], our results indicate that M184I and E138K may pre-exist in proviral reservoir at a high frequency prior to drug exposure and may serve as a repository of genetic information available to favor escape to ARV in case of exposure to some antiretrovirals such as the combination of RPV and emtricitabine/lamivudine. As naturally occurring hypermutated proviruses are often found in resting CD4 T cells, usually at a low rate ([7], for review), the coexistence of E138K and M184I mutations in PBMCs are likely to be underestimated in our study because we performed global population analysis. Such mutations should be found at a higher rate using more sensitive techniques (molecular cloning, single copy, ultradeep sequencing).

In conclusion, HIV-1 variations induced by APOBEC3 enzymes may impact resistance mutational pathways and rapidly modulate viral susceptibility to a combination of antiretrovirals, especially when such drug resistance associated mutations are clustered in the same genome, as for E138K and M184I in RT. Specific HIV viruses harboring defective Vif alleles and/or certain individuals with "risk" APOBEC3 repertoire may be prone to rapid failure with rilpivirine and emtricitabine/lamivudine.

Acknowledgements

We thank Dr Viviana Simon for helpful discussion.

We thank G. Le Mallier and P. Grange for their technical assistance.

Conflicts of interest

This work was supported by 'Agence Nationale de recherche sur les SIDA et les hépatites virales' (ANRS), the Association de Recherche en Virologie et Dermatologie (ARVD) and the European Community's Seventh framework Program (FP7/2007–2013) under the project 'Collaborative HIV and Anti-HIV Drug Resistance Network' (CHAIN).

Author contributions:

S.F., V.C. and A.-G.M. designed research, were involved in interpretation of the data and wrote the paper.

S.F., I.M., S.L.-N., C.S., P.F., MW, D.B.F. and S.S. performed research.

A.S. and C.K. were responsible for patient management.

S.F., I.M., V.C. and A.-G.M. did the critical revision of the article.

All authors approved the final version of the article.

References

1. Mansky LM, Temin HM. **Lower *in vivo* mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase.** *J Virol* 1995; **69**:5087–5094.
2. Moutouh L, Corbeil J, Richman DD. **Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**:6106–6111.
3. Duffy S, Shackelton LA, Holmes EC. **Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants.** *Nat Rev Genet* 2008; **9**:267–276.
4. Simon V, Zennou V, Murray D, Huang Y, Ho DD, Bieniasz PD. **Natural variation in Vif: differential impact on APOBEC3G/3F and a potential role in HIV-1 diversification.** *PLoS Pathog* 2005; **1**:e6.
5. Mulder LC, Harari A, Simon V. **Cytidine deamination induced HIV-1 drug resistance.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**:5501–5506.
6. Hache G, Mansky LM, Harris RS. **Human APOBEC3 proteins, retrovirus restriction, and HIV drug resistance.** *AIDS Rev* 2006; **8**:148–157.
7. Albin JS, Harris RS. **Interactions of host APOBEC3 restriction factors with HIV-1 *in vivo*: implications for therapeutics.** *Expert Rev Mol Med*; **12**:e4.
8. Kim EY, Bhattacharya T, Kunstman K, Swantek P, Koning FA, Malim MH, *et al.* **Human APOBEC3G-mediated editing can promote HIV-1 sequence diversification and accelerate adaptation to selective pressure.** *J Virol* 2010; **84**:10402–10405.
9. Fourati S, Malet I, Binka M, Boukobza S, Wirden M, Sayon S, *et al.* **Partially active HIV-1 Vif alleles facilitate viral escape from specific antiretrovirals.** *AIDS* 2010; **24**:2313–2321.

10. Sadler HA, Stenglein MD, Harris RS, Mansky LM. **APOBEC3G contributes to HIV-1 variation through sublethal mutagenesis.** *J Virol* 2010; **84**:7396–7404.
11. Goila-Gaur R, Strebel K. **HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity.** *Retrovirology* 2008; **5**:51.
12. Pace C, Keller J, Nolan D, James I, Gaudieri S, Moore C, *et al.* **Population level analysis of human immunodeficiency virus type 1 hypermutation and its relationship with APOBEC3G and vif genetic variation.** *J Virol* 2006; **80**:9259–9269.
13. Kieffer TL, Kwon P, Nettles RE, Han Y, Ray SC, Siliciano RF. **G>A hypermutation in protease and reverse transcriptase regions of human immunodeficiency virus type 1 residing in resting CD4+ T cells in vivo.** *J Virol* 2005; **79**:1975–1980.
14. Piantadosi A, Humes D, Chohan B, McClelland RS, Overbaugh J. **Analysis of the percentage of human immunodeficiency virus type 1 sequences that are hypermutated and markers of disease progression in a longitudinal cohort, including one individual with a partially defective Vif.** *J Virol* 2009; **83**:7805–7814.
15. Gandhi SK, Siliciano JD, Bailey JR, Siliciano RF, Blankson JN. **Role of APOBEC3G/F-mediated hypermutation in the control of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors.** *J Virol* 2008; **82**:3125–3130.
16. Cohen CJ, Andrade-Villanueva J, Clotet B, Fourie J, Johnson MA, Ruxrungtham K, *et al.* **Rilpivirine versus efavirenz with two background nucleoside or nucleotide reverse transcriptase inhibitors in treatment-naive adults infected with HIV-1 (THRIVE): a phase 3, randomised, non-inferiority trial.** *Lancet* 2011; **378**:229–237.
17. Molina JM, Cahn P, Grinsztejn B, Lazzarin A, Mills A, Saag M, *et al.* **Rilpivirine versus efavirenz with tenofovir and emtricitabine in treatment-naive adults infected with HIV-1 (ECHO): a phase 3 randomised double-blind active-controlled trial.** *Lancet* 2011; **378**:238–246.
18. Boucher CA, Cammack N, Schipper P, Schuurman R, Rouse P, Wainberg MA, *et al.* **High-level resistance to (-) enantiomeric 2'-deoxy-3'-thiacytidine in vitro is due to one amino acid substitution in the catalytic site of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase.** *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**:2231–2234.
19. Keulen W, Back NK, van Wijk A, Boucher CA, Berkhout B. **Initial appearance of the 184Ile variant in lamivudine-treated patients is caused by the mutational bias of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase.** *J Virol* 1997; **71**:3346–3350.
20. Azijn H, Tirry I, Vingerhoets J, de Bethune MP, Kraus G, Boven K, *et al.* **TMC278, a next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), active against wild-type and NNRTI-resistant HIV-1.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**:718–727.
21. Asahchop EL, Oliveira M, Wainberg MA, Brenner BG, Moisi D, Toni T, *et al.* **Characterization of the E138K resistance mutation in HIV-1 reverse transcriptase conferring susceptibility to etravirine in B and non-B HIV-1 subtypes.** *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**:600–607.
22. Tambuyzer L, Vingerhoets J, Azijn H, Daems B, Nijs S, de Bethune MP, *et al.* **Characterization of genotypic and phenotypic changes in HIV-1-infected patients with virologic failure on an etravirine-containing regimen in the DUET-1 and DUET-2 clinical studies.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010; **26**:1197–1205.
23. Tambuyzer L, Nijs S, Daems B, Picchio G, Vingerhoets J. **Effect of mutations at position E138 in HIV-1 reverse transcriptase on phenotypic susceptibility and virologic response to etravirine.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011; **58**:18–22.
24. Mulder LC, Ooms M, Majdak S, Smedresman J, Linscheid C, Harari A, *et al.* **Moderate influence of human APOBEC3F on HIV-1 replication in primary lymphocytes.** *J Virol* 2010; **84**:9613–9617.
25. O'Neil PK, Sun G, Yu H, Ron Y, Dougherty JP, Preston BD. **Mutational analysis of HIV-1 long terminal repeats to explore the relative contribution of reverse transcriptase and RNA polymerase II to viral mutagenesis.** *J Biol Chem* 2002; **277**:38053–38061.
26. Gourraud PA, Karaouni A, Woo JM, Schmidt T, Oksenberg JR, Hecht FM, *et al.* **APOBEC3H haplotypes and HIV-1 pro-viral vif DNA sequence diversity in early untreated human immunodeficiency virus-1 infection.** *Hum Immunol* 2011; **72**:207–212.

Article 3

Antiviral Research 2012 Jan; 93:167-74.

**E17A mutation in HIV-1 Vpr confers resistance to didanosine in association
with Thymidine Analogue Mutations**

Slim Fourati, Isabelle Malet, Carolin Guenzel, Cathia Soulie, Priscilla Maidou-Peindara,
Laurence Morand-Joubert, Marc Wirden, Sophie Sayon, Gilles Peytavin, Anne Simon,
Christine Katlama, Serge Benichou, Vincent Calvez, Anne-Genevieve Marcelin



E17A mutation in HIV-1 Vpr confers resistance to didanosine in association with thymidine analog mutations

Slim Fourati^{a,b,c,*}, Isabelle Malet^{a,b,c}, Carolin A. Guenzel^{d,e,f}, Cathia Soulie^{a,b,c}, Priscilla Maidou-Peindara^{d,e,f}, Laurence Morand-Joubert^{a,c,g}, Marc Wirден^{a,b,c}, Sophie Sayon^{a,b,c}, Gilles Peytavin^h, Anne Simon^b, Christine Katlama^{a,b,c}, Serge Benichou^{d,e,f}, Vincent Calvez^{a,b,c}, Anne-Geneviève Marcelin^{a,b,c}

^a Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

^b INSERM UMR S-943, Paris, France

^c AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière, Laboratoire de Virologie, Paris, France

^d INSERM, U1016, Institute Cochin, Paris, France

^e CNRS, UMR8104, Paris, France

^f Université Paris-Descartes, Paris, France

^g AP-HP, Hôpital Saint Antoine, Paris, France

^h AP-HP Hôpital Bichat, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 September 2011

Revised 2 November 2011

Accepted 16 November 2011

Available online 25 November 2011

Keywords:

HIV-1

Vpr

Drug resistance

Didanosine

ABSTRACT

Background: HIV-1 accessory Vpr protein is involved in the reverse transcription process and has been shown to modulate the virus mutation rate. This process may play a role in the kinetics of appearance of drug resistance mutations under antiretroviral treatment.

Methods: Vpr sequences were analyzed from plasma viruses derived from 97 HIV-1-infected individuals failing antiretroviral treatment and 63 antiretroviral-naïve patients. Vpr genetic variability was analyzed for association with specific drug treatment and drug resistance mutations. Biological and virological experiments were employed to characterize a mutation in Vpr found to be associated with virological failure.

Results: E17A mutation located in the first α -helix of Vpr was more prevalent in HAART-treated individuals compared to untreated individuals. E17A was associated with thymidine analog mutations (TAMs) in reverse transcriptase M41L, L210W and T215Y and with the use of didanosine in the patients' treatment histories. E17A had no impact on the biochemical and functional properties of Vpr, and did not affect kinetics of replication of wild-type or TAMs-containing viruses. However, its association with TAMs and the use of didanosine was consistent with phenotypic susceptibility assays showing a significant 3-fold decrease in didanosine susceptibility of viruses harboring Vpr E17A combined with TAMs compared to viruses harboring TAMs alone.

Conclusion: These findings highlight a novel role of Vpr in HIV-1 drug resistance. Vpr E17A confers resistance to didanosine when associated with TAMs. Whether Vpr E17A facilitates excision of didanosine is still to be determined.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The high adaptive capacity of HIV-1 is demonstrated by its ability to escape from potent antiviral drugs in treated HIV-infected individuals. Virological failure occurs when viruses with drug resistance-associated mutations (RAMs) in the targeted viral regions (reverse transcriptase, protease, integrase or envelope)

are selected and outgrow the more susceptible strains. The generation of resistant variants is a consequence of the error proneness of the HIV-1 reverse transcriptase (RT) enzyme (Mansky and Temin, 1995) and recombination (Jetzt et al., 2000; Levy et al., 2004; Moutouh et al., 1996). In addition to *gag*, *pol* and *env* genes, HIV-1 genome encodes a number of accessory proteins that may be involved in viral diversification and generation of resistant variants. For example, Vif and Vpr have been shown to be indirectly involved in the reverse transcription process (Bishop et al., 2004; Mansky and Temin, 1995).

We recently demonstrated that some Vif variants are likely involved in the appearance of drug resistance-associated mutations

* Corresponding author. Address: Department of Virology, CERVI Pitié-Salpêtrière Hospital, 83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Tel.: +33 142177418; fax: +33 142177411.

E-mail address: slim.fourati@psl.aphp.fr (S. Fourati).

in vivo. Patients harboring viral strains encoding partially active Vif proteins are more likely to develop resistance to certain antiretroviral agents (ARV) as these strains are able to promote the selection of some G-to-A substitutions leading to drug-resistance mutations (Fourati et al., 2010). Another accessory protein, Vpr, has been shown to participate in the accuracy of the reverse transcription process in *in vitro* experiments. Vpr is a 96 amino acid protein that consists of a flexible N-terminal region, three α -helical domains with amphipathic properties and a flexible C-terminal region (Morellet et al., 2003). Vpr is incorporated into HIV-1 virions through direct interaction with the p6 domain of the Gag precursor (Bachand et al., 1999; Lavalley et al., 1994). This protein is a multifunctional protein and was associated with a variety of roles in determining HIV-1 infectivity including an effect on the reverse-transcription process, nuclear transport of the HIV-1 pre-integration complex, cell cycle arrest at the G2/M transition, induction of apoptosis and transactivation of the HIV-1 LTR (for reviews, see Andersen et al., 2008; Le Rouzic and Benichou, 2005). Some of these functions involve interactions with cellular partners, including viral and host-cell proteins. For example, disruption of cell-cycle control is consequent to Vpr interaction with the DCAF1 subunit of the Cul4a/DDB1 E3 ubiquitin ligase (Belzile et al., 2007; DeHart et al., 2007; Le Rouzic et al., 2007) and may provide a favorable environment for viral expression (Goh et al., 1998). Finally, the role of Vpr in the reverse transcription process implies interaction with the nuclear form of the DNA repair enzyme uracil DNA glycosylase (UNG2) for modulating the virus mutation rate (Chen et al., 2004; Mansky et al., 2000). Thus, this function of Vpr may play a role in kinetics of appearance of drug resistance-associated mutations. However, the *in vivo* significance of the above-mentioned process is unknown.

To our knowledge, there is no report evaluating the impact of primary Vpr variants from infected patients as a mechanism underlying resistance to ARVs. In the present study, we investigated Vpr genetic variability in antiretroviral-experienced patients failing highly active antiretroviral treatment (HAART) compared to a drug-naïve population. We identified one mutation E17A in Vpr found more frequently in HAART-treated patients. We studied the functional properties of this variant and evidenced a decreased susceptibility to didanosine of this variant when associated with TAMs in cell culture-based assays.

2. Methods

2.1. Patients

A total of 160 HIV-1 plasma viruses subtype B derived from infected patients (97 ARV-experienced failing HAART and 63 treatment naïve) were analyzed. In ARV-experienced subjects, HIV-1 genotypic resistance was initiated because of HAART failure. Resistance testing was performed by sequencing protease (PR) and reverse transcriptase (RT) regions following the French National consensus technique (<http://www.hivfrenchresistance.org>). Additionally, we analyzed 63 plasma samples from HIV-1 infected patients who were treatment-naïve and for whom HIV genotype testing was performed at the time of diagnosis.

2.2. Amplification and sequencing of Vpr gene

RNA isolation, cDNA synthesis, and PCRs were performed as described previously (Malet et al., 2008). For the first round PCR, we used Vpr1 (5'-gaagtagacatcccactagggga-3') and VprB (5'-ctccgctcttctgcat-3'). The second-round PCR was performed using primer Vpr3 (5'-attgggtctgcatacaggagaaa-3') and VprD (5'-gcatagga-gargcctaagcc-3').

2.3. Site directed mutagenesis

pNL4-3 clones containing mutations in the RT (M41L, L210W, T215Y, K65R) and/or Vpr (E17A) coding regions were constructed by site-directed mutagenesis using the Quickchange II Site Directed mutagenesis Kit (Stratagene) according to the Manufacturer's instructions. All HIV-1 constructs were verified by nucleotide sequencing. (Primers: for the introduction of M41L, we used M41L-S 5'-agaaaaataaaagcattagtagaattgttacagaact ggaaggaggag- gaaaa-att-3' and M41L-AS 5'-aattttctcctcttccagttctgtacaatttctac- taatgtctttt attttttct-3'; for the introduction of L210W and T215Y, we used 1(210/215)S : 5'-gaggaactgag acaacatctgtggagggtgggttttaca- caccagac-3' and 2(210/215)AS: 5'-gtctgtgtgtgtaaaatc cccacctccaca- gatgttctcctcagttcctc-3'; for the introduction of K65R, we used 1-K65R-S: 5'-tactccagatattgccataaagagaaaagacagtactaaatggagaa-3' and 2-K65R-AS 5'-ttctccattagtagt actgtcttttcttcttatggcaactactggagta-3'; for the introduction of Vpr E17A, we used 1vpr17S 5'-gggcccacaga- gggagccatacaatgcatggacactagagc-3' and 2vpr17AS 5'-gctctagtgtccatg- cattgtatgg ctcctctgtggccc-3').

2.4. Cell culture and transfection

HeLa and 293 T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 50 units/ml penicillin/streptomycin, and 125 ng/ml amphotericin B (Invitrogen), at 37 °C under 5% CO₂. For pulldown and co-immunoprecipitation experiments, 293T cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the Manufacturer's recommendations. For immunofluorescence experiments, HeLa cells were grown onto coverslips in 6-well plates and transfected using the GeneJuice method (Novagen), according to the Manufacturer's recommendations. For the virion packaging assay, cells were co-transfected as described using the calcium phosphate method (Jacquot et al., 2007). For the generation of HIV-1 stocks, 293 T cells were transfected with pNL4-3 plasmids using Lipofectamine Plus reagent (Invitrogen).

2.5. Assay for virion incorporation of Vpr-UNG2 fusions

Incorporation of the wild-type and mutated Vpr proteins into HIV-1 virions was analyzed as previously described (Chen et al., 2004), using a virion packaging assay in which HA-tagged Vpr were expressed in trans in virus-producing cells.

2.6. Immunofluorescence analysis

Plasmids for expression of HA-tagged form of the wild-type (WT) Vpr protein has been already described (Chen et al., 2004), while the plasmid for expression (E17A mutant) was constructed by PCR-mediated site-directed mutagenesis using specific primers containing the desired mutation as described (Chen et al., 2004). Twenty-four hours after transfection with vectors encoding either the WT or E17A HA-Vpr proteins or with the empty plasmid, cells were analyzed by indirect immunofluorescence as described previously (Langevin et al., 2009).

2.7. Recombinant proteins and GST pulldown assay

Plasmids for expression of HA-tagged forms of the wild-type and W54R Vpr proteins have been already described (Chen et al., 2004), while the plasmid for expression the E17A mutant was constructed by PCR-mediated site-directed mutagenesis using specific primers containing the desired mutation as described (Chen et al., 2004). Plasmids for bacterial expression UNG2 fused to the glutathione S-transferase (GST) has been also described (Chen et al., 2004). Recombinant GST and GST-UNG2 were produced in

Escherichia coli and then purified on glutathione (GSH)–Sepharose beads as described previously (Chen et al., 2004). Lysates from 293T cells previously transfected with plasmids for expression of wild-type or mutated HA-Vpr were incubated overnight at 4 °C with 2 µg of immobilized GST fusions as described (Chen et al., 2004). Bound proteins were separated by SDS–PAGE and analyzed by immunoblotting using the rat anti-HA monoclonal antibody (Roche Applied Science).

2.8. Co-immunoprecipitation assay

Plasmid for expression of UNG2 fused to the green fluorescent protein (GFP-UNG2) was kindly provided by Geir Slupphaug (Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norway). 293T cells were transfected with plasmids for expression of the wild-type or mutated HA-Vpr proteins in combination with the GFP-UNG2 expression plasmid. 24 h later, cells were suspended in lysis buffer containing 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris (pH 7.5), 10% glycerol, 1% Igepal CA-630 and 1× complete protease inhibitor mixture (Roche Diagnostics GmbH). After 30-min incubation at 4 °C under gentle agitation, cell lysates were centrifuged at 14,000g for 30 min at 4 °C. HA-Vpr proteins were immunoprecipitated from cleared lysates containing 400 µg of total proteins with 2 µg of anti-GFP (Roche Applied Science) on protein A–Sepharose beads. 80% of the precipitated material was then resolved by SDS–PAGE and analyzed by Western blotting using anti-HA and anti-GFP antibodies (Roche Applied Science).

2.9. Phenotypic drug susceptibility assays

Single-cycle titers of the virus were determined in HeLa-P4 cells (Larder et al., 1990; Larder and Kemp, 1989; St Clair et al., 1991) by quantifying β-galactosidase activity as previously described (Delelis et al., 2009). Cells were infected with viruses and grown in the presence of increasing concentrations of didanosine or 3′-azido-3′-deoxythymidine (AZT), ranging from 0.01 µM to 100 µM. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was determined as the drug concentration giving 50% inhibition of β-galactosidase levels with respect to untreated infected cells. Resistance to didanosine is frequently associated with mutations L74 V or K65R in RT in patients samples. Many studies using site-directed mutagenesis or recombinant viruses have shown that the magnitude of IC₅₀ increase of viruses harboring either L74 V or K65R was similar in regards to didanosine (Petropoulos et al., 2000; Winters et al., 1997). In this study, we tested a K65R mutant as a control in didanosine phenotypic susceptibility assays. Drug susceptibility results were expressed as the fold change in susceptibility, defined as the ratio of the IC₅₀ of the mutant variant to that of NL4-3 wild-type. Assays were performed in triplicate.

2.10. Statistical analyses

Comparisons between percentages were performed using the Fisher exact test. We used the entropy program to evaluate the differences in polymorphisms between the drug-naïve and the antiretroviral-experienced population. A Bonferroni correction was considered to set the threshold of significance (<http://www.hiv.lanl.gov/cgi-bin/ENTROPY>). The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was determined using regression curves. Analyses were performed using Statview.

2.11. Nucleotide sequence accession number

All the HIV-1 Vpr sequences related to this work have been submitted to GenBank and were given accession numbers JN125863 through JN126022.

3. Results

3.1. Patient characteristics

Our population of patients failing HAART ($n = 97$) has the following characteristics: the median age was 46 years, 89% of the patients were men; the median CD4 cell count was 331 cells/mm³, and the median plasma HIV-1 RNA was 4680 cp/ml at the time of genotypic testing. Overall, median time of HIV-1 infection was 17 years (range: 4–25) and the median of prior ART exposure was 13 years (range: 1.5–18). Patients received a median of eight antiretroviral drugs in their history (range: 2–19). All patients received at least one nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitor (NRTI), 74% at least one non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) and 97% at least one protease inhibitor (PI) in their history. At the time of analysis, 98% of viruses collected from plasma from HAART-treated patients harbored at least one drug resistance associated mutation (RAM) in reverse transcriptase (RT) and/or protease (PR) (major mutations, as defined by the IAS-USA guidelines).

3.2. Vpr polymorphisms in patients failing ARVs and association with known ARV resistance associated mutations

A total of 160 HIV-1 plasma viruses subtype B were analyzed. The polymorphism within the HIV-1 Vpr primary sequence, deduced from sequencing of viral RNA from plasma samples from HAART-treated patients failing HAART ($n = 97$) was compared with the polymorphism from samples from therapy-naïve individuals ($n = 63$). Overall, the Vpr sequences were highly conserved in therapy-naïve patients with nearly 80% (74/97) of conserved amino acids (polymorphism <5%) in the Vpr coding region. In contrast, in HAART-treated patients, the Vpr proteins were more polymorphic with less than 50% amino acids being conserved (44/97). As reported in Fig. 1 and Table 1, E17, L22 and R32 positions located in the first α-helix of Vpr were more polymorphic in HAART-treated individuals ($p < 0.001$, $p = 0.02$ and $p = 0.02$, respectively). Specifically, E17A mutation increased in prevalence from 3% ($n = 2/63$) in samples from untreated individuals to 18% ($n = 17/97$) in samples from HAART-treated patients ($p = 0.004$) (Fig. 1, Table 1). R32K mutation increased in prevalence from 3% ($n = 2/63$) in samples from untreated individuals to 13% ($n = 13/97$) in samples from treated patients ($p = 0.02$).

To determine whether these two Vpr mutations were associated with any specific drug resistance-associated mutation, we analyzed protease and reverse transcriptase sequences derived from our patient database. We compared the prevalence of every drug resistance associated mutation in PR and RT as listed by the ANRS algorithm (<http://www.hivfrenchresistance.org>) from 17 patients harboring Vpr A17 with 70 patients harboring Vpr E17. Only three thymidine analog mutations (1) (TAMs-1) in the reverse transcriptase were found to be associated with E17A mutation: M41L ($p = 0.03$) L210W ($p = 0.006$) and T215Y ($p = 0.03$). In contrast, none of TAMs (2) including D67 N, K70R, T215F, and K219Q/E were associated with Vpr E17A. (D67 N, $p = 1$; K70R, $p = 0.53$; T215F, $p = 0.3$; K219Q/E, $p = 0.76$). Analyzing the individual drug regimens in HAART-treated patients, we observed a unique association between E17A and didanosine ($p = 0.03$) in the patients treatment histories (Fig. 2). Didanosine had been administered for a median of 2.5 years (range: 0.5–4.5). Similar analyses were performed for R32K mutation, but the Vpr R32K variant was not associated with a drug resistance mutation in PR or RT. Since no association of Vpr R32K was evidenced with either a specific drug in the patient treatment histories, or a specific drug resistance-associated mutation, we did not further characterize R32K mutation.

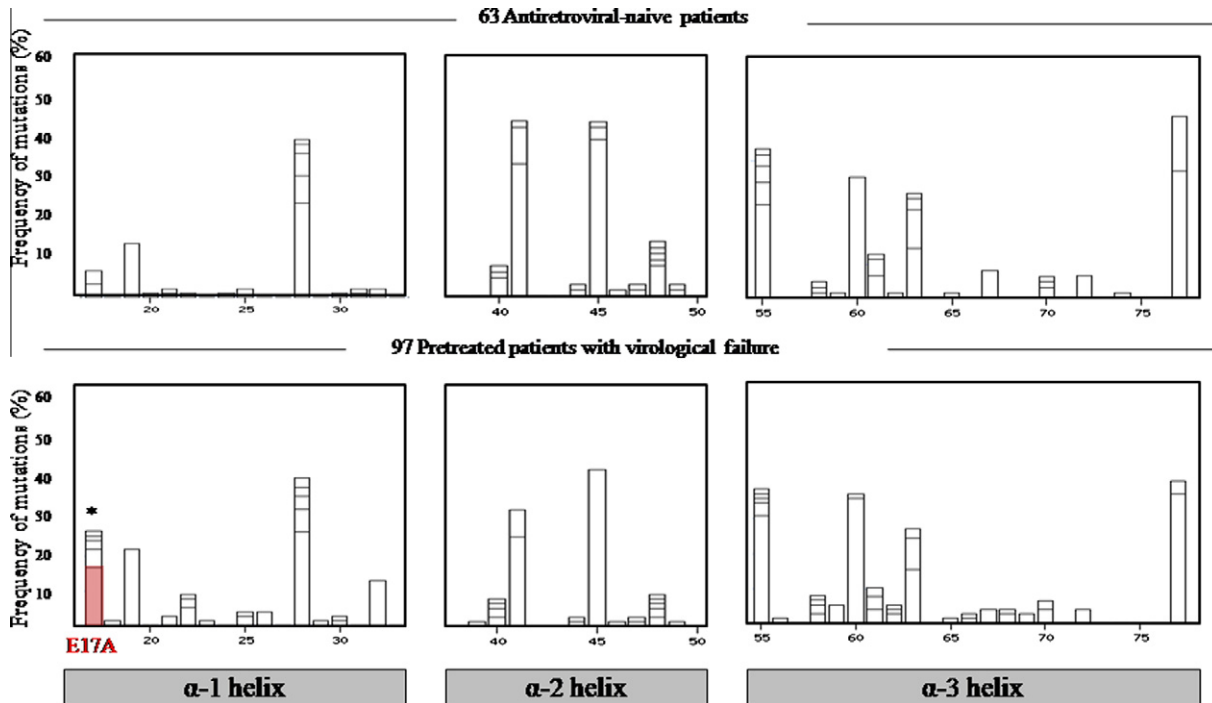


Fig. 1. Frequency of mutations in the three α -helix functional domains of HIV-1 Vpr. The amino acids variation shown is based on 63 sequences derived from drug-naïve patients and 97 sequences derived from patients failing on HAART. The variation in the three α -helix functional domains is shown for each of the two patient populations. Substitution at position 17 is indicated by *. HxB2 was used as reference sequence.

Table 1

Genetic variations in E17, L22 and R32 positions of the first α -helix of Vpr that were found more polymorphic in pretreated patients ($p < 0.05$, entropy program <http://www.hiv.lanl.gov/cgi-bin/ENTROPY>). E17A and R32K mutations were more prevalent in pretreated patients compared to untreated patients.

Position	Amino acid	No. (%) of patients	
		Pretreated	Untreated
17	E (wild type)	71 (73%)	59 (93%)
	A	17 (18%)	2 (3%)
	Q	4 (4%)	2 (3%)
	D	3 (3%)	0
	G	1 (1%)	0
	V	1 (1%)	0
22	L (wild type)	88 (91%)	62 (98%)
	F	4 (4%)	0
	I	4 (4%)	1 (2%)
	R	1 (1%)	0
32	R (wild type)	84 (86%)	61 (97%)
	K	13 (14%)	2 (3%)

3.3. Characterization of the Vpr E17A variant

Because we identified a significant association between the Vpr E17A mutation and failure to antiretroviral treatment in patients using didanosine, this substitution was first introduced within the Vpr protein of the HIV-1 NL4-3 isolate for biochemical and functional characterization.

Since the requirement of Vpr for early stages of the virus life cycle, including modulation of the reverse transcription process (for review, see Le Rouzic and Benichou, 2005), has been associated with its packaging into virions, we used a transient Vpr packaging assay in which HA-tagged Vpr was expressed in trans in virus-producing cells for analyzing whether the Vpr E17A mutant was incorporated into virus particles. As evidenced in Fig. 3A by western blotting, Vpr E17A was packaged into purified virions as efficiently

as the wild-type Vpr protein. After *de novo* expression in infected cells, HIV-1 Vpr primarily localizes in the nucleus but it is excluded from the nucleolus (Depienne et al., 2000; Kamata and Aida, 2000). When expressed in HeLa cells as HA-tagged proteins and analyzed by immunofluorescence, both the wild-type and the Vpr E17A proteins were efficiently concentrated in the nucleus at steady state (Fig. 3B). Finally, the role of Vpr in the modulation of the virus mutation rate was related to its direct interaction with the nuclear form UNG2, a DNA repair enzyme involved in the cellular mechanisms of base-excision repair that specifically removes uracil from DNA (Planelles and Benichou, 2009). Therefore, we used biochemical approaches to investigate whether the Vpr E17A mutant retained the ability to interact with UNG2. An *in vitro* binding assay was used with recombinant UNG2 expressed in *E. coli* in fusion with the GST (GST-UNG2, see Fig. 3C, ponceau red). Purified GST-UNG2 was immobilized on GSH-Sepharose beads and then incubated with lysates from cells expressing wild-type or mutated HA-tagged Vpr proteins. Bound proteins were analyzed by immunoblotting with anti-HA (Fig. 3C, lower panels). Both wild-type and E17A HA-Vpr specifically bound to GST-UNG2 but not to GST alone. As a control, the VprW54R mutant, a well-characterized Vpr variant that fails to interact with UNG2 (Chen et al., 2004), was not retained on GST-UNG2. These results were in complete agreement with co-immunoprecipitation experiments performed from 293T cells expressing HA-Vpr proteins in combination with GFP-UNG2 (Fig. 3D). Both wild-type and E17A HA-Vpr, but not VprW54R, were efficiently immunoprecipitated with GFP-UNG2 from co-transfected cell lysates. Similarly, we checked that the VprE17A mutant also retained the ability to associate with the DCAF1 subunit of the Cul4/DDB1 E3 ubiquitin ligase (Planelles and Benichou, 2009) that is critical for the G2-arrest activity induced by Vpr expression (data not shown).

Together, the data reported in Fig. 3 shows that the VprE17A variant is correctly incorporated into virus particles, localizes in the nucleus and efficiently interacts with its known UNG2 cellular partner required for modulation of the virus mutation rate.

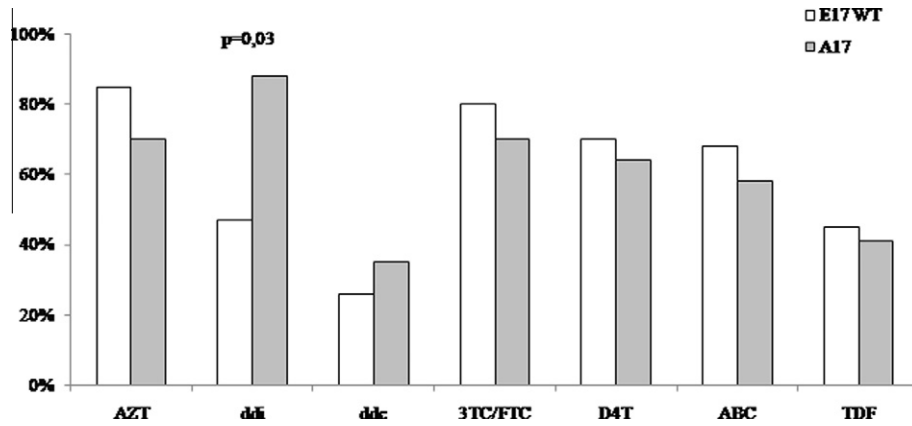


Fig. 2. Percentage of patients having received nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitor (NRTI) in their history and harboring either E17 (WT) or A17. We observed a unique association between E17A and didanosine. Similar analyses were performed for other drug classes: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI), protease inhibitors (PI), anti-integrase but failed to show any association (*Supplementary file 1*). ddI: didanosine, ddC: zalcitabine, 3TC: lamivudine, FTC: emtricitabine, D4T: stavudine, ABC: abacavir, TDF: ténofovir disoproxil fumarate.

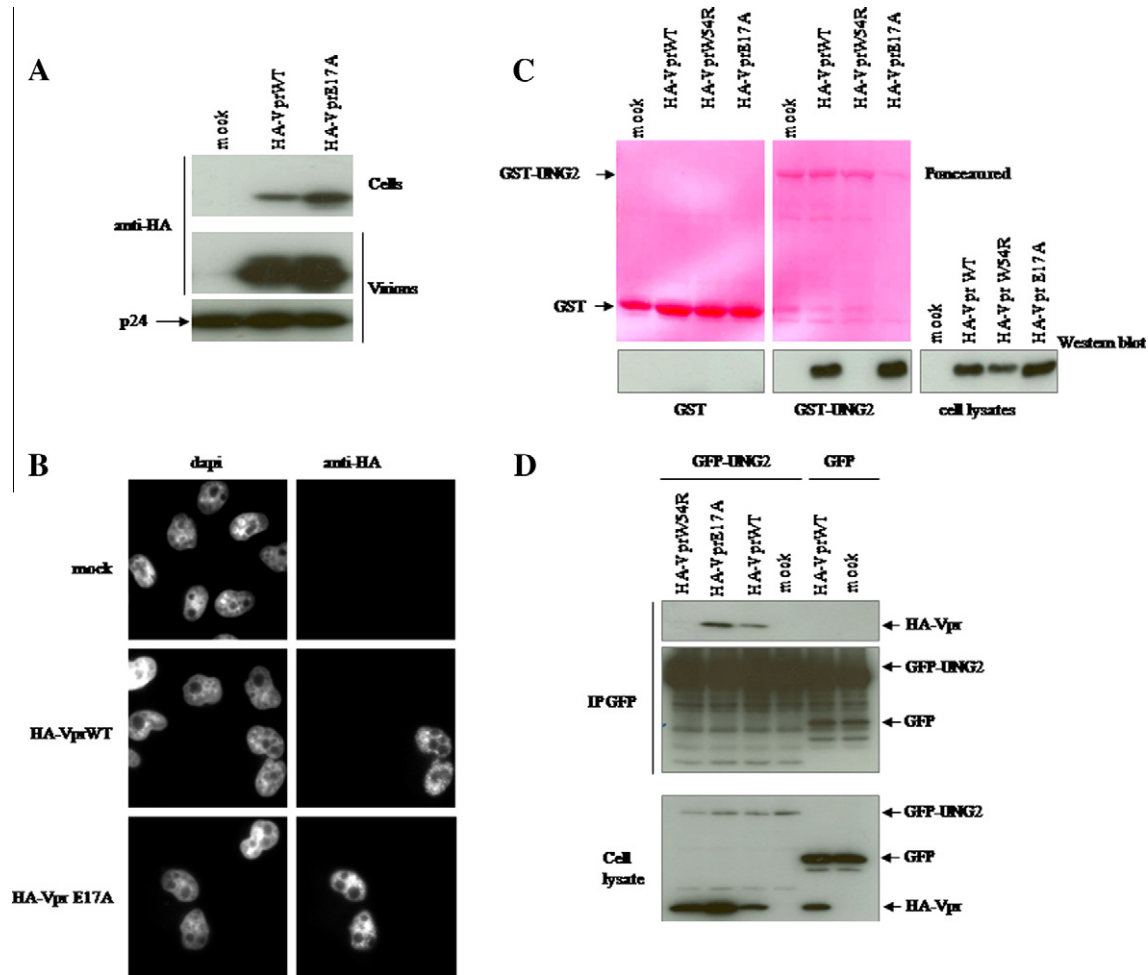


Fig. 3. Biochemical characterization and intracellular distribution of the Vpr E17A variant. (A) Packaging assay of the HA-tagged Vpr proteins into virus particles. Virions were produced from 293T cells co-transfected with an HIV-1-based packaging vector lacking the *vpr* gene in combination with the empty plasmid (mock) or with plasmids for expression of the wild type or mutated HA-tagged Vpr protein. 48 h later, proteins from cell and virion lysates were separated by SDS–PAGE and analyzed by Western blotting with anti-HA and anti-CAP24 antibodies. (B) Subcellular distribution of the HA-tagged Vpr proteins. HeLa cells were transfected with the empty plasmid (mock) or plasmids for expression of the wild type or mutated HA-Vpr protein and were then analyzed 48 h after transfection by immunofluorescence. Cells were fixed, permeabilized, and subsequently stained with anti-HA and DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole). Cells were analyzed by epifluorescence microscopy, and images were acquired by using a charge-coupled device camera. (C) *In vitro* pull-down assay for Vpr binding to UNG2. Lysates from 293T cells transfected with the empty plasmid (mock) or plasmids for expression of the wild type or mutated HA-Vpr protein (right panel) were incubated with equal amounts of either GST or GST-UNG2 (upper panels, Ponceau red) immobilized on GSH–Sepharose beads. Bound proteins were then analyzed by immunoblotting with anti-HA (lower panels). (D) Co-precipitation analysis of Vpr and UNG2 proteins. 293T cells transfected with the empty plasmid (mock) or plasmids for expression of the wild type or mutated HA-Vpr protein in combination with either GFP or GFP-UNG2 expression plasmids (lower panel, Cell lysate) were lysed and subjected to immunoprecipitation with anti-GFP. Precipitates were then analyzed by immunoblotting with anti-HA (upper panel) and anti-GFP (middle panel).

3.4. Impact of the Vpr E17A variant on virus replication in a WT backbone and when combined with TAMs-1

To further investigate the potential role of E17A mutation, we studied its impact on virus replication in the context of the full-length virus. We introduced the Vpr E17A (E17A) mutation within the NL4-3 molecular clone and tested its replication kinetics in MT-2 cells. At day 5 and day 7 postinfection, levels of p24 production of E17A was 130% and 97% of the WT levels, respectively, showing that the E17A variant is at least as fit as NL4-3 WT (Fig. 4A). To gain a better understanding of the positive association of E17A with TAMs-1, we also generated NL4-3 site-directed mutants with M41L, L210W and T215Y in RT (TAMs-1) in combination or not with E17A (E17A + TAMs-1). Previous data have shown that the fitness of HIV-1 subtype B harboring TAMs-1 is reduced when compared to HIV-1 WT (Armstrong et al., 2009). Here, we asked if the E17A mutation would compensate for the reduced fitness of HIV-1 containing TAMs-1. As expected, HIV-1 TAMs-1 alone had reduced fitness in MT-2 cells (50% of WT levels at day 5 and 58% of WT levels at day 7 postinfection). When combined with E17A, HIV-1 E17A + TAMs-1 mutant showed similar replication capacity compared to viruses with TAMs-1 alone, indicating that E17A mutation does not compensate for the loss of fitness induced by TAMs-1 (Fig. 4A).

3.5. Phenotypic drug susceptibility of E17A HIV-1 in a WT backbone and when combined with TAMs-1

Because of the association of E17A with TAMs-1 (M41L, L210W and T215Y) within HIV-1 sequences from patients using didanosine, we next examined the impact of E17A alone or in combination with TAMs-1 on AZT and didanosine susceptibility by phenotypic assays (Fig. 4B, C). Phenotypic assays were performed

three times. In didanosine susceptibility assays, TAMs-1 viruses showed no significant difference in didanosine susceptibility compared to WT NL4-3 (Fig. 4B). Similarly, the E17A mutant did not show reduced susceptibility to didanosine compared to WT NL4-3. However, when combined together, E17A + TAMs-1 demonstrated a 3.28-fold (range 2.9–3.6-fold) decrease in didanosine susceptibility compared to TAMs-1 alone (Fig. 4B). This level of resistance is close to that induced by a K65R mutant (used as a control) which demonstrated a 4-fold (range: 3–4.7-fold) decreased susceptibility to didanosine. Whereas E17A alone does not seem to confer resistance to didanosine, the data reported in Fig. 4B indicate that its association with TAMs-1 confers resistance to didanosine at a level close to the resistance induced by K65R. In AZT phenotypic assays, the E17A mutant showed no decreased susceptibility to AZT in comparison with NL4-3_{WT} (fold 1,2). When combined with TAMs-1 (E17A + TAMs-1), no further decreased susceptibility to AZT was observed as compared to TAMs-1 alone (Fig. 4C): indeed, TAMs-1 demonstrated about 80-fold decreased susceptibility to AZT (range: 65–97-fold) and E17A + TAMs-1 showed similar results (range: 75–95-fold change). Taken together, these data suggest that whereas Vpr E17A does not seem to confer resistance to AZT (whether associated to TAMs-1 or not), resistance to didanosine is observed when Vpr E17A is combined with TAMs-1 compared to viruses harboring TAMs-1 alone.

4. Discussion

Several studies have suggested a role for HIV-1 Vpr in modulating the viral mutation rate during the course of infection. Vpr has been found to incorporate the nuclear form uracil-DNA glycosylase 2 (UNG2) into HIV-1 virions. UNG-2 is a cellular DNA-repair enzyme involved in nucleotide-excision repair, and its incorporation in virions is correlated with the ability of Vpr to alter the mutation

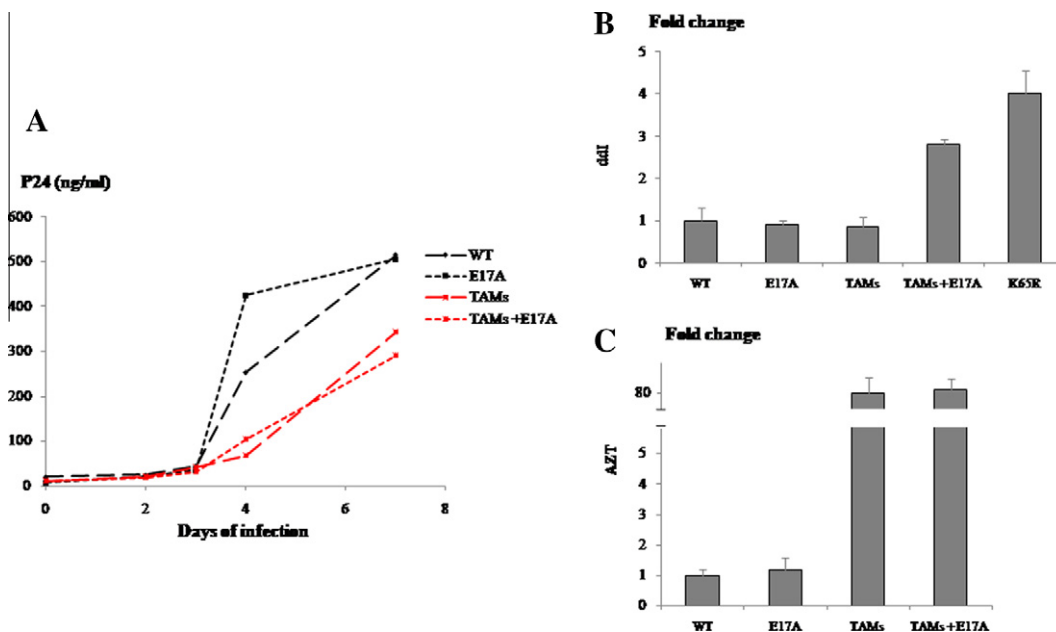


Fig. 4. Virological characterization of the VPR E17A. (A) Replication kinetics of RT and Vpr mutants. Replication kinetics of full-length NL4-3 WT and mutants derived from NL4-3: Vpr-E17A (E17A), RT-M41L, L210W, T215Y (TAMs) and Vpr-E17A + RT-M41L, L210W, T215Y (TAMs + E17A) viruses were determined using MT-2 T cells. Supernatants were collected every 1–3 days and assayed for viral p24 antigen. (B–C) Resistance of RT and Vpr mutants to didanosine. HeLa-P4 Cells were infected, in triplicate, with NL4-3 WT (WT), and mutants derived from NL4-3: Vpr-E17A (E17A), RT-K65R (K65R), RT-[M41L, L210W, T215Y] (TAMs) and Vpr-E17A + RT-[M41L, L210W, T215Y] (E17A + TAMs) viruses (equivalent of 5 ng of p24gag antigen). The single cycle titers of viruses were determined 48 h after infection by quantifying β -galactosidase activity in HeLa-P4 lysates in a colorimetric assay (the CPRG assay). Cells were infected with viruses and grown in the presence of increasing concentrations of didanosine (B) or AZT (C). The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was determined as the drug concentration giving 50% inhibition of β -galactosidase levels with respect to untreated infected cells. Drug susceptibility results were expressed as the fold change in susceptibility, defined as the ratio of the IC_{50} of the mutant variant to that of NL4-3 wild-type. Assays were performed three times.

rate of HIV-1 (Chen et al., 2004; Mansky, 1996). Additionally, a number of studies have confirmed that Vpr is contained within the reverse transcription complex (RTC) with the viral genome and some other viral proteins, including reverse transcriptase, integrase, nucleocapsid (NCp7), and small amounts of matrix (MA, p17Gag) (Farnet and Haseltine, 1991; Fassati and Goff, 2001; Le Rouzic and Benichou, 2005) in the early steps of the virus life cycle. Then, Vpr could remain associated with the viral DNA within 4–16 h after infection (Fassati and Goff, 2001).

Based on these observations, we speculated that Vpr could participate in viral diversity during the course of infection leading to the emergence of drug resistance associated mutations under antiretroviral treatment, either through the modulation of the virus mutation rate (Chen et al., 2004; Mansky, 1996) or, hypothetically, through direct or indirect interaction with RT within the RTC. We aimed at investigating Vpr alleles in patients failing ARV to assess whether their polymorphisms could have contributed in viral escape to ARV. We found a mutation in Vpr (E17A) located in the first α -helix to be associated with antiretroviral treatment failure. The first α -helix has been involved in several Vpr properties, including incorporation into virus particles and concentration of the protein in the nucleus and at the nuclear envelope (see Andersen et al. (2008), for review); nuclear localization of Vpr could be important for the Vpr requirement for efficient virus replication in non-dividing cells such as macrophages, but also for the Vpr-induced G2 arrest activity (de Noronha et al., 2001; Jacquot et al., 2007, 2009). Single-point Vpr mutants within this region showed significant alteration in these Vpr functions (see Andersen et al. (2008), for review). Here, we investigated whether Vpr E17A also alters the above-mentioned Vpr properties. However, our results indicate that this mutant has no impact on Vpr activity in terms of binding to its known cellular partners, subcellular localization and incorporation into virions. Specifically, E17A substitution had no impact on Vpr binding to UNG2, suggesting that this substitution has no impact on the viral mutation rate, thus excluding this mechanism as responsible for drug escape.

Considering drug resistance analysis in our HAART-treated population, Vpr E17A was associated with 3 thymidine analog mutations (TAMs) in RT (i.e., M41L, L210W and T215Y), but no association with RAMs to NNRTI or PIs was observed. By analyzing treatment histories of patients, we also observed a unique association between E17A and didanosine. Resistance to didanosine is frequently associated with mutations L74 V or K65R in RT (St Clair et al., 1991; Zhang et al., 1994) but has also been associated with viruses harboring a high numbers of TAMs (Flandre et al., 2007; Marcelin et al., 2005; Whitcomb et al., 2003). HIV-1 RT has the innate capacity to remove active metabolites of RT inhibitors such as didanosine in the presence of physiological concentration of ATP (Meyer et al., 1998). Thymidine analog mutations (TAMs) enhance NRTIs removal leading to drug resistance. *In vitro* assays using recombinant HIV-1 RT enzymes harboring TAMs compared levels of removal of NRTIs and demonstrated that AZT was the most efficiently removed NRTI and that the removal of didanosine was minimal (Naeger et al., 2002). This result is consistent with data indicating that in the context of a few number of TAMs, there is no or little impact on didanosine susceptibility (Flandre et al., 2007; Molina et al., 2005; Trivedi et al., 2008). In our study, using phenotypic assays, we confirmed that the presence of 3 TAMs-1 (M41L, L210W and T215Y) within the RT sequence does not significantly change didanosine susceptibility. However, we show that when combined with Vpr E17A, viruses with TAMs-1 demonstrate a significant reduction in susceptibility to didanosine. We also show that E17A does not enhance resistance to AZT (whether associated with TAMs or not); this observation reinforces the hypothesis that the association between TAMs and Vpr E17A in patients sequences would be more likely related to a potentializing effect

of viruses with TAMs in resistance to didanosine rather than a potential role in AZT resistance. Whether Vpr E17A increases the excision process of didanosine induced by TAMs is still to be determined.

In conclusion, our results clearly show an association between Vpr E17A, TAMs (M41L, L210W, and T215Y) and the use of didanosine. Consistently with phenotypic drug susceptibility assays, the observed association between TAMs and Vpr E17A in patients' sequences is related to a potentializing effect of viruses with TAMs in enhancing resistance to didanosine. One possible explanation is that the use of didanosine in viruses harboring TAMs may select for mutations in Vpr that, in turn, enhance resistance to didanosine. Alternatively, viruses harboring Vpr E17A before treatment may be more likely to develop resistance to didanosine when this drug is introduced into a regimen and when the patient is infected with a virus containing TAMs. Longitudinal studies need to be conducted to elucidate the kinetic of appearance of these mutations. As for mechanistic respects, functional and structural analysis of interaction between Vpr and RT should better characterize this association, specifically to determine if Vpr plays a role in the excision process induced by TAMs. Similarly, because integrase is also involved in the reverse transcription complex and has been shown to interact with Vpr (Gleenberg et al., 2007) studies evaluating the role of Vpr in resistance to integrase inhibitors should be conducted.

Competing Interests

The authors have declared that no competing interests exist.

Acknowledgments

We thank G. Le Mallier and P. Grange for their technical assistance.

This work was supported by 'Agence Nationale de recherche sur les SIDA et les hépatites virales' (ANRS), Sidaction, the Association de Recherche en Virologie et Dermatologie (ARVD) and the European Community's Seventh framework Program (FP7/2007-2013) under the project 'Collaborative HIV and Anti-HIV Drug Resistance Network' (CHAIN).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.antiviral.2011.11.008.

References

- Andersen, J.L., Le Rouzic, E., Planelles, V., 2008. HIV-1 Vpr: mechanisms of G2 arrest and apoptosis. *Exp. Mol. Pathol.* 85, 2–10.
- Armstrong, K.L., Lee, T.H., Essex, M., 2009. Replicative capacity differences of thymidine analog resistance mutations in subtype B and C human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 83, 4051–4059.
- Bachand, F., Yao, X.J., Hrimech, M., Rougeau, N., Cohen, E.A., 1999. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor. *J. Biol. Chem.* 274, 9083–9091.
- Belzile, J.P., Duisit, G., Rougeau, N., Mercier, J., Finzi, A., Cohen, E.A., 2007. HIV-1 Vpr-mediated G2 arrest involves the DDB1-CUL4AVPRBP E3 ubiquitin ligase. *PLoS Pathog.* 3, e85.
- Bishop, K.N., Holmes, R.K., Sheehy, A.M., Davidson, N.O., Cho, S.J., Malim, M.H., 2004. Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr. Biol.* 14, 1392–1396.
- Chen, R., Le Rouzic, E., Kearney, J.A., Mansky, L.M., Benichou, S., 2004. Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages. *J. Biol. Chem.* 279, 28419–28425.
- de Noronha, C.M., Sherman, M.P., Lin, H.W., Cavrois, M.V., Moir, R.D., Goldman, R.D., Greene, W.C., 2001. Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science* 294, 1105–1108.

- DeHart, J.L., Zimmerman, E.S., Ardon, O., Monteiro-Filho, C.M., Arganaraz, E.R., Planelles, V., 2007. HIV-1 Vpr activates the G2 checkpoint through manipulation of the ubiquitin proteasome system. *Virology* 4, 57.
- Delelis, O., Malet, I., Na, L., Tchertanov, L., Calvez, V., Marcelin, A.G., Subra, F., Deprez, E., Mouscadet, J.F., 2009. The G140S mutation in HIV integrases from raltegravir-resistant patients rescues catalytic defect due to the resistance Q148H mutation. *Nucleic Acids Res.* 37, 1193–1201.
- Depienne, C., Roques, P., Creminon, C., Fritsch, L., Casseron, R., Dormont, D., Dargemont, C., Benichou, S., 2000. Cellular distribution and karyophilic properties of matrix, integrase, and Vpr proteins from the human and simian immunodeficiency viruses. *Exp. Cell Res.* 260, 387–395.
- Farnet, C.M., Haseltine, W.A., 1991. Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J. Virol.* 65, 1910–1915.
- Fassati, A., Goff, S.P., 2001. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 75, 3626–3635.
- Flandre, P., Chappey, C., Marcelin, A.G., Ryan, K., Maa, J.F., Bates, M., Seekins, D., Bernard, M.C., Calvez, V., Molina, J.M., 2007. Phenotypic susceptibility to didanosine is associated with antiviral activity in treatment-experienced patients with HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 195, 392–398.
- Fourati, S., Malet, I., Binka, M., Boukobza, S., Wirden, M., Sayon, S., Simon, A., Katlama, C., Simon, V., Calvez, V., Marcelin, A.G., 2010. Partially active HIV-1 Vif alleles facilitate viral escape from specific antiretrovirals. *AIDS* 24, 2313–2321.
- Gleenberg, I.O., Herschhorn, A., Hizi, A., 2007. Inhibition of the activities of reverse transcriptase and integrase of human immunodeficiency virus type-1 by peptides derived from the homologous viral protein R (Vpr). *J. Mol. Biol.* 369, 1230–1243.
- Goh, W.C., Rogel, M.E., Kinsey, C.M., Michael, S.F., Fultz, P.N., Nowak, M.A., Hahn, B.H., Emerman, M., 1998. HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat. Med.* 4, 65–71.
- Jacquot, G., Le Rouzic, E., David, A., Mazzolini, J., Bouchet, J., Bouaziz, S., Niedergang, F., Pancino, G., Benichou, S., 2007. Localization of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope: impact on Vpr functions and virus replication in macrophages. *Retrovirology* 4, 84.
- Jacquot, G., Le Rouzic, E., Maidou-Peindara, P., Maizy, M., Lefrere, J.J., Daneluzzi, V., Monteiro-Filho, C.M., Hong, D., Planelles, V., Morand-Joubert, L., Benichou, S., 2009. Characterization of the molecular determinants of primary HIV-1 Vpr proteins: impact of the Q65R and R77Q substitutions on Vpr functions. *PLoS ONE* 4, e7514.
- Jetzt, A.E., Yu, H., Klarmann, G.J., Ron, Y., Preston, B.D., Dougherty, J.P., 2000. High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J. Virol.* 74, 1234–1240.
- Kamata, M., Aida, Y., 2000. Two putative alpha-helical domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr mediate nuclear localization by at least two mechanisms. *J. Virol.* 74, 7179–7186.
- Langevin, C., Maidou-Peindara, P., Aas, P.A., Jacquot, G., Otterlei, M., Slupphaug, G., Benichou, S., 2009. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr modulates cellular expression of UNG2 via a negative transcriptional effect. *J. Virol.* 83, 10256–10263.
- Larder, B.A., Chesebro, B., Richman, D.D., 1990. Susceptibilities of zidovudine-susceptible and -resistant human immunodeficiency virus isolates to antiviral agents determined by using a quantitative plaque reduction assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 436–441.
- Larder, B.A., Kemp, S.D., 1989. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* 246, 1155–1158.
- Lavallee, C., Yao, X.J., Ladha, A., Gottlinger, H., Haseltine, W.A., Cohen, E.A., 1994. Requirement of the Pr55gag precursor for incorporation of the Vpr product into human immunodeficiency virus type 1 viral particles. *J. Virol.* 68, 1926–1934.
- Le Rouzic, E., Belaidouni, N., Estrabaud, E., Morel, M., Rain, J.C., Transy, C., Margottin-Goguet, F., 2007. HIV1 Vpr arrests the cell cycle by recruiting DCAF1/VprBP, a receptor of the Cul4-DBB1 ubiquitin ligase. *Cell Cycle* 6, 182–188.
- Le Rouzic, E., Benichou, S., 2005. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology* 2, 11.
- Levy, D.N., Aldrovandi, G.M., Kutsch, O., Shaw, G.M., 2004. Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 4204–4209.
- Malet, I., Delelis, O., Valantin, M.A., Montes, B., Soulie, C., Wirden, M., Tchertanov, L., Peytavin, G., Reynes, J., Mouscadet, J.F., Katlama, C., Calvez, V., Marcelin, A.G., 2008. Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1351–1358.
- Mansky, L.M., 1996. The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene. *Virology* 222, 391–400.
- Mansky, L.M., Preveral, S., Selig, L., Benarous, R., Benichou, S., 2000. The interaction of Vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 in vivo mutation rate. *J. Virol.* 74, 7039–7047.
- Mansky, L.M., Temin, H.M., 1995. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J. Virol.* 69, 5087–5094.
- Marcelin, A.G., Flandre, P., Pavie, J., Schmidely, N., Wirden, M., Lada, O., Chiche, D., Molina, J.M., Calvez, V., 2005. Clinically relevant genotype interpretation of resistance to didanosine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1739–1744.
- Meyer, P.R., Matsuura, S.E., So, A.G., Scott, W.A., 1998. Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 13471–13476.
- Molina, J.M., Marcelin, A.G., Pavie, J., Heripret, L., De Boever, C.M., Troccaz, M., Leleu, G., Calvez, V., 2005. Didanosine in HIV-1-infected patients experiencing failure of antiretroviral therapy: a randomized placebo-controlled trial. *J. Infect. Dis.* 191, 840–847.
- Morellet, N., Bouaziz, S., Petitjean, P., Roques, B.P., 2003. NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR. *J. Mol. Biol.* 327, 215–227.
- Moutouh, L., Corbeil, J., Richman, D.D., 1996. Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 6106–6111.
- Naeger, L.K., Margot, N.A., Miller, M.D., 2002. ATP-dependent removal of nucleoside reverse transcriptase inhibitors by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2179–2184.
- 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.
- Planelles, V., Benichou, S., 2009. Vpr and its interactions with cellular proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 339, 177–200.
- St Clair, M.H., Martin, J.L., Tudor-Williams, G., Bach, M.C., Vavro, C.L., King, D.M., Kellam, P., Kemp, S.D., Larder, B.A., 1991. Resistance to ddI and sensitivity to AZT induced by a mutation in HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 253, 1557–1559.
- Trivedi, V., Von Lindern, J., Montes-Walters, M., Rojo, D.R., Shell, E.J., Parkin, N., O'Brien, W.A., Ferguson, M.R., 2008. Impact of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitor drug resistance mutation interactions on phenotypic susceptibility. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 24, 1291–1300.
- Whitcomb, J.M., Parkin, N.T., Chappey, C., Hellmann, N.S., Petropoulos, C.J., 2003. Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. *J. Infect. Dis.* 188, 992–1000.
- Winters, M.A., Shafer, R.W., Jellinger, R.A., Mamtora, G., Gingeras, T., Merigan, T.C., 1997. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase genotype and drug susceptibility changes in infected individuals receiving didanosine monotherapy for 1 to 2 years. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 757–762.
- Zhang, D., Caliendo, A.M., Eron, J.J., DeVore, K.M., Kaplan, J.C., Hirsch, M.S., D'Aquila, R.T., 1994. Resistance to 2', 3'-dideoxycytidine conferred by a mutation in codon 65 of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 282–287.