Variants non-M du VIH-1 : Sensibilité naturelle aux inhibiteurs d'intégrase et d'attachement, réponses immunologique et virologique des patients aux antirétroviraux.

Elodie Alessandri

▶ **To cite this version:**

Elodie Alessandri. Variants non-M du VIH-1 : Sensibilité naturelle aux inhibiteurs d'intégrase et d'attachement, réponses immunologique et virologique des patients aux antirétroviraux.. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR016 . tel-01822401

HAL Id: tel-01822401
https://theses.hal.science/tel-01822401

Submitted on 25 Jun 2018

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.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Sciences de la Vie et de la Santé

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Variants non-M du VIH-1:
Etude de la Sensibilité Naturelle aux Inhibiteurs d'Intégrase et d'Attachement, Réponses Immunologique et Virologique des Patients aux Antirétroviraux

Présentée et soutenue par
Elodie ALESSANDRI-GRADT

Thèse soutenue publiquement le 22 février 2018 devant le jury composé de			
Madame Anne-Geneviève MARCELIN	Professeur,	Université Paris-Pierre-et-Marie-Curie	Rapporteur
Monsieur Thibault MESPLEDE	Professeur assistant,	Université McGill-Montréal	Rapporteur
Madame Diane DESCAMPS	Professeur,	Université Paris-Diderot	Examinateur
Madame Juliette PAVIE	Praticien hospitalier,	Assistance Publique des Hôpitaux de Paris	Examinateur
Monsieur François SIMON	Professeur,	Université Paris-Diderot	Examinateur
Monsieur Jean-Christophe PLANTIER	Professeur,	Université de Rouen-Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Jean-Christophe PLANTIER, Laboratoire GRAM EA2656

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

EdNBISE
Ecole doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement

GRAM 2.0

Dans la pénombre de la pièce, règne une odeur de larmes et de mort.
Le virus est là, insupportable vainqueur…

Route de Paradis, 1995

J'adresse ma profonde gratitude,

Au Professeur Jean-Christophe Plantier,

Pour m'avoir permis d'évoluer au sein de votre équipe depuis presque 10 ans. Votre grande rigueur scientifique, votre passion pour la recherche et votre perception particulièrement fine et juste des situations, sont sources d'enseignement quotidien. J'ai une très grande reconnaissance de votre soutien permanent à la concrétisation de mes choix de carrière.

Aux Professeurs Anne-Geneviève Marcelin et Thibault Mesplède,

Pour avoir accepté la charge d'examiner ce travail. C'est un honneur de bénéficier de votre expertise.

Au Professeur François Simon,

Pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse et pour votre intérêt à suivre et participer à nos travaux sur la diversité du VIH.

Au Professeur Diane Descamps,

Pour l'honneur que vous me faites de siéger dans ce jury. Recevez toute ma reconnaissance pour nos collaborations et nos échanges scientifiques fructueux.

Au Docteur Juliette Pavie,

Pour avoir accepté de siéger dans ce jury. C'est avec joie que je vous présente aujourd'hui les résultats de notre collaboration sur le projet ORIVAO.

J'exprime mes plus sincères remerciements,

Au Docteur Charlotte Charpentier,
Pour ta contribution à l'interprétation de certains de nos résultats.

A Gilles Collin,
Pour votre enseignement de l'art de la culture virale et des techniques phénotypiques.

Aux Docteurs François Cordonnier et Philippe Mauclère,
Aux cliniciens et virologues des différents sites de prises en charge,
Qui avez participé activement au recueil des informations et échantillons nécessaires à notre travail.

A toute l'équipe du laboratoire de virologie du CHU de Rouen, notamment
mes collègues biologistes Marie, Pierre, Thomas et Véronique, pour votre soutien et votre aide ; particulièrement *Adeline*, qui a tout mis en œuvre pour alléger mon quotidien hospitalier, ces derniers temps ;
mes collègues ingénieures Fabienne et Marie, pour votre expérience et votre éternel optimisme ;
mes collègues cadres de santé et techniciens et pour n'en citer qu'une, *Fanny*, pour ton indéniable contribution technique mais surtout ta générosité et ta précieuse amitié ;
mes collègues assistantes, secrétaires et agents du pré-analytique, dont Sandy, qui depuis sa récente arrivée apporte son aide en toute discrétion ;
la « team ORIVAO », pour son exceptionnel dynamisme !

A l'équipe d'accueil EA 2656 - GRAM,

ses directeurs, les Professeurs François Caron et Astrid Vabret, pour votre enthousiasme à faire évoluer l'équipe et encourager les jeunes générations ;
le Professeur Martine Pestel-Caron, pour votre bienveillance et votre écoute attentive ;
Anne Tourneroche, pour l'expérience de l'encadrement de ton Master 2, ta contribution personnelle à ce travail et l'amitié qui en a découlé ;
Paul-Alain Ngoupo, pour nos échanges avec le Centre Pasteur du Cameroun et le plaisir de travailler ensemble.

A Guillemette et Alice,
mes consœurs de doctorat et tellement plus enco(eu)re…

A ceux qui donnent du sens à tout ça,

Thibault, Arthur et Zélie,
même si je patauge et perds parfois les pédales dans notre marathon quotidien, vous êtes le souffle de bonheur qui me ressource à tout instant : mille fois Merci !

Mes parents, grands-parents, beaux-parents, frères et sœurs,
votre générosité sans limite est inestimable ; votre bienveillance, une bénédiction : un très grand Merci !

Valérie & Olivier, Aline, Amélie, Aurélie C, Aurélie S, Isabelle, Sophie
et leurs tribus respectives,
tant de belles et précieuses amitiés qui ressourcent : Merci !

Et en dehors de tout phénomène de recombinaison,
comment ne pas remercier « MOMO » ?

Ce travail a été réalisé avec le soutien financier de la région Normandie,
du CHU-hôpitaux de Rouen et de l'université de Rouen Normandie,
de l'ANRS (France Recherche Nord & Sud SIDA-HIV-Hepatites) et
du SIDACTION.

RESUME

L'importante diversité génétique des VIH-1 a conduit à la classification actuelle en 4 groupes - M, N, O et P - dont seul le premier est pandémique. Les VIH-1 non-M sont endémiques au Cameroun, mais circulent aussi en France, du fait de liens étroits entre les deux pays. Il a été largement démontré que la diversité génétique, en particulier des VIH-1/O, avait un impact sur les tests de dépistage sérologique et de quantification virale. En revanche, peu de données sont disponibles quant aux conséquences de cette diversité génétique sur la prise en charge thérapeutique des patients infectés. Il a été décrit *in vitro* que la présence naturelle de la mutation Y181C conduisait à une résistance naturelle aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse, et que le polymorphisme important de la protéase avait un impact au moins génotypique, sur l'utilisation de certaines molécules, limitant ainsi les options thérapeutiques ; d'autre part, la réponse immuno-virologique des patients aux antirétroviraux (ARV) est méconnue, du fait d'études anciennes et/ou réalisées sur un nombre limité de patients. Les objectifs de ce travail était donc i) d'étudier la sensibilité naturelle des VIH-1/non-M aux classes d'ARV les plus récentes ; ii) d'analyser la réponse immuno-virologique aux ARV d'un grand nombre de patients infectés par un VIH-1/O et chez l'unique patiente infectée par un VIH1/P actuellement suivie. En lien avec l'usage actuellement répandu des inhibiteurs d'intégrase (INI), nous avons montré sur un large panel de 39 isolats cliniques VIH-1 non-M, l'absence d'impact majeur du polymorphisme naturel de l'intégrase sur la sensibilité phénotypique au raltegravir et au dolutegravir mais une importante disparité des réponses phénotypiques avec l'elvitegravir, possiblement corrélée à l'association de 4 mutations sur l'intégrase (V72I, I200L, N222K et R224Q). Nous avons également établi que le polymorphisme génétique des variants non-M, avec la présence naturelle des mutations M426L, M434I et S375H/M de la gp120, variables selon les groupes, serait préjudiciable à l'efficacité du fostemsavir, représentant de la nouvelle classe des inhibiteurs d'attachement. Aussi, l'analyse de la réponse immuno-virologique aux ARV de 101 patients infectés par un VIH-1/O et vivant en France a permis de montrer que la réponse était globalement satisfaisante. En nous intéressant plus particulièrement aux patients recevant une trithérapie incluant un INI lors d'un échec ou d'un switch, nous avons observé un taux de succès virologique de 80 à 90%, résultats en cohérence avec nos données phénotypiques et en faveur des recommandations à utiliser largement cette classe ; lors des échecs virologiques, l'émergence des mutations de résistance suivait, *a minima*, des voies de sélection similaires à celles décrites pour les VIH-1/M. Enfin, le suivi de la patiente RBF168 infectée par un VIH-1/P a été l'occasion de décrire pour la première fois, l'évolution naturelle de cette infection rare, l'excellente réponse immuno-virologique, mais aussi le polymorphisme génétique de cette souche singulière. Nous avons enfin étudié certaines des propriétés virologiques de la souche RBF168 en lien avec ses capacités d'adaptation à l'Homme.

L'ensemble de nos travaux a contribué à obtenir des données sur l'impact du polymorphisme génétique des VIH-1 non-M aux nouvelles classes thérapeutiques et sur la réponse immuno-virologique des patients. Ces nouvelles connaissances permettront d'adapter en conséquence et d'améliorer, la prise en charge thérapeutique des patients infectés par ces variants divergents, aussi bien en France qu'en zone d'endémie.

ABSTRACT

The high genetic diversity of the HIV-1 leads to a classification in 4 distinct groups: M, N, O and lastly P, but only the first being pandemic. The non-group M HIV-1 (non-M HIV-1) are endemic in Cameroon, but are also found in France due to the close link between the two countries. The high genetic diversity, particularly for HIV-1/O, has an impact on the serological screening assay and the viral quantification. But, little is known about the consequences on the therapeutic management. In vitro, it has been shown that the Y181C mutation lead to the natural resistance of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors and the high level of polymorphism in the protease region had a genotypic impact on several drugs, restricting the therapeutic options. The immune-virological response to antiretroviral drugs (ARV) is also unknown, because of old studies and/or in a limited number of patients. Our aims were the study of the natural susceptibility of the non-M HIV-1 to the most recent class of ARV and the analysis of the immuno-virological response, in a large cohort of HIV-1/O-infected patients and the unique patient infected with an HIV-1/P still followed up. From the current usage of the new class of integrase strand transfer inhibitors (INSTI), we have demonstrated for the first time on a panel of 39 non-M HIV-1 clinical isolates, that i) the natural genetic integrase polymorphism has no major impact on the phenotypic susceptibility to raltegravir, dolutegravir ii) a wide disparity of phenotypic response to elvitegravir exists and could be correlated to the association of 4 mutations in the integrase (V72I, I200L, N222K and R224Q). We also showed that the non-M HIV-1 natural polymorphism, with the presence of the M426L, M434I and S375H/M on the gp120, according to the group, would be detrimental to the efficacy of fostemsavir, the representative of the emerging class of attachment inhibitors. Then, we analysed the immunological and virological response to ARV, of 101 patients HIV-1/O infected and living in France, in the ORIVAO ANRS EP50 study. This unique data on the largest cohort of patients, allowed us to demonstrate a good. Focusing on the patients receiving a combination including an INSTI (at a failure or in a switch), a high virological success rate was observed (around 80 to 90%), confirming our phenotypic results and arguing for a wide usage of this class. At a failure, the emergence of resistance mutations was, at least, not different from the one observed in HIV-1/M.

Lastly, the unique monitoring of the RBF168 patient infected by an HIV-1/P strain, provided the opportunity to describe, for the first time, the natural evolution, the excellent immuno-virological response, the natural genetic polymorphism and this unique strain and to study some of its virological properties, linked with its adaptation to the Human host.

All together, these data contribute to describe the impact of the natural genetic polymorphism of non-M HIV-1 on the new class of drugs, better characterize the immune-virological response and finally allow to adapt the therapeutic management of the infected patients in France as well as in the endemic area.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyRiboNucléique

ANRS : Agence Nationale de Recherche contre le SIDA et les hépatites virales

ARN : Acide RiboNucléique

ARV : AntiRétroViral

cARV : combinaison AntiRétroVirale

CI50 : Concentration inhibitrice 50%

CMSP : Cellules Mononuclées du Sang Périphérique

CNR : Centre National de Référence

CRF : *« Circulating Recombinant Form »* ou Forme Recombinante Circulante

CVp : Charge Virale plasmatique

DO : Densité Optique

DTG : Dolutegravir

EVG : Elvitegravir

FC : *« Fold Change »*

IN : Integrase

INI : Inhibiteur d'Intégrase

INNTI : Inhibiteur Non Nucléosidique de la Transcriptase Inverse

INTI: Inhibiteur Nucléos(t)idique de la Transcriptase Inverse

IP : Inhibiteur de Protéase

LTR : *« Long Terminal Repeat » ou séquences répétées terminales*

MAR : Mutation Associée à la Résistance

pb : paires de bases

PR : Protéase

RAL : Raltegravir

RDC : République Démocratique du Congo

TCID50 : *« 50% Tissue Culture Infective Dose »*

TI : Transcriptase Inverse

SIDA : Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise

URF : *« Unique Recombinant Form »* ou Forme recombinante unique

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VIS : Virus de l'Immunodéficience Simienne

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Arbres phylogénétiques comparatifs des séquences de VIH-1/O (a) et M (b). 3
Figure 2. Relations phylogénétiques entre les différents groupes de VIH-1, VIScpz et VISgor. 5
Figure 3. Dynamique de croissance des populations de VIH-1/O. 7
Figure 4. Modèle de transmission globale mondiale du VIH-1. 8
Figure 5. Schéma d'organisation du génome du VIH-1. 10
Figure 6. Cycle de réplication du VIH. 11
Figure 7. Représentation schématique de la TI du VIH-1. 12
Figure 8. Histoire naturelle de l'infection par le VIH-1. 19
Figure 9. Profil comparatif des réactivités des différents groupes de VIH-1 au Western-Blot 21
Figure 10. Cinétique d'émergence d'un virus résistant au traitement administré 31
Figure 11. Efficacité relative des ARV par rapport à leur barrière génétique à la résistance..... 32
Figure 12. Arbre phylogénétique des 40 séquences d'intégrase du panel analysé 47
Figure 13. Arbre phylogénétique des 111 séquences de gp120 (2577pb) de VIH-1 non-M et de la séquence de référence VIH-1/M BRU-HXB2..... 48
Figure 14. Schéma des dépôts réalisés en plaque 96 puits lors du test phénotypique. 49
Figure 15. CI50 des VIH-1 non-M obtenues avec RAL. 54
Figure 16. CI50 des VIH-1 non-M obtenues avec DTG. 55
Figure 17. CI50 des VIH-1 non-M obtenues avec EVG. 56
Figure 18. Fréquence (%) et nature des résidus retrouvés pour les VIH-1/N et P, sur les positions associées à la résistance des VIH-1/M au fostemsavir. 62
Figure 19. Fréquences (%) et nature des résidus des VIH-1/O selon le sous-groupe H ou T, sur les positions à la résistance des VIH-1/M au fostemsavir..... 62
Figure 20. Statut virologique à l'introduction d'une cARV avec INI (N=39 patients) en fonction des molécules prescrites (RAL, EVG, DTG)..... 78
Figure 21. Statut virologique au dernier point de suivi des patients recevant une cARV avec INI (N=37 patients), selon la molécule reçue (RAL, EVG ou DTG). 80
Figure 22. Suivi immunologique et virologique de la patiente RBF168 sur la période sans ARV.. 91
Figure 23. Suivi immunologique et virologique de la patiente RBF168 sur la période avec ARV.. 93

Tableau 1. Fréquence (%) des mutations naturelles courantes des VIH-1/O sur la PR. 35
Tableau 2. Fréquence (%) des mutations naturelles courantes des VIH-1/O sur la TI. 36
Tableau 3. Fréquence (%) des mutations naturelles courantes des VIH-1/O sur l'IN. 37
Tableau 4. Caractéristiques des 39 isolats cliniques VIH-1 non-M et de la souche de référence BRU-HXB2. 45
Tableau 5. Liste des mutations de résistance aux INI prises en compte dans l'analyse de sensibilité génotypique aux INI. 52
Tableau 6. Résultats de CI50 et FC par ordre alphabétique d'isolat pour RAL, DTG et EVG. 53
Tableau 7. Fréquence des mutations retrouvées aux positions associées à la résistance aux INI parmi les 39 isolats VIH-1 non-M 58
Tableau 8. Nombre de souches présentant des mutations aux positions associées à la résistance selon leur niveau de FC et fréquence (en % par rapport à l'ensemble du panel N=39) 59
Tableau 9. Résultats de l'analyse VESPA en fonction des catégories de FC des souches à l'EVG. 60
Tableau 10. Liste des techniques commerciales non adaptées à la quantification des VIH-1/O.. 70
Tableau 11. Caractéristiques épidémiologiques des patients inclus dans l'étude ORIVAO. 73
Tableau 12. Données virologiques et thérapeutiques des patients initiant une cARV avec INNTI. 74
Tableau 13. Profil de résistance des deux patients en échec d'une première ligne d'INNTI. 75
Tableau 14. Détails des classes thérapeutiques des cARV, à l'initiation des INI (N= 39). 78
Tableau 15. Caractéristiques virologiques et thérapeutiques des patients avec CVp positive au dernier point de suivi de la première ligne d'INI. 79
Tableau 16. Mutations présentes lors des 8 échecs aux INI sur les positions associées à la résistance selon l'algorithme ANRS v27 et aux positions identifiées comme associées aux FC élevés. 82
Tableau 17. Polymorphisme naturel des régions PR, RT IN et GP41 des souches RBF168 et 06CMU14788. 92

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1
1. Diversité génétique des VIH-1 1
1.1. Classification 1
1.2. Les origines simiennes des VIH-1 4
1.3. Les origines de l'épidémie 6
1.4. Epidémiologie actuelle 7
1.4.1. Répartition mondiale des infections à VIH-1/M 7
1.4.2. Restriction géographique africaine des infections à VIH-1 non-M 8
1.4.2.1. Le groupe P 8
1.4.2.2. Le groupe N 9
1.4.2.3. Le groupe O 9
2. Cycle de réplication du VIH et mécanismes générant la diversité génétique 9
2.1. Description moléculaire du VIH-1 et de son cycle de réplication 9
2.1.1. Les protéines de structure 10
2.1.1.1. Le gène *env* et l'étape d'entrée 10
2.1.1.2. Le gène *pol* et les étapes précoces 12
2.1.1.3. Le gène *gag* et les étapes tardives 14
2.1.2. Les protéines accessoires 15
2.2. Mécanismes moléculaires générant la diversité génétique 16
2.2.1. La faible fidélité de la transcriptase inverse 16
2.2.2. La recombinaison virale 17
3. Conséquences viro-cliniques de la diversité génétique des VIH-1/non-M 17
3.1. Histoire naturelle 17
3.2. Diagnostic et suivi virologique 20
3.2.1. Performances des outils de diagnostic sérologique 20
3.2.2. Performances des outils de suivi moléculaire 22
3.3. Propriétés virologiques 23
3.3.1. Le tropisme viral 23
3.3.2. Le fitness viral et l'adaptation à l'hôte 24
3.3.3. La réponse virale aux facteurs de restriction cellulaire 25
4. Prise en charge thérapeutique de l'infection à VIH-1 et conséquences de la diversité génétique des VIH-1 non-M 26
4.1. Les thérapeutiques antirétrovirales actuelles 26
4.1.1. Les inhibiteurs d'entrée 26
4.1.2. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse 27
4.1.3. Les inhibiteurs de protéase 28
4.1.4. Les inhibiteurs d'intégrase 29

4.1.5. Les stratégies en cours de développement 29
4.1.5.1. Les inhibiteurs d'attachement 29
4.1.5.2. Les inhibiteurs de capside 29
4.1.5.3. Les inhibiteurs de maturation 30
4.1.5.4. Les inhibiteurs allostériques de l'intégrase ou ALLINIs 30
4.2. Variabilité virale et résistance sélectionnée par un traitement antirétroviral 30
4.2.1. Mécanismes de sélection de virus résistants 30
4.2.2. Méthodes d'analyse de la sensibilité aux ARV 32
4.2.2.1. Analyse génotypique 32
4.2.2.2. Analyse phénotypique 33
4.3. Impact de la diversité génétique des VIH-1/non-M 34
4.3.1. Sensibilité génotypique naturelle 34
4.3.2. Sensibilité phénotypique naturelle 39
4.3.3. Réponse immuno-virologique des patients infectés par un VIH-1 non-M 40

PARTIE 1 : 42

ETUDE DE LA SENSIBILITE NATURELLE DES VIH-1 NON-M AUX INHIBITEURS D'INTEGRASE ET D'ATTACHEMENT 42

1. Problématique et objectifs 42
2. Echantillons et méthodes 44
2.1. Echantillons 44
2.1.1. Isolats cliniques 44
2.1.2. Séquences des régions cibles des INI et Inhibiteurs d'attachement 46
2.1.2.1. Gène *pol* 46
2.1.2.2. Gène *env* 47
2.2. Analyse de la sensibilité naturelle aux INI et au fostemsavir 48
2.2.1. Sensibilité phénotypique aux INI 48
2.2.2. Sensibilité génotypique aux INI et au fostemsavir 51
2.2.2.1. Sensibilité aux INI 51
2.2.2.2. Sensibilité au fostemsavir 51
3. Résultats 53
3.1. Sensibilité naturelle des VIH-1 non-M aux INI 53
3.1.1. Sensibilité phénotypique 53
3.1.2. Sensibilité génotypique 57
3.1.3. Recherche de déterminants génotypiques liés aux niveaux de sensibilité phénotypique 59
3.2. Sensibilité génotypique des VIH-1 non-M au fostemsavir 61
4. Discussion 63

PARTIE 2 : ... 67

REPONSES IMMUNOLOGIQUE ET VIROLOGIQUE AUX ANTIRETROVIRAUX DES PATIENTS INFECTES PAR DES VIH-1 NON-M ... 67

1. Problématique et objectifs ... 67
2. Réponses immunologique et virologique aux ARV des patients infectés par un VIH-1/O ... 69
   2.1. Etude SIDACTION/ANRS EP50 ORIVAO ... 69
      2.1.1. Patients inclus ... 69
      2.1.2. Méthodes ... 70
         2.1.2.1. Recueil des données ... 70
         2.1.2.2. Suivi virologique ... 70
         2.1.2.3. Analyses statistiques ... 71
            2.1.2.3.1. Analyse longitudinale ... 71
            2.1.2.3.2. Analyse transversale ... 72
      2.1.3. Résultats ... 72
         2.1.3.1. Analyse longitudinale ... 73
         2.1.3.2. Analyse transversale ... 75
   2.2. Réponse virologique des patients recevant un traitement incluant un INI ... 76
      2.2.1. Patients inclus ... 76
      2.2.2. Méthodes ... 76
      2.2.3. Résultats ... 77
         2.2.3.1. Caractéristiques des patients à l'inclusion ... 77
         2.2.3.2. Réponse virologique des patients à la première ligne d'INI ... 79
         2.2.3.3. Réponse virologique des patients au dernier point de suivi ... 80
         2.2.3.4. Analyse des mutations de résistances aux INI présentes à l'échec ... 81
   2.3. Discussion ... 83
3. Réponses immunologique et virologique aux ARV de la patiente infectée par la souche prototype VIH-1/P RBF168 et caractéristiques phénotypiques de la souche ... 89
   3.1. Problématique et objectifs ... 89
   3.2. Patiente et méthodes ... 90
      3.2.1. Suivi et prise en charge thérapeutique de la patiente RBF168 ... 90
      3.2.2. Caractéristiques phénotypiques de la souche prototype ... 90
   3.3. Résultats ... 91
      3.3.1. Suivi de l'évolution immunologique et virologique de la patiente RBF168 ... 91
      3.3.2. Caractéristiques phénotypiques de la souche RBF168 ... 93
   3.4. Discussion ... 95

C**ONCLUSIONS ET PERSPECTIVES** ... 98

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ... 101

ANNEXES ... 118

INTRODUCTION

Depuis la caractérisation du Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA) en 1981 [1,2], puis la découverte successive de son agent causal, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) en 1983 [3], l'infection à VIH a connu une expansion sans précédent. Plus de 70 millions de cas ont été recensés depuis le début de l'épidémie, avec une importante disparité géographique, l'Afrique subsaharienne demeurant la région du monde la plus sévèrement touchée [4].

La remarquable variabilité génétique du VIH et son importante capacité d'évolution, du fait d'un haut niveau d'adaptation du virus à son hôte et à son environnement, contribuent à l'entretien de l'épidémie et de la diversité génétique de ce virus.

1. Diversité génétique des VIH-1

1.1. Classification

L'existence de différences génétiques entre les virus responsables de SIDA a permis d'identifier très tôt des variants distincts : le VIH de type 1 (VIH-1) fut mis en évidence pour la première fois chez un patient homosexuel avec lymphadénopathies multiples [3] ; le VIH de type 2 (VIH-2), suspecté initialement à partir de la réactivité sérologique particulière d'échantillons issus de travailleuses du sexe sénégalaises [5], fut isolé des prélèvements de deux patients en stade SIDA, mais n'ayant pas présenté de réactivité sérologique sur les tests commerciaux de l'époque [6]. Bien que partageant des caractères morphologiques et biologiques communs, le VIH-2 s'est d'emblée distingué du VIH-1 par la nature des glycoprotéiques d'enveloppe et une composition antigénique singulière [7,8]. La nomenclature s'est ensuite enrichie au fil de multiples caractérisations moléculaires, rendant compte des propriétés génotypiques, mais aussi phénotypiques distinctes de chaque virus. Les VIH-1 sont actuellement subdivisés en 4 groupes : M, O, N et P, selon la chronologie de leur découverte.

Aux prémices de l'épidémie à VIH, on distinguait les entités virales « américaines » et « zaïroise » sur la base de leur origine géographique [9] et de la variabilité des gènes d'enveloppe [10]. Au fil des caractérisations toujours plus nombreuses, permises par les avancées technologiques concomitantes et les performances croissantes des analyses phylogénétiques, un système de classification par sous-types [11,12] a été constitué au sein du groupe majoritaire, ou groupe M. Les virus les plus

anciennement découverts appartiennent aux sous-types dits « purs », résultats d'effets fondateurs indépendants regroupant de multiples virus aux caractéristiques virologiques issues d'une souche initiale unique. Aussi, les virus issus de la recombinaison entre des sous-types purs, ont été classés comme formes recombinantes uniques (*Unique Recombinant Form*-URF), lorsque décrites chez un individu unique, ou formes recombinantes circulantes (*Circulating Recombinant Form*-CRF), si issues de plusieurs patients (3 ou plus) sans lien épidémiologique direct [13]. La classification actuelle comptabilise 9 sous-types (et 5 sous-sous-types nommés A (A1 ; A2 ; A3), B, C, D, F (F1 ; F2), G, H, J et K, ayant chacun subi une évolution phylogénétique distincte et dont certains ont une prévalence plus élevée en fonction des régions géographiques concernées. La diversité génétique intra sous-type est de 15 à 20% et atteint 25 à 35% entre différents sous-types, réalisant par conséquence de véritables mosaïques virales [14,15]. Ce système de classification consensuel, fondé sur le principe de distances génétiques, fait l'objet d'une évolution permanente, dont les multiples mises à jour visent à refléter le plus fidèlement l'état des connaissances. Le nombre de CRF recensées à ce jour s'élève ainsi à plus de 90, dont quelques-unes sont devenues prédominantes dans certaines régions du globe comme la CRF01_AE et CRF02_AG, circulant de manière majoritaire en Thaïlande et en Afrique de l'ouest respectivement.

Décrit en 1990 chez un couple d'origine camerounaise, résidant en Belgique, un variant (ANT-70) révéla quant à lui, des différences antigéniques significatives qui ne permettaient pas de le relier aux VIH-2 et seulement partiellement aux VIH-1 [16]. Secondairement, le virus MVP-5180, isolé d'un patient camerounais en stade SIDA, confirma la divergence déjà observée, particulièrement dans la boucle V3 de l'enveloppe [17]. Enfin, la description du virus VAU par une équipe française, permit d'affirmer le lien phylogénétique entre les 3 virus, permettant de les rassembler sous l'entité « groupe O » pour *outlier*, malgré la diversité génétique propre à chaque souche [18]. L'importante diversité génétique intra-groupe est une caractéristique majeure de ce groupe [19-22] et a donné lieu à plusieurs systèmes de classification. Calqués sur le modèle du groupe M, les travaux de Roques *et al.* et Yamaguchi *et al.* ont initialement proposé un système de répartition en 3 clades phylogénétiques (A, B, C) ou 5 clusters (I, II, III, IV, V) respectivement [23,24]. Mais, une étude de Leoz *et al*. en 2008, réalisée sur 117 séquences du gène *pol* de VIH-1/O montrait les limites et discordances de ces 2 systèmes [25]. Un troisième modèle de classification proposé en 2010 par Tebit *et al.*, était basé sur la nature du résidu en position 181 du gène de la transcriptase inverse (TI), cystéine (C)

ou tyrosine (Y), définissant ainsi 2 lignées : 181C et 181Y [26]. Mais cette classification présentait des discordances : de nombreuses souches 181Y se positionnant phylogénétiquement dans la lignée 181C. Finalement, la récente étude de la topologie de l'arbre phylogénétique des VIH-1/O a permis de démontrer que cette diversité intra-groupe résultait de la diversification des virus au cours de différentes phases évolutives [27]. En effet, la topologie traditionnelle en double étoile des arbres phylogénétiques des VIH-1/M, issue d'effets fondateurs indépendants, n'est pas retrouvée chez les VIH-1/O. Du fait de plusieurs phases de diversification, celui-ci prend plutôt un aspect en comète, dont la tête (*head*) rassemble les souches « H » représentatives des souches devenues prédominantes et la queue (*tail*) les souches « T » représentatives de souches plus « anciennes » (Figure 1).

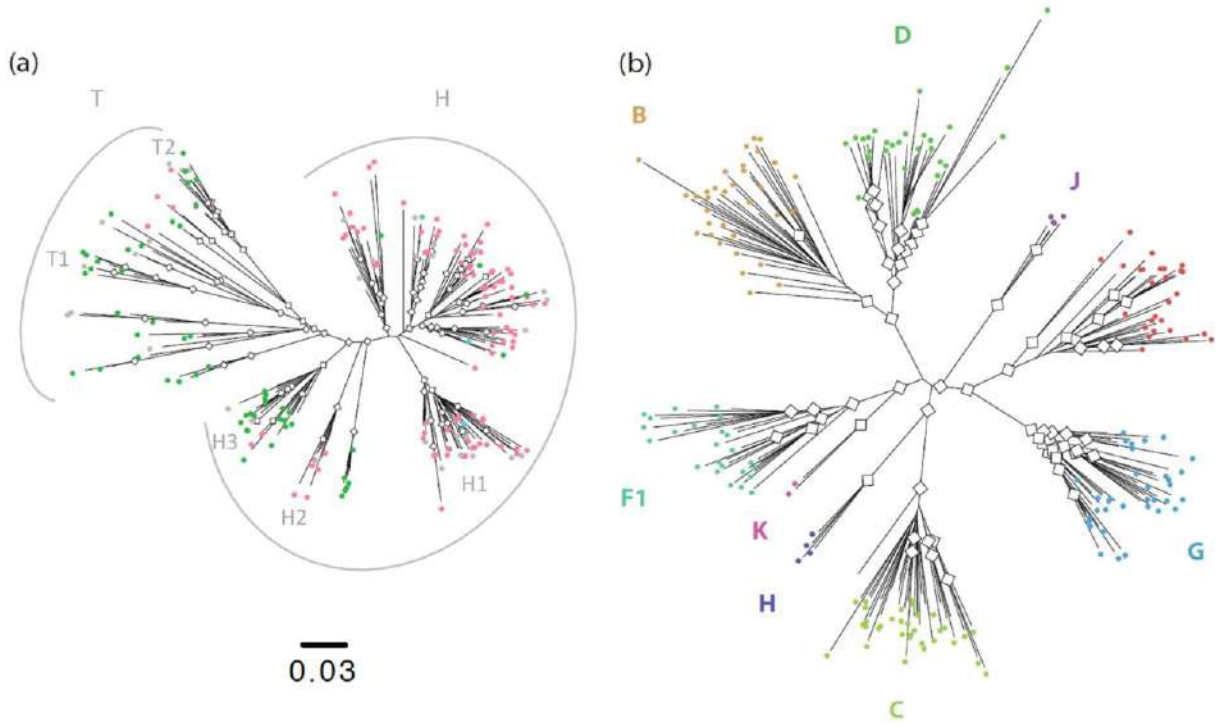


Figure 1. Arbres phylogénétiques comparatifs des séquences de VIH-1/O (a) et M (b).
190 séquences concaténées pour chaque groupe ont été analysées par la méthode du maximum de vraisemblance, les losanges blancs représentent des valeurs de bootstrap supérieures à 10. Les lettres indiquent la nature des sous-types identifiés dans le groupe M ainsi que les 2 sous-groupes et les clusters (H1,H2, H3, T1 et T2) au sein du groupe O. D'après Leoz *et al.* 2015 [27].

Un autre variant, l'isolat YBF30, a été découvert en 1998, chez un patient également camerounais, sur la base d'une discordance au diagnostic biologique : la positivité des tests de dépistage sérologique contrastait avec l'absence de réactivité sur les

tests sérologiques et moléculaires spécifiques du groupe M [28]. Du fait de sa divergence génétique par rapport aux groupes déjà décrits, la dénomination groupe N « New » ou « Non-M, non-O » a été proposée.

Le dernier groupe, P, a été décrit beaucoup plus récemment, suite à l'observation d'une discordance séro-moléculaire chez une patiente d'origine camerounaise [29] : alors que les tests de dépistage sérologiques et la quantification du génome viral (par des techniques commerciales non spécifiques de groupe) attestaient d'une infection par le VIH, l'amplification par des méthodes ciblant spécifiquement les groupes M et O était impossible. Le séquençage de l'ensemble du génome de la souche (RBF168) par l'utilisation d'amorces non spécifiques, a ensuite montré que celle-ci était génétiquement distante des virus des 3 autres groupes décrits jusqu'alors. Les analyses phylogénétiques réalisées par la suite, à partir d'une seconde souche 06CMU14788, collectée au Cameroun, ont permis de confirmer l'existence de ce nouveau groupe [30].

1.2. Les origines simiennes des VIH-1

Longtemps supposée, l'origine des différents VIH-1 est désormais confirmée au sein des chimpanzés et gorilles, infectés par des Virus de l'Immunodéficience Simienne (VIScpz et VISgor respectivement). Il existe deux lignées génétiques de VIScpz que sont les VIScpzPtt associés aux chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* d'Afrique centrale et les VIScpzPts, isolés de l'espèce *Pan troglodytes schweinfurthii* des chimpanzés de l'Est du continent africain [31,32]. Tous les VIH-1 actuels, de même que les VISgor, dérivent des VIScpzPtt, définissant dès lors l'espèce hôte comme le réservoir naturel de l'infection [33] (Figure 2). Les VIScpz [34,35] et les VISgor [36] auraient pénétré l'espèce humaine au décours de plusieurs évènements de transmissions inter-espèces indépendants [33,37], laissant émerger les 4 groupes actuellement décrits de VIH. De nombreuses occasions de contact étroit entre les primates non humains et l'Homme ont pu avoir lieu en Afrique, où les singes sont chassés pour leur viande, mais aussi couramment utilisés comme animaux de compagnie [37]. L'étude de ces virus s'est longtemps heurtée aux difficultés d'accès à ces animaux sauvages dans leur habitat naturel. La mise au point de techniques non invasives de prélèvements de fèces a permis de caractériser de très nombreux génomes de VIS, enrichissant les études phylogénétiques d'informations supplémentaires. En 2006, des études d'épidémiologie moléculaire sur les VIScpzPtt infectant les chimpanzés de

l'extrême sud-est et du centre du Cameroun ont ainsi permis d'identifier clairement les réservoirs des VIH-1 M et N [33].

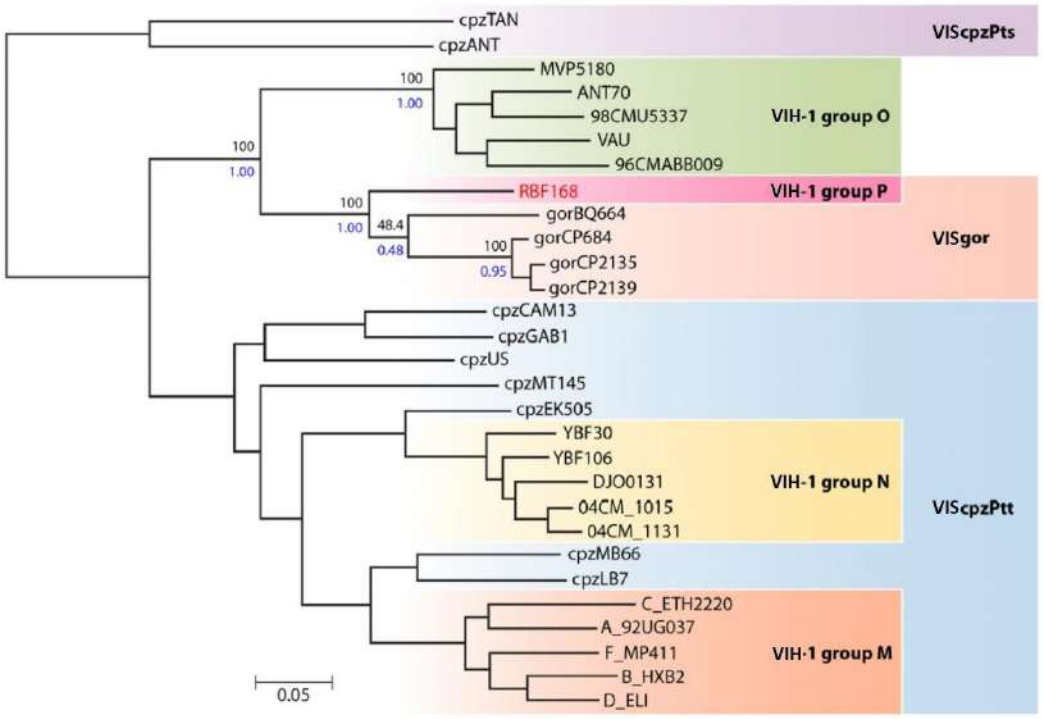


Figure 2. Relations phylogénétiques entre les différents groupes de VIH-1, VIScpz et VISgor.
D'après Mourez *et al.* 2013 [38]

Des analyses phylogénétiques de maximum de vraisemblance du génome de la souche prototype P, RBF168, et des séquences de VISgor disponibles à l'époque de sa découverte (N=4) [39] ont montré que celle-ci dérivait des VISgor [29]. L'échantillonnage de génomes de primates non humains, issus de gorille du Cameroun [36] a confirmé le lien phylogénétique et géographique direct des VISgor avec les 2 souches de groupe P [40]. La nature mosaïque du génome de virus simiens proche des VIH-1/O uniquement sur certaines portions de gènes, suggère, elle, une histoire ancienne de recombinaison sans définir un ancêtre direct pour ce groupe. Comme pour le groupe P, il est probable que le virus ancêtre du groupe O ait été transmis initialement du chimpanzé au gorille avant sa pénétration dans l'espèce humaine, résultant ainsi d'au moins deux occasions de franchissement de la barrière d'espèces [40].

1.3. Les origines de l'épidémie

Les plus anciennes traces de VIH-1-M « fossiles » ont été localisées en République Démocratique du Congo (RDC) sur des échantillons de datant de 1959 [41,42]. L'estimation des ancêtres communs les plus récents ou « *Most Recent Common Ancestors* » (MRCA) ont permis de dater l'émergence des différents groupes de VIH-1 dans l'espèce humaine. Alors que les MRCA des groupes M et O sont chevauchants, entre 1909 et 1930 [43] ; 1914 et 1944 [27] respectivement, le peu de séquences disponibles pour les groupes N et P, ne peut donner qu'une estimation grossière de la date d'origine de la diffusion dans l'espèce humaine. Ainsi, le MRCA des VIH-1/N est estimé entre 1948 et 1977 [44], alors que le VIH-1/P serait apparu dans les années 1980 [45].

Concernant la dynamique de diffusion de l'épidémie, il semblerait que différents phénomènes évolutifs aient eu lieu. Ainsi, les virus de groupe M ont connu une dynamique de diffusion continue jusqu'aux années 1960 [43], touchant les grandes métropoles de la partie Sud-Est de la RDC (Lubumbashi, Mbuji-Mayi) et de la République du Congo (Brazzaville). Puis, ce groupe aurait subi une seconde phase d'expansion sur un mode exponentiel, largement supérieure au niveau de croissance de la population locale à cette époque. Il est probable que l'intense trafic humain lié aux connections ferroviaires de ces villes ait été un élément essentiel, mais non suffisant à la diffusion du virus. D'autres facteurs, comme l'introduction du VIH-1/M dans des populations à haut risque de transmission par voie parentérale dans les années 1950 (personnes exposées à des injections non stériles pour le traitement de la syphilis), puis sexuelle en 1960 après l'indépendance de la RDC (apparition de travailleurs du sexe) auraient également contribué à la rapidité de l'évolution [46].

Par comparaison, le groupe O est resté largement confiné à l'ouest de l'Afrique centrale et particulièrement au Cameroun. Grâce à l'utilisation d'un important panel d'une centaine de séquences de VIH-1/O recouvrant des prélèvements sur 25 ans, Leoz *et al.* a montré une évolution de l'épidémie en 2 phases d'expansion, calquée sur des évènements historiques du pays [27] ayant conduit à la diversification en deux sous-groupes, H et T (Figure 3). Une première vague de diffusion intense entre 1940 et 1960, correspondant à l'urbanisation des grandes villes (Douala, Yaoundé) et aux périodes de campagnes vaccinales massives caractérisées par une forte iatrogénicité du virus de l'hépatite C, a plutôt été associée à la diversification des souches T. Les souches H sont plutôt concernées par la seconde phase d'expansion, plus longue et plus intense, celle-ci

s'est échelonnée entre 1970 et 1990, coïncidant avec la période d'introduction et de diffusion de la CRF02_AG, sous-type majoritaire des VIH-1/M dans ce pays (Figure 3).

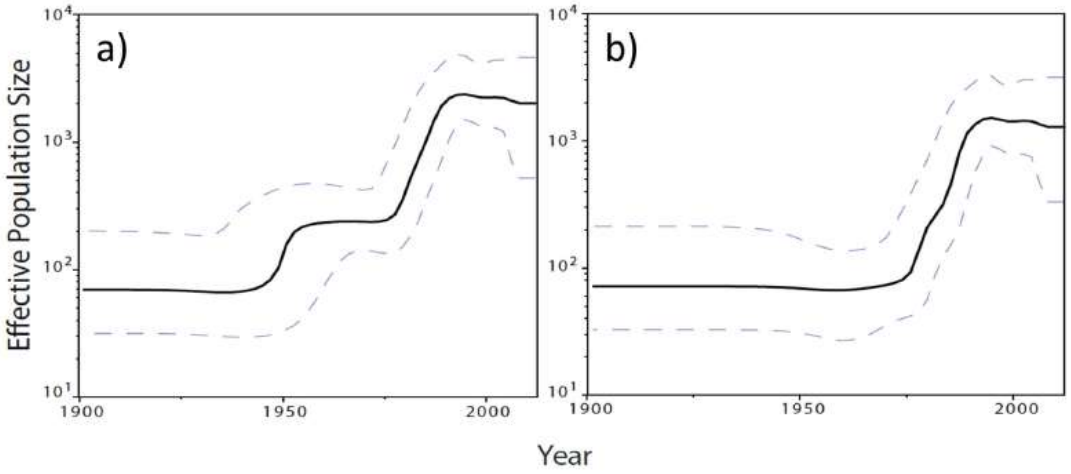


Figure 3. Dynamique de croissance des populations de VIH-1/O.

a) Représentation bayesienne en ligne d'horizon ou *Bayesian skyline plot* obtenue à partir de l'analyse de 154 séquences concaténées de VIH-1/O sur 3 régions du génome ; b) Représentation bayesienne issue de l'analyse d'un échantillon de 137 séquences précédentes incluant des souches H (N = 124) et T (N=13). La courbe continue représente l'estimation moyenne et les lignes pointillées, l'intervalle de confiance à 95%. D'après Leoz *et al.* 2015 [27]

L'importante différence de diffusion et de diversification entre les groupes M et O, soulève l'hypothèse d'opportunités épidémiologiques distinctes et/ou d'une moindre transmissibilité du groupe O, liée possiblement, à des divergences virologiques.

1.4. Epidémiologie actuelle

Bien que partageant une origine géographique commune, la répartition actuelle des VIH-1 est largement hétérogène : la diffusion mondiale majoritaire du groupe M contrastant avec une apparente restriction des infections à VIH-1 de groupe O, N et P au Cameroun et aux régions limitrophes.

1.4.1. Répartition mondiale des infections à VIH-1/M

Près de 52% de la population mondiale vit actuellement en zone urbaine, l'épidémiologie mondiale des infections à VIH prend donc un nouveau visage où les villes portent la majeure concentration des cas. Les 200 villes du monde les plus affectées représentent collectivement 26% des 36.7 millions [30.8 à 42.9 millions] de personnes vivant avec le VIH dans le monde en 2016, avec par ailleurs, de fortes inégalités par rapport à l'épidémie sur un même territoire [47,48]. Concernant la France, le nombre de découvertes de séropositivité VIH est de 208 par millions d'habitants en région Ile-de-

France, soit plus de 2 fois la moyenne nationale enregistrée à 89 par million d'habitants [49]. L'épidémiologie actuelle, associée à la diversité génétique du VIH, contribuent également à un nouveau schéma de diffusion globale [50]. Une méthode simple utilisant une approche basée sur les réseaux de communication internationaux et les séquences de polymérase du VIH des bases de données mondiales, a révélé plus de 211 liens de transmission putatifs du VIH-1 entre tous les pays du monde, et ce, malgré l'existence d'un biais de sous-représentation des souches d'Afrique sub-saharienne [50] (Figure 4).

Figure 4. Modèle de transmission globale mondiale du VIH-1.
Les pays en vert sont ceux pour lesquels des prélèvements ont contribué à l'étude, les pays en gris témoignent d'une absence de prélèvements. Les liens entre les pays manifestés par les lignes noires, prennent arbitrairement leur origine au centre des pays concernés. D'après Wertheim *et al.* 2014 [50]

1.4.2. Restriction géographique africaine des infections à VIH-1 non-M

Contrastant avec l'extraordinaire diffusion des VIH-1/M à toutes les régions du monde, la situation géographique des infections à VIH-1 non-M semble plus restrictive et liée à l'ouest de l'Afrique centrale, en particulier au Cameroun, berceau des transmissions inter-espèces des 4 groupes.

1.4.2.1. Le groupe P

Le groupe P a été découvert en France chez une patiente d'origine camerounaise âgée de 62 ans. La seconde souche a, quant à elle, été identifiée au Cameroun, chez un homme de 54 ans hospitalisé à l'hôpital Jamot de Yaoundé, en 2006 [30]. La prévalence de ce groupe au Cameroun semble extrêmement faible, estimée à 0.06 % en 2011 [30]. Des travaux de veille épidémiologique très récent ont confirmé cette tendance par un screening diagnostic sur 13 700 échantillons collectés entre 2011 et 2015, dans 22 villes et villages du Sud Cameroun. Malgré une estimation de la prévalence à 0.015 %, du fait

de deux réactivités sérologiques faisant évoquer un variant du groupe P, aucune de ces suspicions sérologiques, n'a été confirmée par les tests moléculaires appropriés [51].

1.4.2.2. Le groupe N

Parmi les 20 souches de VIH-1 de groupe N identifiées à ce jour [28,52-57], seul un cas d'infection a été décrit en dehors du Cameroun, plus précisément en France, chez un patient d'origine togolaise [58].

1.4.2.3. Le groupe O

Les études de prévalence des VIH-1 de groupe O montrent que ces variants sont endémiques au Cameroun, où ils représentent moins de 1% des infections à VIH-1 [51,59-61]. Des cas sporadiques ont également été rapportés dans d'autres pays d'Afrique proche de la zone d'endémicité. Seule une infection identifiée au Kenya fait exception [62].

Hors d'Afrique, des cas d'infection ont été décrits sporadiquement aux Etats-Unis [63,64], au Canada [65] et dans quelques pays d'Europe (Norvège [66,67], Belgique [16], Allemagne [17,67,68], Espagne et Grande-Bretagne [69-72]). C'est en France que le plus grand nombre de cas a été rapporté. La surveillance épidémiologique réalisée par le Centre National de Référence (CNR) du VIH, dans le cadre de la déclaration obligatoire des nouveaux cas d'infection à VIH, a recensé 40 (0.09%) patients infectés par un VIH-1/O entre 2003 et 2015, dont 71.4% étaient originaires du Cameroun [73]. La tendance épidémiologique de ces variants est à la diminution, mais de façon non significative. Aussi, la surveillance de la diffusion des variants non-M par le CNR, a permis de recenser 135 cas de mono-infections depuis le premier cas décrit en 1992 [74].

2. Cycle de réplication du VIH et mécanismes générant la diversité génétique

2.1. Description moléculaire du VIH-1 et de son cycle de réplication

Appartenant à la famille des Retroviridae, sous-famille des Orthoretrovirinae, le VIH est un lentivirus humain caractérisé par un fort taux de réplication et un renouvellement rapide.

La particule infectieuse est un virus enveloppé de 80 à 120 nm de diamètre. Abrité par une capside conique, son génome est constitué d'un ARN diploïde de 9,2 kb, flanqué à chaque extrémité par des séquences non codantes répétées que sont les *Long Terminal Repeat* (LTR) [75]. Il comprend trois gènes majeurs (*gag*, *pol*, et *env*) codant pour les

protéines de structure et 6 gènes de régulation dits « accessoires » (*vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev*, *nef*) transcrits par 3 cadres de lecture ouverts (Figure 5).

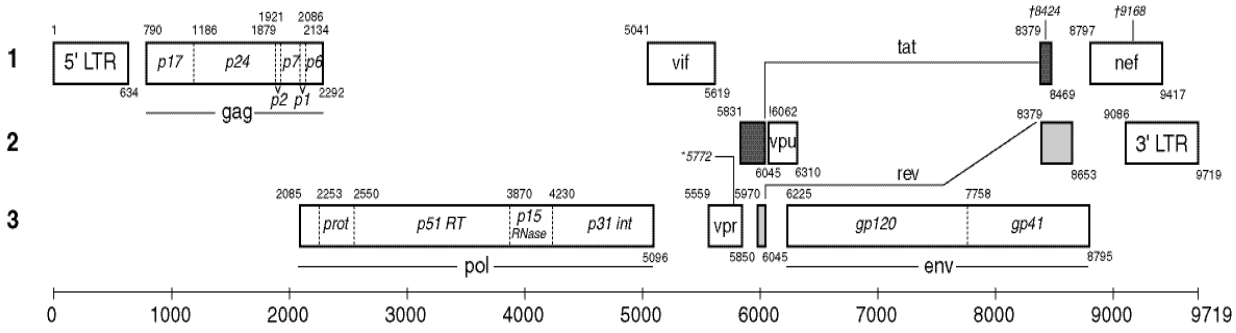


Figure 5. Schéma d'organisation du génome du VIH-1.
L'échelle correspond au nombre de bases nucléotidiques et les chiffres en gras aux 3 cadres de lecture
Tiré de https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/IMAGES/hxb2genome.gif (Page consultée le 29/12/2017)

2.1.1. Les protéines de structure

2.1.1.1. Le gène env et l'étape d'entrée

Le gène *env* code pour une polyprotéine-précurseure trimérique, la **gp160**, clivée par une protéase cellulaire en deux glycoprotéines d'enveloppe : gp120 et gp41.

La **gp120** (120 kDa) est formée d'environ 500 acides aminés répartis en 5 régions conservées (C1 à C5) et variables (V1 à V5).

La **gp41** est une glycoprotéine transmembranaire de 41 kDa s'associant de façon non covalente à la gp120 externe pour assurer l'ancrage membranaire du virus à la cellule hôte. De structure trimérique, son unité fonctionnelle est composée de 3 domaines : un ectodomaine extracellulaire (HR2), une région transmembranaire centrale (HR1) et une queue cytoplasmique. Sa conformation en faisceau de 6 hélices, est destinée à rapprocher les membranes cellulaires et virales pour permettre leur fusion et la libération intracytoplasmique du contenu viral.

Lors de l'étape de pénétration du virus dans la cellule cible, les domaines conservés de la gp120 assurent la liaison à un récepteur CD4 cellulaire, tandis que les domaines variables V1 à V5, en particulier V3, forment une boucle qui porte la liaison à un corécepteur de type chimiokines CC (CCR5) ou CXC (CXCR4) en surface de la cellule cible [76-78]. Ces corécepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G et sont impliqués dans de nombreuses autres pathologies

(affections neurologiques, maladies inflammatoires chroniques, cancers…) outre l'infection liée au VIH [79]. Les changements de composition protéique au niveau de la boucle V3, entrainent une évolution de l'utilisation de l'un, l'autre ou des deux corécepteurs. Il en résulte un tropisme de type R5 pour les souches utilisant le corécepteur CCR5, ou X4 pour celles ayant recours à l'utilisation du CXCR4, ou encore dual/mixte R5/X4 pour les virus nécessitant l'action conjointe des 2 corécepteurs, le tropisme viral étant un phénomène dynamique au cours de l'infection. Ainsi, la liaison de forte affinité de la gp120 au CD4 cellulaire conduit à un changement conformationnel qui permet l'exposition de la boucle V3. Celle-ci interagit ensuite avec le corécepteur. L'attachement simultané aux récepteur et corécepteur, engendre une modification de structure de la gp41, qui libère un peptide de fusion. Ce dernier peut alors s'insérer dans la membrane plasmique et opérer une fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire. Il s'ensuit la libération du contenu viral dans le compartiment intra-cytoplasmique cellulaire [80] (Figure 6).

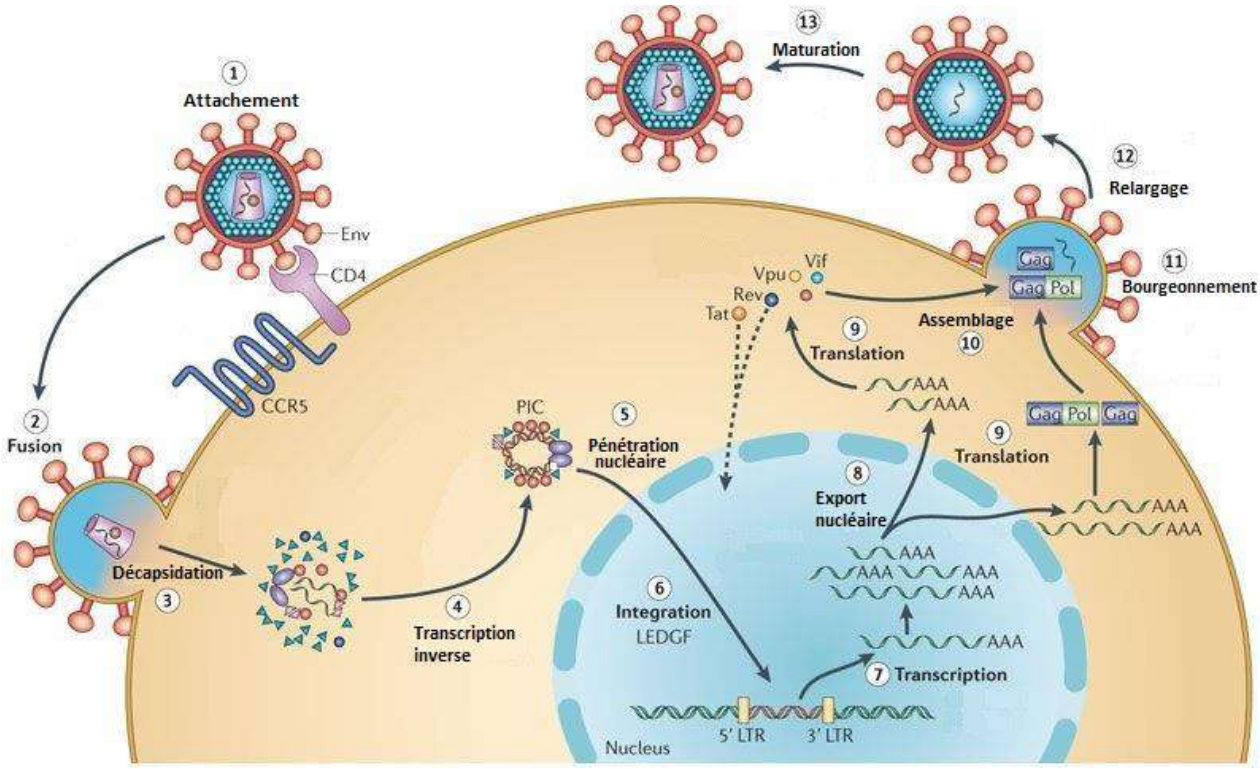


Figure 6. Cycle de réplication du VIH.
Adapté d'Engelman *et al.* 2012 **[81]**

2.1.1.2. Le gène pol et les étapes précoces du cylce de réplication virale

Le gène *pol* code pour une protéine de fusion Pr160gag/pol, dont le clivage aboutit aux trois enzymes majeures du cycle de réplication viral : la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase.

La **protéase** ou p11 (PR) est un homodimère de 99 acides aminés qui appartient à la famille des protéases aspartiques [82]. Le site actif de cette enzyme est constitué de plusieurs feuillets beta et d'une hélice alpha. La flexibilité engendrée par les feuillets beta de chaque monomère forme 2 rabats, restreignant ainsi l'accessibilité du site actif. A l'état libre, les rabats de l'enzyme sont en position ouverte [83], mais la présence du ligand sur le site actif, induit une conformation en position semi-fermée [84]. Le rôle de la protéase est d'induire le clivage des précurseurs protéiques Gag et Gag/Pol, mais aussi de certaines protéines cellulaires pour favoriser la mort cellulaire par apoptose et nécrose [85], contribuant *in fine*, à la déplétion en cellules CD4. Enfin, elle contribue à l'assemblage des protéines clivées et à la maturation de la particule infectieuse.

La **transcriptase inverse** (TI) ou « *reverse transcriptase* » est un hétérodimère p51/66 possédant deux activités essentielles à l'établissement d'un ADN double linéaire à partir de l'ARN viral : ADN polymérase ADN-ARN dépendante et RNase H [86]. Les premières études cristallographiques de l'enzyme ont décrit une structure en 4 domaines schématisant une main : doigts, paume, pouce et connexion [87,88] (Figure 7).

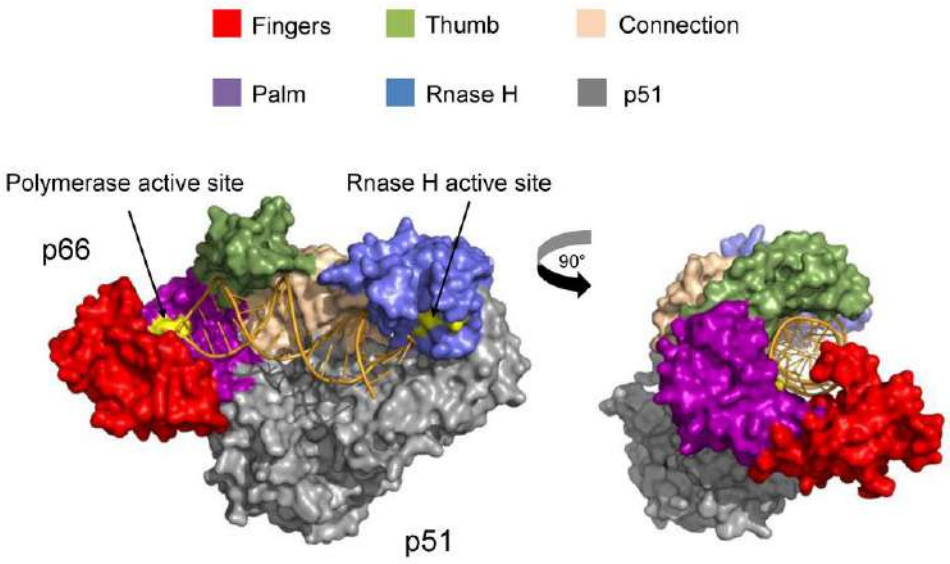


Figure 7. Représentation schématique de la TI du VIH-1.
D'après Schauer *et al.* [89]

L'**intégrase** ou p32 (IN), comprend 288 acides aminés et 3 domaines indépendants [90]:

- le domaine N-terminal constitué d'environ 50 acides aminés ; il est organisé en 3 hélices alpha qui permettent la liaison à un motif Zinc au niveau du motif conservé « HHCC » comprenant 2 résidus histidine et 2 résidus cystéine [91] ;
- le core catalytique central est un domaine hautement conservé, site clé de l'activité enzymatique. Classé au sein de la superfamille RNase H des polynucléotides transférases, il contient le motif « DDE » fait de 3 acides aminés acidiques : Asp64 et Asp116, Glu152, tous deux espacés par une région conservée de 35 acides aminés [92]. Ce domaine protéique permet l'établissement de ponts de coordination, via la liaison à 2 ions métalliques divalents Mn^{2+}, catalysant le processus d'intégration [93,94] ;
- le domaine C-terminal est la structure dimérique la moins conservée au sein des intégrases de Retrovirus [95,96]. L'acétylation post-traductionnelle de 4 lysines de ce domaine régule l'ensemble des étapes d'intégration et induit également un déclin de la réplication du virus [97].

Ces trois enzymes sont impliquées dans les étapes précoces du cycle de réplication ainsi que dans certaines étapes tardives pour la protéase. En pratique, suite à son entrée dans la cellule, le virus subit une décapsidation qui libère son génome. L'ARN linéaire monocaténaire viral est alors retro-transcrit en un ADN double brin par l'action de la TI. La liaison de l'acide nucléique cible, au niveau du site actif enzymatique, induit le changement en configuration « ouverte » du pouce de la TI. L'incorporation d'un nucléotide forme un complexe tertiaire qui induit la fermeture directe des doigts de l'enzyme sur le nucléotide nouvellement introduit. S'ensuit la formation d'une liaison phosphodiester entre le nucléotide incorporé et la séquence cible, générant le relargage d'un pyrophosphate par ouverture des doigts. La libération du site de liaison des nucléotides, permise par translocation de l'enzyme, entretient la poursuite de la synthèse d'ADN. Plusieurs résidus protéiques en position 65, 115 et 151 (K65, Y115 et Q151) ont un intérêt dans la formation du site de liaison au nucléotide, comme le motif YXDD, motif conservée de la TI, qui lorsqu'il est muté, induit la suppression de l'activité enzymatique et diminue l'infectiosité du virus [98]. L'activité RNase H de l'enzyme permet de cliver la matrice ARN, lors de la formation du complexe hétérodimérique ADN/ARN et uniquement à cette étape. Ce clivage a également pour objectif de définir les terminaisons ADN, supports de l'intégration secondaire [99]. L'ADN généré forme par la suite un complexe de pré-intégration (PIC) avec l'intégrase, les protéines de

capside et certaines protéines cellulaires, capable d'atteindre le noyau de la cellule infectée (Figure 6). L'intégrase catalyse ensuite spécifiquement le clivage des extrémités de l'ADN proviral, puis de l'ADN cellulaire en une première étape de terminaison en 3'ou « *3'end processing* » exposant alors des terminaisons CAOH-3'. La seconde étape de transfert de brin d'ADN ou « *DNA strand transfer* » permet une liaison entre le groupement hydroxyl libre de l'ADN viral et les groupements phosphodiesters de l'ADN cellulaire. Il en résulte un intermédiaire d'intégration où l'extrémité 3' de l'ADN viral est liée de manière covalente à l'ADN cible. Des enzymes cellulaires interviennent alors pour finaliser la ligation de l'extrémité 5' de l'ADN viral [100].

L'étape d'intégration dans le génome humain ne semble pas être un phénomène aléatoire [101], mais plutôt influencés par 3 facteurs majeurs : i) la spécificité de la séquence contenant des gènes actifs sur le plan transcriptionnel [102] ; ii) la structure décondensée de la chromatine au niveau de points chauds locaux [103] ; iii) de nombreux facteurs d'attachement à la chromatine, dont le facteur de croissance LEDGF/p75 [104,105]. Contrairement à la transcription génomique active, observée lors d'une infection productive, le génome intégré n'est pas soumis à une transcription continue dans les cellules latentes, mais permet l'établissement d'un réservoir viral, obstacle majeur des stratégies curatives [106].

2.1.1.3. Le gène gag et les étapes tardives

Le gène *gag* code pour une polyprotéine de 55 kDa comprenant 4 domaines distincts, ayant chacun un rôle dans l'assemblage d'une capside immature, puis le relargage de virions immatures dans le milieu extracellulaire: la matrice (p17) intervient dans le ciblage de la membrane plasmique, la capside (p24) permet des interactions critiques de type Gag-Gag, la nucléocapside (p7) contribue à l'empaquetage de l'ARN viral génomique, et le domaine p6 participe au bourgeonnement en surface de la membrane plasmique [107,108].

Un petit nombre de protéines **Gag** créent des dimères avec l'ARN génomique au niveau de la membrane cellulaire. Médié par des interactions Gag-Gag, le recrutement d'autres protéines contribue à la densification protéique aux abords membranaires. Ce phénomène est facilité par des protéines de la famille ESCRT (*Endosomal sorting complex required for transport*) [109]. La protéine de fusion Gag/Pol est également intégrée. L'oligomérisation des protéines initie alors la phase de bourgeonnement tout en créant l'assemblage des monomères de capside. Pas moins de 2 400 monomères et 120 protéines de fusion sont contenus dans un virion immature [109,110]. La maturation

finale du virion, initiée par une série de clivages protéiques catalysés par la protéase virale, aboutit aussi à la condensation de la nucléocapside, la finalisation de la structure en coquillage de la capside, parallèlement à l'empaquetage des enzymes et du génome viral.

2.1.2. Les protéines accessoires

Les protéines accessoires ont un rôle de régulation du cycle de réplication virale et de maintien de l'infection et de la pathogénicité. Elles agissent directement pour contrecarrer l'action de certains facteurs de restrictions humains.

Les protéines **Tat** *(transactivator)* et **Rev** *(regulator of viral expression)* ont des fonctions régulatrices du cycle, notamment face à la réaction immunitaire de l'hôte.

Les protéines **Vif, Vpr, Vpu** et **Nef** ont, elles, un rôle important dans l'établissement de l'infection, et semblent induire une action d'adaptation moléculaire du virus pour détourner les mécanismes de défenses de la cellule hôte, tels les facteurs de restriction [111].

Les virus délétés pour le gène *vif* (*viral infectivity factor*) ne sont plus capables de se répliquer dans des cellules primaires, du fait de l'action de la protéine humaine APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G*) notamment [112]. Celle-ci appartient à la famille des cytidine déaminases. Une fois synthétisée, la protéine Vif forme un complexe avec APOBEC3G, qui associée à une ubiquitine, sera adressé pour dégradation au protéasome [113].

Vpr (*viral protein R*) est exprimée tardivement dans le cycle de réplication du virus. La protéine Vpx (viral protein X), exprimée spécifiquement par les VIH-2, présente une homologie de séquence avec Vpr [114]. Elle semble intervenir dans la pathogénicité du virus [115].

Vpu (*viral protein U*) est spécifique des VIH-1. Cette protéine réduit l'expression du CD4 en surface cellulaire. Elle permet également le relargage des virions néo-formés, action contrecarrée par le facteur de restriction BST-2 (*B cell stromal factor*) ou CD317 ou « tetherin ». La protéine CAML (*calcium modulating cyclophilin ligand*), protéine impliquée dans la différenciation des cellules T, est aussi identifiée comme une autre cible de l'action de Vpu [116].

Nef (*negative regulatory factor*) a une action déterminante dans le niveau de pathogénicité du virus. Elle facilite également l'infectivité en favorisant la pénétration du

core viral dans la cellule hôte et le bourgeonnement des virions à la surface cellulaire [117].

2.2. Mécanismes moléculaires générant la diversité génétique

Le génome singulier des VIH, constitué de 2 copies d'ARN non liées, facilite la diversification virale de par sa relative plasticité. Cette diversification est le résultat des mécanismes conjoints de génération de mutations et de recombinaison rétrovirale. De nombreux facteurs liés à l'environnement exercé par l'hôte, mais également au virus lui-même peuvent influencer ou induire l'un ou l'autre de ces mécanismes au fil du temps.

2.2.1. La faible fidélité de la transcriptase inverse

A l'origine de toute variabilité génétique, le processus de mutation est un phénomène stochastique susceptible de se manifester tout au long du génome. L'absence d'activité éditrice de la TI du VIH, associée à une intense dynamique de réplication (de l'ordre de 10^{10} virions par jour) [118], génère naturellement un taux de mutations élevé. Avec un taux estimé à $1.4x10^{-5}$ mutations par base et par cycle, les transitions semblent 10 fois plus fréquentes que les transversions, énergétiquement plus coûteuses [119,120]. Il en résulte la génération d'une population virale complexe chez l'individu infecté, faite de souches hétérogènes mais relativement proches sur le plan phylogénétique que l'on qualifie de « quasi-espèces » [121]. De nombreux facteurs, de nature exogène ou non, peuvent changer le taux de mutations et contribuer à rendre la composition de cette population fluctuante au cours du temps [122]. Plusieurs équipes ont en effet montré que le polymorphisme de la TI, qu'il soit naturel ou induit par un traitement antirétroviral, influençait directement le taux d'erreurs introduites [123-125]. Il a aussi été mis en évidence un phénomène d'hypermutation généré par des désaminases de la famille APOBEC. L'activité de la protéine APOBEC3G, sous le contrôle de la protéine virale Vif, conduit à l'accumulation de mutations d'une cytosine en uracile (C→U) lors de la transcription inverse [112].

Ces mécanismes, associés à la pression de sélection naturelle de l'hôte, génèrent ainsi au cours du temps une importante diversité de variants, tous issus d'une même souche, mais avec une dynamique d'évolution génétique propre, perpétuelle et indépendante.

2.2.2. La recombinaison virale

La synthèse de l'ADN proviral se produit à partir des 2 molécules d'ARN génomique empaquetées dans la même capside, l'une et l'autre pouvant servir alternativement de brin matrice lors de la transcription inverse par l'effet de sauts de matrice. Trois modèles, non exclusifs mutuellement, ont été proposés pour illustrer et expliquer l'effet du saut de matrice sur la recombinaison rétrovirale :

- le « modèle du choix de la copie forcé » repose sur l'hypothèse que les ARN génomiques sont fréquemment fragmentés. Ainsi le saut de la TI est imposé du fait de coupures naturelles sur la matrice [126] ;
- le « modèle du choix de la copie» se produit en l'absence de brèche sur les molécules d'ARN [127] ;
- le « modèle du choix de la copie dynamique » détermine le niveau de recombinaison en fonction de l'état d'équilibre entre deux activités de la TI : le taux de polymérisation de l'ADN et le niveau de l'activité RNAse H [128].

La recombinaison peut avoir lieu chez l'hôte entre des virus identiques, relativement proches, voire divergents. L'impact de la recombinaison sur le potentiel évolutif viral est donc lié au degré de divergence entre les souches parentales, mais surtout à l'avantage sélectif procuré par la souche recombinante par rapport à son environnement [129].

En somme, ces mécanismes moléculaires ont un impact à la fois sur la production de quasi-espèces virales, générant une diversité génétique à l'échelle individuelle du patient, mais aussi et plus largement, à l'échelle de la population infectée en générant des variants (sous-types, CRF) dont l'introduction dans un environnement propice à leur adaptation, facilite leur émergence et leur évolution.

3. Conséquences viro-cliniques de la diversité génétique des VIH-1/non-M

3.1. Histoire naturelle

Les données d'évolution de l'infection sont désormais largement décrite pour les VIH-1/M. Il a été ainsi montré que l'efficacité de la contamination par le VIH lors d'un évènement de transmission sexuel, sanguin ou entre la mère et l'enfant (vertical ou

périnatal), était liée à la quantité de virus transmise [130,131]. Ainsi, plus la charge virale présente dans l'inoculum est élevée, plus l'infection a une chance d'aboutir.

Dans les 2 premières semaines qui suivent la contamination, on observe une sélection du virus le mieux adapté à l'environnement de l'hôte [132]. La virémie est indétectable, il n'y a pas de symptôme de l'infection, ni de manifestation immunologique, mais le virus diffuse aux tissus et organes qui seront les sites de sa future réplication. En 2 à 4 semaines, une fois cet entonnoir sélectif passé, la population virale infectante va se multiplier dramatiquement et produire une charge virale plasmatique (CVp) pouvant atteindre plus d'un million de copies d'ARN/mL (Figure 8). Cliniquement, cette phase d'infection aiguë, ou primo-infection, peut se manifester par des symptômes généraux (fièvre, asthénie profonde, état grippal, diarrhées) pouvant faire évoquer un syndrome mononucléosique. La réponse immunitaire se constitue par voie humorale avec la sécrétion d'anticorps dirigés contre toutes les protéines virales, et par voie cellulaire avec une réponse des lymphocytes T portant le marqueur CD8. L'activation de très nombreuses cellules cibles T CD4, parallèlement à une réplication intense, favorise l'entretien de l'infection. A quelques semaines de la primo-infection, on observe alors une brusque diminution de la charge virale pour se maintenir à un taux stable, et un déclin des lymphocytes T CD4 circulants. L'individu infecté entre dans une phase de latence clinique (mais pas biologique) qui peut perdurer une dizaine d'années. Cette période reflète le fragile équilibre qui s'installe entre le maintien de la réplication virale et la réponse immunitaire cellulaire spécifique notamment, via les lymphocytes T cytotoxiques qui déclinent graduellement. Graduellement, le niveau de déplétion cellulaire est tel, que le contrôle immunitaire global n'est plus maintenu et un taux de CD4 <200 mm^3 définit le stade SIDA. Il en résulte une ré-ascension de la CVp et l'apparition de manifestations cliniques liées à des pathogènes opportunistes s'achevant, en l'absence de traitement, au décès du patient.

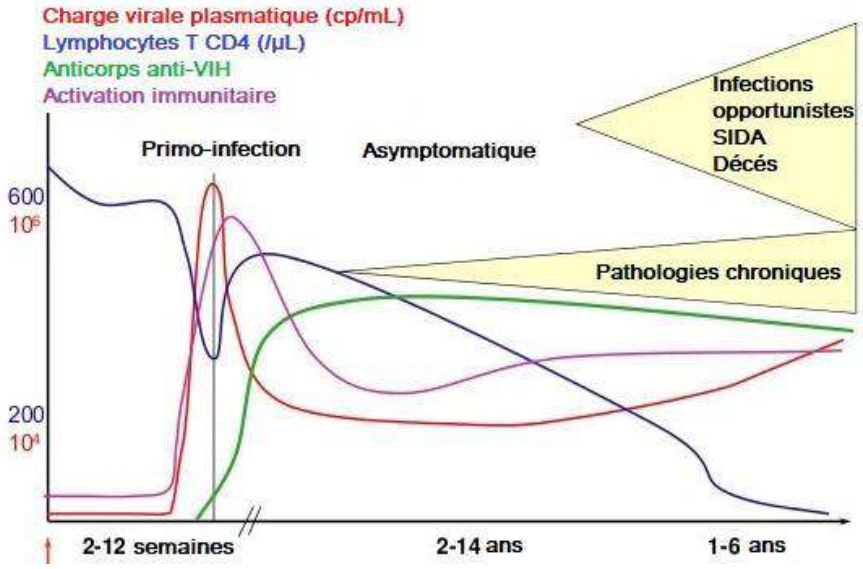


Figure 8. Histoire naturelle de l'infection par le VIH-1.

Cinétique de la charge virale (ligne rouge), du taux de cellules CD4+ (ligne bleue), des anticorps anti-VIH (ligne verte) et du niveau d'activation immunitaire à partir de la contamination (flèche rouge), et manifestations cliniques associées (encadré jaune). Adapté de Maartens *et al.* 2014 [133]

S'agissant des VIH-1 non-M, les données d'évolution naturelle de l'infection sont éparses, d'autant qu'elles concernent un nombre restreint de patients. Ainsi, seule la patiente RBF168 est source d'information pour le groupe P, puisque la seconde souche représentative de ce groupe, 06CMU14788, a été identifiée à partir d'un échantillon de collection [30]. Jusqu'alors, les données publiées ont permis de montrer qu'en 5 ans d'absence de traitement, la CVp atteignait en moyenne 4.5 Log copies/mL (HIV-1 Real*Time*, Abbott®, Des Plaines, Illinois, USA) avec un taux moyen de 326 CD4 mm^{-3} [29]. Par ailleurs, aucune manifestation clinique relative à un stade SIDA n'avait été mise en évidence lors du dépistage et du suivi clinique de la patiente.

Les données d'évolution naturelle de l'infection à VIH-1/N, certes peu nombreuses, font évoquer un potentiel de pathogénie au moins aussi important que pour les VIH-1/M. En effet, la plupart des cas d'infection pour lesquels des données cliniques sont disponibles, montrent une majorité de patients en stade SIDA au moment du diagnostic [28,55,56], comme l'illustre parfaitement le premier cas décrit, avec un tableau inaugural d'histoplasmose intestinale évoluant fatalement 7 mois plus tard [28]. L'unique cas de primo-infection à VIH-1/N a également rapporté une symptomatologie d'emblée sévère, faite d'une paralysie faciale. La quantification virale plasmatique, établie dans la

littérature à 4 Log cp/mL en moyenne, en l'absence de traitement, mérite cependant d'être interprétée avec précautions du fait d'un défaut probable de certaines techniques commerciales [58]. En corrélation avec les observations cliniques, le taux de CD4 était généralement bas [28,57,58]. Par ailleurs, des cas de transmission horizontale et verticale ont été rapportés [55,56].

De manière semblable, les premières souches de VIH-1 de groupe O ont toutes été isolées à partir d'échantillon de patients (notamment des couples) en stade SIDA en l'absence de traitement antirétroviral [17,18,134]. Les premières observations de cas montraient une cinétique de décroissance de 500 CD4 mm^{-3} à 200 ou <100 CD4 mm^{-3} [135], et de 290 à 144 CD4 mm^{-3} [22] sur 7 ans et 19 mois de suivi respectivement voir années de suivi [20,22,135]. Enfin, une dernière étude rapportait d'une patiente camerounaise présentant un déclin du taux de CD4 (de 576 à 400 CD4 mm^{-3}) jusqu'à 6 ans après le diagnostic initial [136]. Le point unique de charge virale à 2 682 cp/mL (HIV-1 Real*Time*, Abbott®), ne permettait cependant pas d'interpréter les données virologiques liées à l'histoire naturelle du virus. Des cas de transmission mère-enfant ont également été rapportés [137,138] montrant que les nourrissons infectés présentent d'emblée des signes cliniques liés à une immunodépression franche avec un taux de CD4 inférieur à 400/mm^3, dont des pneumopathies interstitielles lymphoïdes [137] et des encéphalopathies [138].

3.2. Diagnostic et suivi virologique

3.2.1. Performances des outils de diagnostic sérologique

Longtemps pris à défaut par la diversité virale, les tests sérologiques commerciaux actuels de type immuno-enzymatique ou *enzymo-immuno assay* (EIA) ont subi de nettes avancées en terme de sensibilité sur les souches de VIH hautement divergentes telles que les VIH-1 non-M [139-142]. Alors que des échantillons de sérums des patients infectés par les souches de groupe N et P ont montré une réactivité sur de nombreux tests commerciaux [29,54,58], il persiste toutefois une hétérogénéité de sensibilité analytique, notamment avec les VIH-1/O : une étude sur la sensibilité de 9 tests rapides d'orientation diagnostic ou autotests, a révélé que 6 tests présentaient une sensibilité inférieure à 80% sur les échantillons de groupe O [143]. La même observation a été faite sur d'autres tests de 4ème génération, avec une intensité de signal parfois un peu plus basse pour les échantillons de groupe O [144]. L'étude de Ly *et al.* visant à comparer la sensibilité de 10

tests sérologiques commerciaux sur leur capacité à détecter la fraction antigénique p24 de divers génotypes viraux a montré que 3 et 6 des tests étaient en défaut sur la p24 pour les échantillons de VIH-1/O et P respectivement [145].

Parallèlement, les profils de réactivités anticorps obtenus par le test de confirmation Western-Blot sont très différents en fonction des variants mais non discriminants: les réactivités complètes des VIH-1 de groupe N comme de groupe P n'offrent pas de distinction particulière par rapport au profil observé pour les virus de groupe M. Les virus de groupe O semblent présenter une faible réactivité sur les glycoprotéines d'enveloppe, surtout gp120 et gp41 [38,70] (Figure 9).

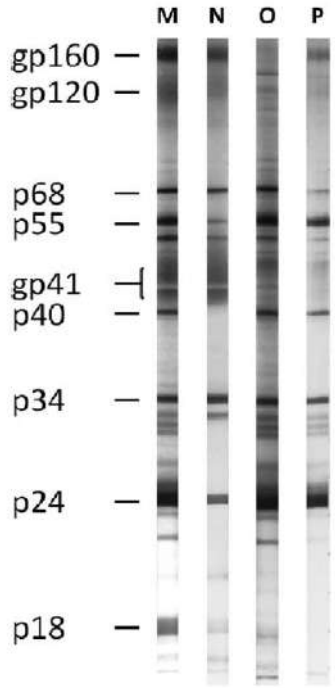


Figure 9. Profil comparatif des réactivités des différents groupes de VIH-1 au Western-Blot
Sérums de patients infectés par un VIH-1 de groupe M, O et P obtenus hors primo-infection, et N en stade SIDA (profil incomplet du fait de la perte de réactivité de certains anticorps). Gp : glycoprotéine, p : protéine, le chiffre mentionnait indique le poids moléculaire de la protéine en kDa. D'après Mourez *et al.* 2013 [143]

Aucun test sérologique commercial ne permet une distinction entre les variants non-M. C'est pourquoi des outils spécifiques d'étude de la diversité virale ont été mis au point à la fin des années 90, permettant de discriminer les VIH de type 1, 2 et certains SIV par un test sérologique unique [146,147]. Le CNR du VIH utilise ainsi un test de sérotypage de type immuno-enzymatique, basé sur l'utilisation de peptides synthétiques représentatifs de la diversité virale des VIS et VIH, ciblant la gp41 comme peptide de détection, et la boucle V3 de la gp120 comme peptide de discrimination/différenciation.

Ce test EIA spécifique de type et de groupes, présente l'avantage d'être modulable selon la réactivité virale recherchée et permet un screening rapide et large des variants. Les résultats de sérotypage donnent une orientation diagnostique, mais seuls les outils moléculaires permettent de donner un résultat formel de génotypage.

3.2.2. Performances des outils de suivi moléculaire

L'essor des techniques de biologie moléculaire à la fin des années 1990, a permis de grandes avancées technologiques dans le diagnostic et le suivi des infections à VIH. Ainsi plusieurs stratégies de quantification ont généré le développement de nombreuses trousses commerciales. Parmi celles-ci on peut citer : la PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR), l'amplification par ADN branché (*branched DNA*, bDNA), l'amplification des acides nucléiques en temps réel (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*, NASBA) et l'amplification médiée par la transcription (*Transcription Mediated Amplification*, TMA). Le défi de la diversité a montré les limites des premières techniques commerciales du début des années 2000, et seul la trousse LCX HIV-1 RNA quantitative assay (Abbott®) permettait de quantifier de façon fiable les VIH-1/O [148,149]. Dans un souci constant d'amélioration, les firmes industrielles ont fait évolué leurs trousses pour commercialiser des outils intégrant désormais la détection et la quantification de VIH-1 non-M, en témoignent les trousses les plus récentes : Cobas ampliprep/Taqman HIV-1 V2 (Roche®) et Cobas HIV-1 pour système 4800 Roche®, Xpert HIV-1 viral load (Cepheid®), quantifiant les virus des groupes O, N et P, en plus des divers sous-types du VIH-1/M [150].

A l'heure actuelle, la découverte de variants divergents intervient donc tardivement dans la cascade d'examens virologiques de prise en charge de l'infection à VIH : l'hypothèse d'une infection à VIH-1 non-M n'est envisagée que devant l'échec d'amplification pour génotypage et séquençage de résistance d'un échantillon de charge virale VIH-1 positive, par l'utilisation d'amorces spécifiques du groupe M. En conséquence, toute discordance séro-moléculaire dans l'algorithme de prise en charge des infections à VIH devrait imposer la recherche approfondie d'un variant divergent par des techniques appropriées.

La démarche inverse de quantification spécifique des variants divergents, a permis la mise au point d'outils dédiés au suivi des infections à VIH-1 de groupe O, notamment. La première RT-PCR quantitative, élaborée par le laboratoire de virologie de Rouen, associé au CNR du VIH, ciblait la région conservée des LTR [151]. Abandonnée du fait

de son manque de sensibilité (limite de quantification à 200 cp/mL), une seconde RT-PCR ciblant la région de l'intégrase a montré des performances bien supérieures avec une spécificité élevée et un seuil de 40 cp/mL comme limite basse de quantification [152]. Ces outils ne sont toutefois pas accessibles en routine diagnostique et restent l'apanage de centres spécialisés.

3.3. Propriétés virologiques

L'impact de la diversité génétique sur les caractéristiques virales est bien connu et décrit à l'échelle des quasi-espèces. Toutefois, les conséquences de la forte divergence des variants non-M sur les propriétés intrinsèques du virus soulèvent encore de nombreuses questions.

3.3.1. Le tropisme viral

Tout comme la progression de l'infection induit une évolution naturelle du tropisme R5 en phase initiale vers un phénotype X4 en phase tardive, corrélé à une évolution rapide en stade SIDA [153], la diversité génétique a, de façon générale, un retentissement direct sur l'utilisation des co-récepteurs et le tropisme cellulaire. La principale cause de ce phénomène est l'importante variabilité génétique inter-souches de la boucle V3, région associée à la détermination du tropisme viral [154,155].

Alors que le tropisme des VIH-1/N et P n'a jamais été étudié, on trouve dans la littérature, quelques données sur l'usage des corécepteurs CCR5 et CXCR4 par les VIH-1/O. Une étude récente a ainsi montré l'utilisation majoritaire du CCR5 (83%) et confirmé l'incapacité des outils génotypiques à prédire correctement le tropisme de ces variants [156]. L'utilisation du corécepteur CXCR4 seul n'a pas été observée sur ce panel de 18 isolats cliniques, bien que déjà démontrée précédemment sur quelques souches [157] ; mais 17% des virus présentaient un tropisme dual/mixte. Les isolats cliniques de tropisme R5 sont incapables de réplication dans un système exprimant la délétion Delta32 (cellules défectives en CCR5) [158], ce qui suggère que les VIH-1/O n'aient pas recours à d'autres types de co-récepteurs. Initialement observée sur 2 souches (MVP5189 et CA9), cette hypothèse a été confirmée à plus large échelle (N=12) [159].

3.3.2. Le fitness viral et l'adaptation à l'hôte

On entend au sens de « fitness viral », la capacité réplicative d'un VIH-1 dans un environnement donné tel que défini par Domingo et Holland [160]. Le fitness semble impacté par la diversité virale, notamment lors de l'apparition de populations virales portant des mutations de résistance aux antirétroviraux [161,162]. Toutefois, le fitness viral des variants divergents est une problématique complexe où intervient la diversité génétique. Des essais de compétition en culture cellulaire ont montré que les souches de VIH-1/M présentaient un meilleur fitness que les VIH-2 et surtout que les VIH-1/O, 100 fois moins performants que le variant pandémique [163]. Pour autant, les VIH-1/O porteurs naturellement de mutations de résistance connues pour les VIH-1/M, telles que les mutations A98G, V179E et Y181C sur la TI, présentaient un meilleur fitness par rapport aux mêmes virus, non mutés [26]. Ces observations suggèrent que le génotype naturellement muté des VIH-1/O, n'a pas d'effet délétère sur le fitness viral, contrairement à ce qui est observé pour les VIH-1/M chez qui, ces mêmes mutations sont sélectionnées par un traitement ARV.

La capacité adaptative des variants non-M du VIH-1 est, elle, liée à leur potentiel d'adaptation aux caractéristiques de leur hôte. Un facteur viral d'adaptation spécifique à l'hôte a été identifié en position 30 du gène *gag*. L'étude de la nature des résidus présents à cette position au sein de séquences de virus simiens et humains a montré la conservation d'une methionine (M) ou d'une leucine (L) chez les VIScpz, alors qu'un acide aminé basique de type Arginine (R) ou Lysine (K) était systématiquement présent au sein des lignées originelles de VIH-1. Des études de mutagénèse dirigée ont ainsi montré l'avantage réplicatif spécifique d'hôte conféré par l'une ou l'autre des mutations : les virus mutés pour M ou L en Gag-30 présentaient des titres plus élevés dans des cellules issues de chimpanzés, alors qu'on observe le même phénomène sur des cellules humaines seulement avec les virus mutés pour R ou K à cette même position. Ces résultats soulignent l'importance de la pression de sélection exercée spécifiquement par l'hôte sur le virus, et définissent la protéine Gag comme un modulateur de l'adaptation virale. L'analyse de cette position a été réalisée pour les 2 souches de groupe P pour évaluer l'impact de leur potentiel adaptatif sur leur diffusion ; la souche prototype RBF168 de groupe P exprime un résidu M en Gag-30 rendant cette souche humaine plus proche des VISgor et VIScpz porteurs de ce même résidu que des autres VIH. Paradoxalement, la seconde souche 06CMU14788 témoignerait d'une adaptation à l'homme du fait de la présence d'un résidu basique [30].

3.3.3. La réponse virale aux facteurs de restriction cellulaire

Les facteurs de restriction, molécules cellulaires dotées d'activité antivirale comme par exemple la tétherine, de l'anglais *« tether »* signifiant « attacher », ont également fait l'objet de nombreuses études pour mieux comprendre les capacités d'infection des variants divergents. Cette protéine intervient en maintenant les virions néoformés attachés à la surface membranaire, empêchant leur relargage dans le milieu cellulaire. La plasticité du VIH a permis de développer un effet antagoniste de cette activité antivirale via les protéines accessoires. Le VIH-1/M utilise ainsi la protéine Vpu pour contrecarrer l'effet de la tétherine et permettre également la dégradation des récepteurs CD4. Cette propriété semble avoir été acquise par voie adaptative du virus puisque chez les chimpanzés et les gorilles, c'est la protéine Nef des VIScpz et VISgor qui agit sur la tétherine. Concernant les VIH-1/N, la protéine Vpu gagnerait modestement en activité anti-tétherine, mais pas en activité de dégradation des récepteurs CD4. A l'inverse, la protéine Vpu des VIH-1/O et P inhibe peu, voire pas, le relargage des virions mais conserve un effet sur les récepteurs CD4 [45,164,165]. Des exceptions existent, deux souches, une de groupe O [166] et une de groupe N [167], ont montré, de façon analogue aux virus simiens, les performances de la protéine Nef à contrecarrer l'action des facteurs de restriction cellulaires. Cette observation indique que l'acquisition d'un antagonisme efficace dirigé contre la tetherine, probablement liée à une forte pression de sélection de l'hôte, est un phénomène rare d'émergence de variants avec un meilleur potentiel de transmission.

D'autre part, une récente étude de bioinformatique évolutive a confirmé l'existence d'un dizième gène du VIH-1 (pourtant suggérée en 1988) et a montré une corrélation statistiquement significative entre la présence de la protéine AntiSense, codé par le gène *Asp*, et la prévalence du VIH-1/M. De plus, le taux de maintien de la protéine Asp au sein du variant pandémique, a une probabilité nulle d'être obtenu par hasard [168]. La fonction de Asp reste encore indéterminée mais cette protéine est absente des VIH-1/O et de certains sous-types du VIH-1/M, suggérant une fonction accessoire et lien potentiel avec la capacité de diffusion des souches chez l'homme.

4. Prise en charge thérapeutique de l'infection à VIH-1 et conséquences de la diversité génétique des VIH-1 non-M

4.1. Les thérapeutiques antirétrovirales actuelles

A ce jour, 27 molécules antirétrovirales sont indiquées dans le traitement de l'infection à VIH de l'adulte. Elles sont regroupées en 5 classes thérapeutiques, ciblant chacune une étape du cycle de réplication du virus. L'objectif premier du traitement ARV est d'empêcher la réplication du virus en rendant la CVp indétectable <50 copies/mL, tout en maintenant ou restorant un nombre de CD4>500/mm^3. Secondairement, doivent être recherchés la meilleure tolérance possible, l'amélioration ou la préservation de la qualité de vie et la réduction du risque de transmission [169].

4.1.1. Les inhibiteurs d'entrée

Ils agissent précocement à trois niveaux de l'étape de pénétration du virus dans la cellule hôte : par inhibition de la phase d'attachement, par antagonisme des corécepteurs cellulaires CCR5, et par blocage de l'étape de fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire. Seules des molécules agissant sur les 2 dernières étapes sont actuellement commercialisées.

Les antagonistes des corécepteurs CCR5 sont des inhibiteurs allostériques utilisés en association avec d'autres molécules antirétrovirales pour le traitement des infections à virus de tropisme R5. Le seul représentant de cette classe thérapeutique actuellement commercialisé est le maraviroc (MVC, CELSENTRI). D'autres molécules de même mécanisme d'action, tels le vicriviroc et cenicriviroc, sont actuellement en cours d'étude (Phase I dans des combinaisons microbicides et phase III respectivement). Uniquement active sur les virus de tropisme R5, cette classe thérapeutique nécessite en amont une détermination du tropisme viral. A ce jour, deux modèles de prédiction coexistent [170].

La détermination génotypique se base sur la séquence génétique de la boucle V3 de la gp120 virale, pour prédire le tropisme ; la règle du 11/25 a été la première à établir la correspondance d'un virus X4 avec celle d'acides aminés chargés positivement en position 11 et 25 de la boucle [171]. Par la suite, des modèles computationnels plus sophistiqués, accessibles en ligne, ont vu le jour, dont les plus communément utilisés sont WebPSSM [172] et geno2pheno [173]. Le principal écueil de ces outils réside dans leur mise au point, quasiment exclusivement incrémentée par des séquences de VIH-1/M de sous-type B (prédominant dans les pays occidentaux).

Les tests phénotypiques permettent quant à eux, de tester le virus sous une forme infectieuse quelle qu'elle soit (pseudoparticules virales, virus recombinants, isolats cliniques…), dans des conditions d'infection de cellules de lignées exprimant l'un ou l'autre des co-récepteurs. Ainsi, le modèle commercial Trofile® ou *Enhanced-Sensitivity-Trofile-Assay* (ESTA) (Monogram Biosciences, South San Francisco, CA) [174] a supplanté les tests Virco (Virco BVBA, Mechelen, Belgium), Phenoscript (VIRalliance, France) [175], actuellement abandonnés. Dans une moindre mesure, un test (dit " test de Toulouse") élaboré par une équipe française, semble être utilisé à visée de recherche [176].

L'enfuvirtide (T20, FUZEON) est le seul inhibiteur de fusion actuellement commercialisé. Combiné à d'autres agents antirétroviraux, il est indiqué en administration sous-cutanée, comme thérapie de sauvetage chez les patients infectés par un VIH-1 en échec virologique d'un traitement précédent. Il correspond à un court peptide de 36 acides aminés mimant le domaine extracellulaire HR2 de la gp41 [177]. Il agit en bloquant le changement de conformation de la gp41 et empêchant la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire.

4.1.2. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

La TI a été la première cible virale des thérapeutiques antirétrovirales. Il existe deux classes pharmacologiques distinctes qui inhibent cette enzyme-clé du cycle de réplication viral : les inhibiteurs nucléos(t)idiques et non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI et INNTI respectivement).

Les INTI sont des analogues de nucléosides naturels dépourvus de groupement hydroxyl en 3. Ils subissent une phosphorylation par des kinases cellulaires pour devenir pleinement actifs. L'incorporation en 3' par la TI, d'un INTI au lieu d'un nucléotide naturel, bloque la phase d'élongation de l'ADN, du fait de la modification de la terminaison du groupement nécessaire à l'établissement d'une liaison phophodiester dans la chaine d'acides nucléiques. Les INTI agissent donc comme terminateurs de chaîne. Historiquement, le composant 3'-azido-2',3'-dideoxythimidine, nommé aussi zidovudine (AZT, RETROVIR), a été le premier a montré un bénéfice clinique sur les patients infectés dès 1987 [178]. Depuis, bien d'autres molécules sont venues enrichir cette classe, socle de la trithérapie d'initiation conventionnelle. A côté des molécules les moins prescrites (stavudine d4T, ZERIT ; didanosine ddI, VIDEX), on peut citer la lamivudine (3TC, EPIVIR), l'abacavir (ABC, ZIAGEN et en coformulation ABC+3TC, KIVEXA), le Ténofovir

disoproxil fumarate (TDF, VIREAD), seul inhibiteur nucléotidique, aussi co-formulé avec l'emtricitabine (FTC, EMTRIVA) dans TRUVADA (FTC+TDF). Son dérivé au sel d'alafénamide (TAF), dans la spécialité jumelle de la précédente, DESCOVY en association fixe de bithérapie, a permis d'améliorer sa tolérance notamment en diminuant la toxicité osseuse et rénale, tout en maintenant son activité antivirale.

Les INNTI sont quant à eux des inhibiteurs allostériques directs de la TI. En se liant à un site précis de la poche hydrophobe de l'enzyme ils inhibent la polymérisation de l'ADN néoformé. On distingue actuellement 5 molécules : névirapine (NVP, VIRAMUNE), efavirenz (EFV, SUSTIVA et ATRIPLA en co-formulatio avec FTC+TDF) et etravirine (ETV, INTELENCE), rilpivirine (RPV, EDURANT et en coformulation TDF+FTC+RPV, EVIPLERA et TAF+FTC+RPV, ODEFSEY) dites de seconde génération du fait de leur noyau diarylpyrimidine (DAPY). Ces dernières disposent d'une meilleure plasticité structurale qui leur permet un maintien d'efficacité notamment lors de changements de conformation de l'enzyme induits par certaines mutations de résistance [179,180].

4.1.3. Les inhibiteurs de protéase

Ils agissent par inhibition compétitive en se liant directement par un groupement hydroxyl au carboxyl du site actif de l'enzyme. Malgré l'important polymorphisme de cette enzyme, le site de liaison des molécules inhibitrices semble relativement conservé. La profusion de développements industriels a été permise par une évolution des squelettes protéiques déjà existants, donnant naissance à 10 molécules dans la classe des inhibiteurs de protéase (IP) : amprenavir (APV, AGENERASE), indinavir (IDV, CRIXIVAN), nelfinavir (NFV, VIRACEPT), saquinavir (SQV, FORTASE/INVIRASE), tipranavir (TPV, APTIVUS), ritonavir (RTV, NORVIR), lopinavir (LPV, en association fixe avec le ritonavir dans la spécialité KALETRA), fosamprenavir (TELZIR) comme prodrogue de l'amprenavir, atazanavir (ATV, REYATAZ), darunavir (DRV, PREZISTA) dont seules les 5 dernières font partie des schémas de recommandations thérapeutiques actuels. Par ailleurs, l'association fixe de DRV+FTC+TDF+cobicistat (SYMTUZA) a obtenu son autorisation de mise sur le marché européenne en septembre 2017. Le ritonavir exerce une importante inhibition de l'isoenzyme 3A4 du cytochrome p450, ce qui permet de diminuer le métabolisme des autres molécules. A ce titre, des concentrations subthérapeutiques de ritonavir sont communément co-administrées avec les inhibiteurs de protéase [181]. Parmi les molécules les plus récentes, le darunavir possède une très forte

affinité pour l'enzyme (de l'ordre de 5 fois supérieure aux agents plus anciens) et ce, même sur un substrat déjà résistant aux molécules les plus anciennes [182].

4.1.4. Les inhibiteurs d'intégrase

Les diketo-acides de cette récente classe d'antirétroviraux des inhibiteurs d'intégrase (INI), agissent comme inhibiteurs catalytiques de l'intégrase en chélatant les ions divalents du core catalytique. A ce titre, ils bloquent spécifiquement l'étape de transfert de brin et méritent plus justement l'appellation d'inhibiteurs de transfert de brin [183,184]. Depuis la commercialisation fin 2007, du raltegravir (RAL, ISENTRESS) première molécule de cette classe, deux autres molécules ont été autorisées sur le marché: elvitegravir (EVG, en France, uniquement dans les combinaisons fixes STRIBILD et GENVOYA, en co-formulation avec TDF+FTC+cobicistat et TAF+FTC+cobiscistat respectivement) et dolutegravir (DTG, TIVICAY) et sous forme de combinaison fixe TRIUMEQ associé à ABC+3TC. Bictegravir et cabotegravir sont des molécules de cette classe, actuellement en cours d'essai clinique, mais déjà prometteuses [185-187].

Malgré leur inaccessibilité actuelle dans certains pays à ressources limitées, les recommandations de traitement les plus récentes intègrent désormais cette classe thérapeutique à l'association classique de 2 INTI en trithérapie d'initiation [169,188,189].

4.1.5. Les stratégies en cours de développement

4.1.5.1. Les inhibiteurs d'attachement

Contrairement aux autres inhibiteurs d'entrée, le fostemsavir (GSK-3684934), initialement BMS-663068 (prodrogue du BMS-626529), agit en se liant directement à un site conservé de la gp120. Il empêche alors toute liaison au récepteur CD4 de la cellule hôte. Une première étude clinique a prouvé son efficacité virologique *in vivo* dans un essai de monothérapie de 8 jours chez des patients infectés [190]. Une seconde, à plus large échelle, a montré son équivalence par comparaison à l'atazanavir boosté au ritonavir [191]. Les étapes de développement se poursuivent actuellement par des études de phase III sur des patients lourdement prétraités (étude BRIGHTE NCT02362503).

4.1.5.2. Les inhibiteurs de capside

Des composés ciblant la capside du VIH ont montré une inhibition de la réplication du cycle viral de souches de laboratoires mais aussi d'isolats cliniques. Parmi les molécules issues de screening de bases de données chimiques ou de la sélection par cartographie en cristallographie à rayons X, on trouve actuellement en cours d'étude :

CAP-1 [192]; dérivés de benzodiazépines et de benzimidazolés [193]; CK026 et dérivés [194]; PF74 [195] ; BI-1 et BI-2 [196,197].

4.1.5.3. Les inhibiteurs de maturation

Dérivés betulinés d'α-kéto amides, ces composés empêchent le clivage protéolytique exercé par la protéase virale, en se liant à la protéine précurseur polyprotéique Gag lors des étapes tardives de maturation. Le Bevirimat a été le chef de file de cette classe, mais son développement a été stoppé en 2010, pour favoriser des dérivés ayant une meilleure efficacité sur l'ensemble des quasi-espèces virales. En effet, le polymorphisme naturel de certains virus réduisait de façon significative la sensibilité au Bevirimat [198,199]. A ce titre, les récentes données phénotypiques des composés GSK8999 et BMS-955176 semblent prometteuses pour la poursuite du développement de cette classe thérapeutique [200,201].

4.1.5.4. Les inhibiteurs allostériques de l'intégrase ou ALLINIs

Cette classe pharmacologique agit sur l'étape de maturation du virus en inhibant le facteur de croissance cellulaire LEDGF/p75 ou *Lens Epithelium-Derived Growth Factor*. Cette protéine est un cofacteur cellulaire qui se lie à l'integrase pour favoriser l'attachement à l'ADN viral [104,202]. L'ensemble crée ensuite un complexe d'attachement à la chromatine humaine [203]. Une poche de liaison au domaine catalytique de l'integrase, a été identifiée comme cible de l'action antivirale des ALLINIs [204,205]. Plusieurs molécules ont déjà été étudiées dans des phases de développement très précoce et semblent intéressantes [206].

D'autres stratégies font l'objet de recherche intensive pour traiter l'infection à VIH, dans un modèle d'éradication permanente de l'infection. Ces thérapies essentiellement basées sur le modèle du « *Shock and Kill* », cherchent à induire la réactivation à partir des réservoirs viraux d'ADN proviral pour « purger » la production virale par cytolyse ou inactivation immunologique. Ces modèles ne seront pas abordés ici, notre analyse se limitant aux stratégies de chimiothérapie conventionnelle.

4.2. Variabilité virale et résistance sélectionnée par un traitement antirétroviral

4.2.1. Mécanismes de sélection de virus résistants

Les mutations de résistance sont générées spontanément par la diversité des quasi-espèces virales, mais du fait d'un fitness beaucoup plus délétère, il est rare que les virus mutés prédominent chez leur hôte. L'émergence de ces variants mutés est cependant

rendue possible par la pression de sélection exercée par le traitement ARV sur l'ensemble des populations virales : un traitement à doses suboptimales diminue la circulation du virus sauvage sensible, permettant au virus muté de profiter d'un avantage relatif dans ces conditions (Figure 10).

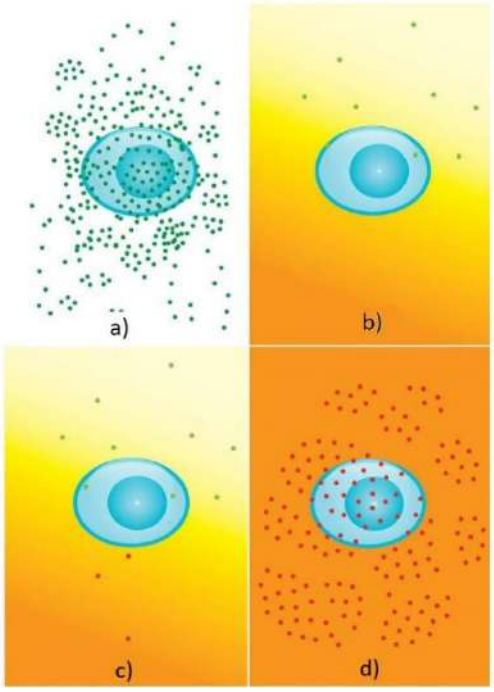


Figure 10. Cinétique d'émergence d'un virus résistant au traitement administré
Point vert : virus réplicatif sensible au traitement, Point rouge : virus réplicatif résistant au traitement, Gradient jaune à orange : variation de concentrations du traitement selon les compartiments (suboptimales à pleinement optimales) a) Avant l'exposition au traitement, la réplication virale est intense b) Pendant l'exposition, le virus réplicatif sensible est fortement réduit c) Sélection d'un virus muté résistant par des concentrations suboptimales d'ARV dans certains compartiments d) Sélection et réplication à haut niveau du virus muté lors de récurrences de concentrations sub-inhibitrices d'ARV, menant à l'échec virologique.
D'après Pironti *et al.* 2017 [207]

La plupart des mutations de résistance ne sont pas observées chez les patients naïfs de traitement (en dehors des virus résistants transmis) et sont donc dites non-polymorphiques [208]. Les mutations sont dites « primaires » lorsqu'elles induisent directement une réduction de la sensibilité au traitement ou « accessoires » quand elles s'associent à l'effet des mutations primaires et/ou impactent sur le fitness viral. Selon les classes d'antirétroviraux, le nombre de mutations à développer pour voir une diminution de sensibilité est variable : alors qu'une mutation est suffisante pour certaines classes (barrière génétique faible à la résistance), d'autres nécessitent l'accumulation de diverses mutations (barrière génétique élevée). L'efficacité globale d'une molécule résulte donc de

son activité antivirale intrinsèque estimée par la réduction de la charge virale (Log cp/mL) en monothérapie, associée à sa barrière génétique à la résistance, définie par le nombre de mutations entraînant une diminution de l'activité virologique (Figure 11).

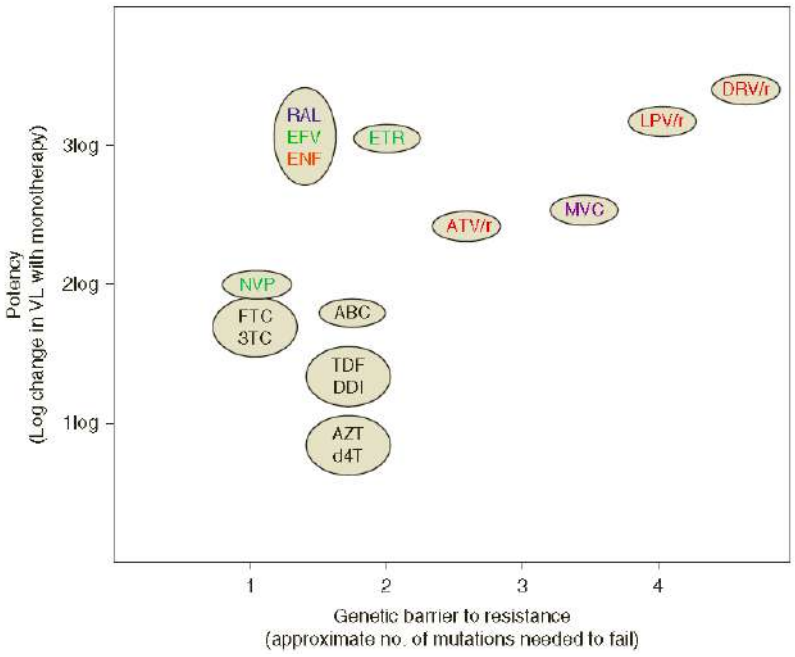


Figure 11. Efficacité relative des ARV par rapport à leur barrière génétique à la résistance
Représentation schématique du niveau d'activité antivirale exprimé en nombre de Log de réduction de la CVp en monothérapie (axe des ordonnées) en fonction du nombre de mutations nécessaires à l'acquisition de l'échec (axe des abscisses). D'après Tang et al. 2012 [208].

4.2.2. Méthodes d'analyse de la sensibilité aux ARV

4.2.2.1. Analyse génotypique

L'analyse génotypique correspond au séquençage des gènes codant pour les cibles des ARV. La recherche des mutations existantes par rapport à une séquence de référence « sensible » (traditionnellement HXB2 pour les VIH-1/M ou ANT70 pour les VIH-1/O), est réalisée spécifiquement sur les résidus qui sont décrits pour induire une résistance aux molécules ARV. Une interprétation de ces mutations est ensuite réalisée selon des règles d'interprétation définies sur des modèles statistiques associant des paires génotypes/phénotypes et des résultats de réponse virologique obtenus *in vivo*. Les algorithmes d'interprétation principalement utilisés et mis à jour périodiquement sont ceux de l'Agence nationale de recherche contre le SIDA et les hépatites virales (ANRS) http://www.hivfrenchresistance.org/, de l'université de Stanford en Californie http://hivdb.stanford.edu, de l'institut Rega de Leuven en Belgique http://rega.kueleuven.be/cev/avd/software/rega-algorithm [209]. Par ailleurs, des sociétés

commerciales proposent divers systèmes d'interprétation de la résistance génotypique: GeneSeq® de Monogram Biosciences, Viroseq® (Celera Diagnostics/Abbott®), Viroscore® (Advanced Biological Laboratoires), Smartgene HIV (Smartgene).

Selon les recommandations actuelles, une détermination génotypique de la résistance est souhaitable lors du bilan initial d'une infection à VIH, avant toute initiation thérapeutique, et en cas d'échec virologique pour documenter la résistance et guider le choix de la nouvelle combinaison ARV [169].

4.2.2.2. Analyse phénotypique

L'analyse phénotypique consiste à mesurer la réplication d'un virus en culture cellulaire, en présence de concentrations croissantes d'ARV, le processus de sélection de virus mutés imposant de recourir à des doses plus élevées d'ARV, par rapport à celles nécessaires à une souche de référence dite « sensible » pour obtenir la suppression virale. Ainsi, la concentration de produit nécessaire à inhiber la croissance virale *in vitro*, de 50% ou 90% par rapport à l'inoculum de départ, définit une Concentration Inhibitrice 50% et 90% (respectivement CI50 et CI90). Plus cette concentration est élevée par rapport à celle observée chez le virus sensible, moins le virus est sensible à la molécule administrée et donc résistant. La courbe dose-réponse obtenue en reportant le niveau d'inhibition de réplication, en fonction de la dilution de médicament, prend l'allure d'une sigmoïde. Son point d'inflexion reflète la CI50 de la souche testée, exprimée en unité de concentration (généralement nM ou µM). Les résultats sont aussi rapportés à ceux obtenus pour un virus (ou un panel) de référence réputé sensible à la molécule étudiée ; on définit alors le niveau d'inhibition du virus testé par le rapport de sa CI50 avec celle du virus de référence, donnant ainsi un niveau de « *Fold Change* » (FC).

L'interprétation des tests phénotypiques est basée sur la définition du seuil de FC à partir duquel la molécule testée ne semble pas exercée l'effet escompté sur la réplication virale. Bien que difficile à établir, la définition de seuil clinique semble la plus pertinente [210,211]. Alors que la variabilité technique est un paramètre important à considérer sur les essais phénotypiques, la variabilité virale intrinsèque semble aussi jouer un rôle majeur pour la définition d'un seuil biologique [212]. Malgré ces difficultés de standardisation, cette méthode permet une estimation directe et quantitative de la sensibilité des virus aux molécules antirétrovirales, même en présence de complexes de mutations. A l'inverse, le principal écueil est révélé par la discordance parfois observée

entre une diminution d'efficacité *in vivo* et de très faibles variations de sensibilité *in vitro* [212].

La mise en œuvre pratique de cette méthode nécessite habituellement l'isolement de la souche virale à partir d'une culture, qui est chronophage et impose non seulement un environnement contrôlé (laboratoire de sécurité microbiologique de niveau 3), mais aussi un inoculum viral initial suffisant. Du fait de sa lourdeur technique, cette méthode est supplantée par de méthodes basées sur la construction d'un virus recombinant en cycle unique d'infection ou de virus pseudotypés, dont 2 tests commerciaux existent actuellement Phenosense® (Monogram Biosciences, San Francisco, CA, USA) et Antivirogram® (Virco, Titusville, NJ, USA). Ces modèles semblent d'ailleurs très peu corrélés entre eux [213].

4.3. Impact de la diversité génétique des VIH-1/non-M

4.3.1. Sensibilité génotypique naturelle

Le polymorphisme naturel du VIH-1/P n'a pas été décrit jusqu'à présent. Les quelques données génotypiques disponibles sur les VIH-1/N indiquent qu'il n'existe pas, pour ces variants, de mutations naturelle à l'origine de résistance aux INTI, INNTI et IP [54,56].

Concernant les VIH-1/O, on connaît la nature des acides aminés exprimés sur les positions référencées par les algorithmes d'interprétation de la résistance définis pour les VIH-1/M (ANRS, Rega Stanford) [214,215]. Le polymorphisme naturel des VIH-1/O, se résume alors comme suit :

- La PR présente la plus forte variation génétique avec plus de 34% des positions du gène mutées [216]. On y retrouve des positions fortement impactées (proportion de mutations >70%) : 10, 13, 15, 20, 34, 35, 36, 41, 43, 58, 62, 63, 64, 69, 71, 89 et 93 dont la majorité expriment un acide aminé associé à la résistance chez le VIH-1/M [214,215,217] (Tableau 1).

Tableau 1. Fréquence (%) des mutations naturelles courantes des VIH-1/O sur la PR.
N=83 séquences, interprétées par rapport à l'algorithme ANRS 2017 v27 et dont la fréquence est > 10%

Résidu sauvage et Mutations associées à la résistance		Mutations atypiques*	Mutations décrites par un algorithme autre que l'ANRS (Rega et Stanford)
L10	**V**(75) I(25)		
V11			
I13			**A**(100)
I15	**V**(91)		
G16	E(12)		
K20		**C**(100)	
L33			
E34			**N**(77)
E35			**N**(95)
M36	**I**(99)		
R41			**K**(83)
K43			**T**(75)
D60		N(29) S(11)	
Q58	**E**(97)		
I62	**V**(100)		
L63		**T**(88)	
I64			**V**(84)
H69	**R**(88) K(12)		
K70			**E**(51) Q(10)
A71	**V**(94)		
V77			
I85			
L89	**I**(88) M(12)		
I93			**L**(100)

En gras, les mutations présentes majoritairement à une fréquence >50%, *position de résistance connue mais impact du résidu non décrit. Les positions associées à la résistance non mutées, ne sont pas listées. Adapté de Depatureaux *et al.* 2011 [214]

- La TI des VIH-1/O est certes moins polymorphique que la PR, mais présente les spécificités suivantes:
    - la mutation A98G associée à la résistance aux INNTI,
    - les mutations atypiques V179E et L210Y,
    - la mutation V118C prise en compte comme mutation accessoire par l'algorithme de Stanford,
    - la mutation Y181C, pour une majorité de souches (54 à 79% selon les études [59,214]), confère une résistance à l'ensemble des molécules de la classe des INNTI [214,215] (Tableau 2).

Tableau 2. Fréquence (%) des mutations naturelles courantes des VIH-1/O sur la TI.

N=74 séquences, interprétées par rapport à l'algorithme ANRS 2017 v27,et dont la fréquence est >10%

Positions et Mutations associées à la résistance		Mutations atypiques*	Mutations décrites par un algorithme autre que l'ANRS (Rega et Stanford)
D67			
T69			
V90			
A98	**G**(100)		
K101			
K103	R(28)		
V106	I(19)		
V118			**C**(100)
E138			
V179		**E(**100)	
Y181	**C**(57)		
M184			
G190			
L210		**Y**(100)	
T215			
K219			
H221			
P225			
M230			

En gras, les mutations présentes majoritairement à une fréquence >50% ; *position de résistance connue mais impact du résidu non décrit. Les positions associées à la résistance non mutées, ne sont pas listées. Adapté de Depatureaux *et al.* 2011 [214]

- L'IN possède aussi un profil mutationnel singulier. L'étude de Leoz *et al*. sur un panel de 96 séquences de virus de patients naïfs d'anti-intégrase a montré que 11 positions présentent des mutations naturelles de résistance, dont 3 de manière quasi constante (fréquence >99%) : L74I, S153A et T206S [25], polymorphisme confirmé par les résultats d'études ultérieures [59,69,214]. On note aussi la présence naturelle à faible fréquence (<10%) de mutations majeures (T97A, E157Q), phénomène observé de manière semblable chez les VIH-1/M (Tableau 3).

Tableau 3. Fréquence (%) des mutations naturelles courantes des VIH-1/O sur l'IN.
N=96 séquences, interprétées par rapport à l'algorithme ANRS 2017 v27, et dont la fréquence est >10%

Positions et Mutations associées à la résistance	Mutations atypiques**	Mutations décrites par un algorithme autre que l'ANRS (Rega et Stanford)
H51		
L74 **I**(100)*§		
T97		
T112		**V**(56)* I(39)*
T124		**A** (95)*
S153	**A**(99)*§	
E157		
G163		**Q**(96)*§
V201		**I**(96)*
T206		**S**(99)*§

En gras, les mutations présentes majoritairement à une fréquence >50% ; **position de résistance connue mais impact du résidu non décrit. Les positions associées à la résistance non mutées, ne sont pas listées. Adapté de * Leoz et al. 2008 [25] et § Depatureaux et al. 2011 [214]

- La quasi-totalité des séquences de gp41 présente la mutation de résistance N42D (99%) [218]. Les autres mutations polymorphiques des VIH-1/O sont atypiques, parfois mixtes et très peu fréquentes (<0.5%) : N42NS, N43K, L45LP [219].

En l'absence de pression de sélection thérapeutique, le polymorphisme des VIH-1/O se caractérise donc par une fréquence élevée de mutations associées à la résistance (MAR) sur les différentes régions étudiées.

La prise en compte du polymorphisme majoritaire naturelle retrouvé pour les VIH-1/O conduit ainsi, selon les 3 principaux algorithmes d'interprétation de la résistance (ANRS, Stanford, Rega) [214] aux conclusions suivantes:

i) une sensibilité à la classe des INTI et des INI ;
ii) une résistance ou sensibilité intermédiaire aux INNTI du fait de la MAR majoritaire Y181C ; seul l'algorithme de l'ANRS indiquerait une sensibilité conservée à l'ETV, la discordance d'interprétation étant liée à la considération de la MAR V179E par Stanford et Rega et non par l'ANRS ;
iii) le profil majoritaire des mutations sur la PR (10V + 15V + 20C + 36I + 58E + 62V + 63T + 69R + 71V + 89I), décrites par l'algorithme ANRS, implique une sensibilité à l'ensemble des IP excepté une résistance ou sensibilité intermédiaire au NFV, SQV et TPV (bien que ce dernier n'ait été validé que pour le sous-type B du VIH-1/M) ;
iv) et une résistance ou sensibilité intermédiaire au T20 principalement portée par la mutation signature N42D.

L'ensemble de ces données souligne l'importance du séquençage des régions associées à la résistance avant la mise sous traitement. Et ceci d'autant plus que, comme pour les VIH-1/M, le phénomène de transmission de virus résistants existe aussi pour les VIH-1/O. Un cas de transmission d'une souche hautement résistante, au sein d'un couple a été récemment décrit [220].

4.3.2. Sensibilité phénotypique naturelle

Les données issues des études phénotypiques viennent confirmer l'absence de conséquence du polymorphisme génétique de la TI des VIH-1/O sur la sensibilité aux INTI [156]. Les CI50 de VIH-1/O au 3TC, n'étaient pas différentes de celles obtenues pour les VIH-1/M (p=0.145). Un seul isolat clinique retrouvé phénotypiquement résistant (CI50>6.25 nM par rapport à une moyenne de 0.05 ± 0.03 nM), présentait la mutation M184V, vraisemblablement sélectionnée par une exposition antérieure à AZT+3TC [215]. A l'inverse, la résistance phénotypique des VIH-1/O aux INNTI, principalement portée par la mutation Y181C, a été démontrée par plusieurs études [156,215,221], il n'est donc pas recommandé d'utiliser cette classe dans la prise en charge des patients infectés par un VIH-1/O [169]. En s'intéressant au détail des résultats, on note cependant que la sensibilité à ETV ne semble pas autant impactée (FC=10) que pour NVP (FC=89) ou EFV (FC=42) [222]. De plus, il existerait un gradient de la réponse phénotypique aux INNTI en fonction du génotype des virus. Pour exemple, la mutation K103R, lorsqu'elle est associée aux mutations naturelles A98G et V179E présente un effet 10 fois plus marqué sur la sensibilité phénotypique à ETV et NVP [156,215]. En l'absence de la mutation Y181C, on note une sensibilité phénotypique à ETV conservée, malgré la présence d'autres mutations telle que la G190A [69].

Si l'interprétation génotypique est rassurante concernant la classe des IP, la première étude de sensibilité au SQV, réalisée sur 8 isolats cliniques VIH-1/O, montrait des différences de sensibilité par rapport à la CI50 des isolats de référence de groupe M et semblait donc confirmer les données d'interprétation génotypique [223]. Le faible effectif de souches étudiées n'a cependant pas permis de confirmer ce résultat statistiquement. La sensibilité phénotypique au DRV d'un panel de 28 isolats cliniques VIH-1 dont 3 de groupe O, a été étudiée en préambule de l'étude ARTEMIS de phase III de DRV/r 800/100 mg *vs* LPV/r. Les résultats montraient une médiane de CI50 des VIH-1/M à 0.52 nM (<0.10 à 4.28 nM), alors que la médiane des VIH-1/O était à 2.41 nM, soit un FC à 5 [224]. Alors que les auteurs concluaient à une bonne sensibilité de l'ensemble des virus testés, il n'en demeure pas moins des écarts de CI50 importants entre les virus de groupe M et O. Ainsi, la sensibilité phénotypique des VIH-1/O aux IP nécessiterait encore d'être précisée par l'étude d'autres IP.

Concernant la sensibilité aux INI, Depatureaux *et al.* ont mis en évidence une moindre efficacité de l'enzyme des VIH-1/O sur l'activité de transfert de brin par rapport au VIH-1/M, à rapprocher d'une modification de structure tertiaire induite par les motifs polymorphiques en position 74 et 153 [225]. La forte affinité de l'enzyme pour ses substrats (dolutegravir, raltegravir ou elvitegravir) permet néanmoins le maintien de l'efficacité de ces molécules, avec même une meilleure inhibition de l'enzyme des VIH-1/O par rapport aux VIH-1/M par le raltegravir [69,225]. L'efficacité de l'elvitegravir sur les VIH-1/O serait à nuancer : une différence de CI50 moyenne, de dix fois supérieure à celle obtenue pour des virus de groupe M dans les mêmes conditions, a été rapportée, ainsi qu'une importante variabilité inter-souches [156].

Enfin, un très large intervalle de CI50 a été observé avec l'enfuvirtide et le maraviroc, avec des valeurs jusqu'à cent fois plus élevées que celles obtenues pour des souches identifiées résistantes [156,219,226]. L'interprétation de ces importantes variations de CI50 demeure bien délicate en l'absence de seuil de résistance clairement défini pour ces souches.

Aucune information sur la sensibilité phénotypique aux ARV des VIH-1/N et P, n'est actuellement disponible dans la littérature.

4.3.3. Réponse immuno-virologique des patients infectés par un VIH-1 non-M

Les données génotypiques et phénotypiques soulignent que la divergence génétique importante des VIH-1/O par rapport aux VIH-1/M peut avoir un impact sur la sensibilité naturelle aux ARV. Cela pose la question d'une possible réponse in vivo différente de celle des patients infectés par une VIH-1/M. Les données de réponse thérapeutique des variants divergents, actuellement disponibles sont éparses et sont pour la plupart ancienne et réalisées sur très faibles effectifs.

S'agissant de l'unique patiente infectée par un VIH-1/P, cette dernière a bénéficié d'un suivi thérapeutique depuis 2009 avec l'initiation d'une combinaison antirétrovirale (cARV) de TDF+FTC+LPV/r, modifiée pour ABC+3TC+LPV/r à un mois de l'initiation, pour cause d'intolérance au TDF. Les données virologiques et immunologiques issues du suivi clinique de la patiente jusqu'en 2017 ne sont pas connues.

Concernant les VIH-1/N, trois études sont informatives, bien que non exhaustives. La première décrit un couple asymptomatique, dont seul un partenaire, diagnostiqué VIH en 2001 avec 92 CD4 mm^{-3}, avait reçu un traitement par d4T+3TC+NVP. Sa compagne infectée par la même souche, présentait 411 CD4 mm^{-3} au moment du diagnostic en

2003. Une réduction de la réplication du virus après 6 mois de cARV a pu être montrée, par mesure indirecte du volume de plasma utilisé pour l'extraction des acides nucléiques lors des étapes de séquençage [56]. Le second cas fait référence à la persistance d'une CVp élevée >3.5 Log cp/mL (HIV-1 Real*Time*, Abbott®) avec un taux de CD4 <350 mm^{-3} pendant 18 mois d'un traitement par TDF+3TC+EFV. Devant l'échec virologique, un changement de traitement pour AZT+3TC+LPV/r a permis une réduction de 1 Log de la CVp en 4 mois [57]. Enfin, le cas unique d'un patient en primo-infection, avec 219 CD4 mm^{-3} au nadir, indiquait un plateau de CVp en l'absence de traitement à 4.4 Log cp/mL en moyenne (Cobas Taqman HIV-1 v2.0, Roche®). L'initiation d'une pentathérapie (TDF+FTC+DRV/r+RAL+MVC) a alors conduit à la suppression de la réplication virale à 4 semaines (CVp <20 cp/ml) et sur la restauration immunologique (483 CD4 mm^{-3}) [58].

Les données *in vivo* concernant la réponse aux ARV des patients infectés par un VIH-1/O sont également peu nombreuses. La première mention d'un traitement ARV est retrouvée pour le couple de patients ANT70. Après une séroconversion en mars 1987, la patiente B a refusé tout traitement ARV jusqu'à son inclusion dans un essai thérapeutique en 1995, où elle reçut un traitement par AZT+SQV+ddC, sans que sa réponse clinique ni biologique n'ait été décrite. Les études ultérieures font mention d'une réponse virologique et immunologique plutôt favorable aux divers ARV administrés [227,228]. Ainsi parmi les 6 patients recevant une combinaison faite de 2INTI+IP/r pendant 32 mois en moyenne (21 à 95 mois), tous sauf deux atteignaient l'indétectabilité (<50 cp/ml) dans les 3 mois suivant l'initiation et présentaient un gain significatif en CD4 en fin de suivi atteignant entre 240 et 500 CD4 mm^{-3} pour une moyenne de CD4 initiale à 88 mm^{-3} [227]. Les deux patients en échec virologique étaient pour l'un en rupture thérapeutique volontaire et l'autre avait subi plusieurs changements de traitement, du fait d'intolérances mais aussi de la survenue d'évènements cliniques classant SIDA associé à une immunodépression profonde (nadir à 24 CD4 mm^{-3}). En 2010, une plus large série de 22 patients, présentée par Depatureaux *et al.* en 2010, rapportait 59% de succès sous une trithérapie associant majoritairement 2INTI+1IP/r. Quelques études ont montré l'efficacité virologique et immunologique d'une thérapie de sauvetage par T20 [214] ou RAL [229,230].

PARTIE 1 :

ETUDE DE LA SENSIBILITE NATURELLE DES VIH-1 NON-M AUX INHIBITEURS D'INTEGRASE ET D'ATTACHEMENT

Ce travail a fait l'objet d'une communication affichée :

XXV International Workshop on HIV Drug Resistance and Treatment Strategies (Boston, Février 2016) : *HIV-1 Non Group M Phenotypic Susceptibility to Integrase Inhibitors (Dolutegravir, Elvitegravir and Raltegravir)*

d'une double présentation en communication orale et affichée :

33èmes Réunions Interdisciplinaires en Chimiothérapies Anti-Infectieuses (RICAI, Paris, Décembre 2013) : *Natural Polymorphism in gp120 of HIV-1 Non Group M and in vitro Resistance to Attachment Inhibitor BMS 626529*

et d'un article original :

J Antimicrob Chemother 2017 Sep 1 ; 72 (9):2431-2437 : *HIV-1 non-group M phenotypic susceptibility to integrase strand transfer inhibitors*, doi : 10.1093/jac/dkx190 (Annexe 4)

1. Problématique et objectifs

Le recours aux nouvelles classes thérapeutiques d'ARV présente un intérêt majeur pour le traitement des patients infectés, à plusieurs titres : bénéficier des avancées en matière de tolérance et de puissance virologique, obtenir des profils de résistance distincts de ceux sélectionnés par les ARV plus anciens, et proposer des thérapies de sauvetage aux patients en échecs multiples. Aussi, les nouvelles classes thérapeutiques représentent un atout pour le traitement des patients infectés par des variants divergents : outre les mutations de résistance naturellement présentes chez les VIH-1/O, qui privent l'arsenal thérapeutique de certaines molécules ou classes d'ARV, la sélection de mutations de résistance et/ou leur archivage, chez des patients ayant cumulé différentes lignes de

traitement, restreignent d'autant plus les options. Les nouveaux ARV constituent dès lors un potentiel thérapeutique supplémentaire des infections à VIH-1 non-M, qu'il est nécessaire d'évaluer pour une utilisation fiable et maîtrisée de ces molécules.

La récente classe des INI est, depuis peu, intégrée dans les nouveaux schémas thérapeutiques internationaux : en initiation (4 stratégies sur 6 recommandent des INI), en switch pour simplification ou allègement, et en cas d'échec virologique et/ou immunologique aux autres classes d'ARV [169,189,231]. Pour autant, l'efficacité des INI sur les VIH-1 non-M n'a été que très peu étudiée. Seules trois études phénotypiques ont montré l'efficacité *in vitro* de RAL et EVG sur un nombre limité de souches VIH-1/O [69,156,232], et aucune ne s'est intéressée aux VIH-1/N et P.

Nous avons donc évalué 2 classes thérapeutiques récentes, la classe des INI, disponible depuis la mise sur le marché en 2007 du RAL mais enrichie récemment par deux nouvelles molécules (EVG et DTG), et celle des inhibiteurs d'attachement représentés par le fostemsavir, actuellement en phase 3 d'essais cliniques.

Parmi les classes thérapeutiques encore en développement la classe des inhibiteurs d'attachement de la gp120, avec le Fostemsavir, semble prometteuse. Les premiers résultats des essais de phase III ont montré chez des patients lourdement prétraités après une semaine de traitement, une réduction de la CVp significativement supérieure contre placebo (0.79 Log cp/ml *vs* 0.17 Log cp/ml ; $p<0.0001$) [233]. La forte divergence génétique des VIH-1 non-M, par comparaison aux VIH-1/M, implique d'étudier particulièrement l'efficacité de la molécule sur ces virus, d'autant que les essais phénotypiques préliminaires sur 2 isolats de VIH-1/O annonçaient des CI50 très élevées par rapport aux VIH-1/M [234].

Les objectifs de cette première partie expérimentale étaient d'étudier :

- la sensibilité phénotypique et génotypique à RAL, EVG mais aussi DTG, à partir d'un large panel d'isolats cliniques représentatifs de la diversité des VIH-1 non-M, et d'identifier les déterminants génotypiques corrélés aux éventuelles différences de sensibilité,
- la sensibilité génotypique au fostemsavir, des VIH-1 non-M, à partir de l'ensemble des séquences de gp120 disponibles en ligne et au sein des collections de notre laboratoire.

2. Echantillons et méthodes

2.1. Echantillons

L'étude de sensibilité phéno-génotypique aux INI a été réalisée à partir de 39 isolats cliniques de VIH-1 non-M, issus de patients naïfs d'INI et la souche de référence M BRU-HXB2. L'étude de la sensibilité génotypique au fostemsavir a été effectuée à partir d'une banque de 111 séquences de VIH-1 non-M.

2.1.1. Isolats cliniques

L'isolement des souches cliniques a été réalisé sur des cellules mononucléées de sang périphérique cibles (CMSP) par deux méthodes distinctes selon la nature du prélèvement d'origine (Annexe 1). La spinoculation consistait en la mise en contact de 80 µl de plasma, titrant au minimum à 3 Log cp/mL, et 20 millions de CMSP cibles par centrifugation de 2 h à 1200g. La coculture de CMSP infectées a été réalisée par la mise en contact avec les CMSP cibles (rapport 1:2) pendant 2 h. Une fois les infections réalisées, les cellules étaient ensuite lavées en milieu RPMI (RPMI 1640 L-Glutamine, Lonza, Verviers, Belgique) additionné d'antibiotique (Gentamicine 50 µg/mL, Panpharma, Luitré, France), puis placées à 37°C sous 5% de CO_2 pendant 21 jours. Un entretien bihebdomadaire des cultures était réalisé en renouvelant 50% du surnageant de culture par du milieu composé de RPMI, Gentamicine à 50µg/mL, 10% de sérum de veau décomplémenté 30 min à 56°C (SVF, PAA laboratories, Pasching, Autriche), IL-2r à 450 UI/mL (Proleukin, Novartis pharma, Rueil-Malmaison, France) et bromide d'hexadimethrine à 2 µg/mL (Polybrene sigma, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri).

Une mesure de l'activité de TI (Lenti RT activity, Cavidi, Uppsala, Suède) a été réalisée dans le surnageant de culture issu de chaque entretien, pour suivre la cinétique de production virale. Le surnageant produit au pic d'activité viral définissait alors l'isolat viral. Il était aliquoté et conservé à -80°C avant utilisation. Par ailleurs, dans le cadre du maintien des stocks viraux, des amplifications ont été réalisées à partir d'un surnageant déjà produit. Le protocole d'infection était identique au précédent en utilisant 500 pg d'activité TI (Lentivirus RT activity, Cavidi, Uppsala, Suède) pour 20 millions de CMSP cibles. Les caractéristiques de chacune des souches sont présentées en Tableau 4.

Tableau 4. Caractéristiques des 39 isolats cliniques VIH-1 non-M et de la souche de référence BRU-HXB2.

Classement par groupe et valeurs d'activité de TI au pic décroissante.

Isolat	Groupe	Jour du pic d'activité TI	Activité TI au pic (pg/mL)
YBF38	VIH-1/O	J10	55 921
YBF26	VIH-1/O	J7	52 156
BCF006	VIH-1/O	J3-7	41 500
YBF16	VIH-1/O	J6	36 049
BCF057	VIH-1/O	J7	27 500
YBF32	VIH-1/O	J7	26 440
BCF005	VIH-1/O	J5	25 989
RBF125	VIH-1/O	J11	25 060
BCF003	VIH-1/O	J7	22 113
BCF009	VIH-1/O	J11	21 400
BCF100	VIH-1/O	J8	18 798
BCF001	VIH-1/O	J7	13 763
RBF130	VIH-1/O	J14	12 625
YBF17	VIH-1/O	J7	12 625
BCF011	VIH-1/O	J10	11 375
YBF18	VIH-1/O	J7	11 344
MVP5180	VIH-1/O	J19	11 082
BCF002	VIH-1/O	J10	11 045
BCF010	VIH-1/O	J7	11 031
BCF183	VIH-1/O	J11	10 839
RBF206	VIH-1/O	J14	10 623
YBF37	VIH-1/O	J11	9 625
BCF113	VIH-1/O	J7	9 188
RBF189	VIH-1/O	J11	8 259
BCF120	VIH-1/O	J14-18	8 184
YBF39	VIH-1/O	J7	8 184
BCF178	VIH-1/O	J11	6 875
BCF101	VIH-1/O	J7	5 670
BCF109	VIH-1/O	J14-17	4 752
BCF112	VIH-1/O	J10-14	4 333
BCF008	VIH-1/O	J14	3 063
BCF177	VIH-1/O	J10-14	2 946
BCF111	VIH-1/O	J10	2 328
YBF35	VIH-1/O	J7-10	2 315
BCF013	VIH-1/O	J7	2 052
BCF108	VIH-1/O	J17	316
YBF30	VIH-1/N	J4-8	59 925
N1.FR.2011	VIH-1/N	J15	9 422
RBF168	VIH-1/P	J7-11	5 744
BRU-HXB2	VIH-1/M	J11	587

2.1.2. Séquences des régions cibles des INI et Inhibiteurs d'attachement

Les séquences ont été obtenues à partir de génomes viraux extraits soit de manière automatisée sur EZ1 (Qiagen, Courtaboeuf, France) pour les matrices liquides (plasma, serum, surnageant), soit en méthode manuelle QIAamp ADN/ARN minikit (Qiagen) pour les CMSP et les cellules de culture.

2.1.2.1. Gène pol

Le séquençage de la région intégrase (codon 19 à 263) a été réalisé sur les 40 surnageants de culture du panel. Brièvement, l'amplification était réalisée par une première RT-PCR externe utilisant le coffret Superscript II One-Step RT-PCR (Life Technologies, Carlsbdad, Californie) pour un volume final de 50 µl. Une PCR interne était alors réalisée avec le coffret HotStar Taq Master Mix (Qiagen) dans un volume final identique au précédent, selon les conditions opératoires déjà décrites [25]. Les amorces utilisées sont listées en Annexe 1. Les produits finaux ont été visualisés en gel d'agarose à 1.5 % et purifiés avec le coffret Nucleospin and PCR clean up (Macherey Nagel, Düren, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. La réaction de séquence utilisait le coffret Genome Lab DTCS Quick Start (Beckman Coulter, Galway, Ireland) et un thermocycleur type GenAmp PCR System 9700. La révélation était réalisée par électrophorèse capillaire sur CEQ 8000 (Beckman Coulter, Galway, Ireland). Les séquences obtenues ont été converties en acides aminés, et alignées sur la séquence de la souche de référence BRU-HXB2 (K03455) grâce au logiciel BIOEDIT 7.2.5 (Ibis, Biosciences, Carlsbad, Californie). Une analyse phylogénétique a été réalisée en utilisant la méthode du plus proche voisin *(Neighbor-joining)*, utilisant une robustesse de 500 bootstraps, calculée par le modèle « à 2 paramètres de Kimura » dans le logiciel MEGA 6.0 [235].

L'arbre phylogénétique obtenu confirmait la représentativité de la diversité des VIH-1 non-M du panel avec 36 VIH-1/O dont 25 et 11 étaient de sous-groupe H et T respectivement, 2 VIH-1/N et 1 isolat de VIH-1/P (Figure 12). La souche VIH-1/M, BRU-HXB2, a été utilisée comme référence dans tous nos essais.

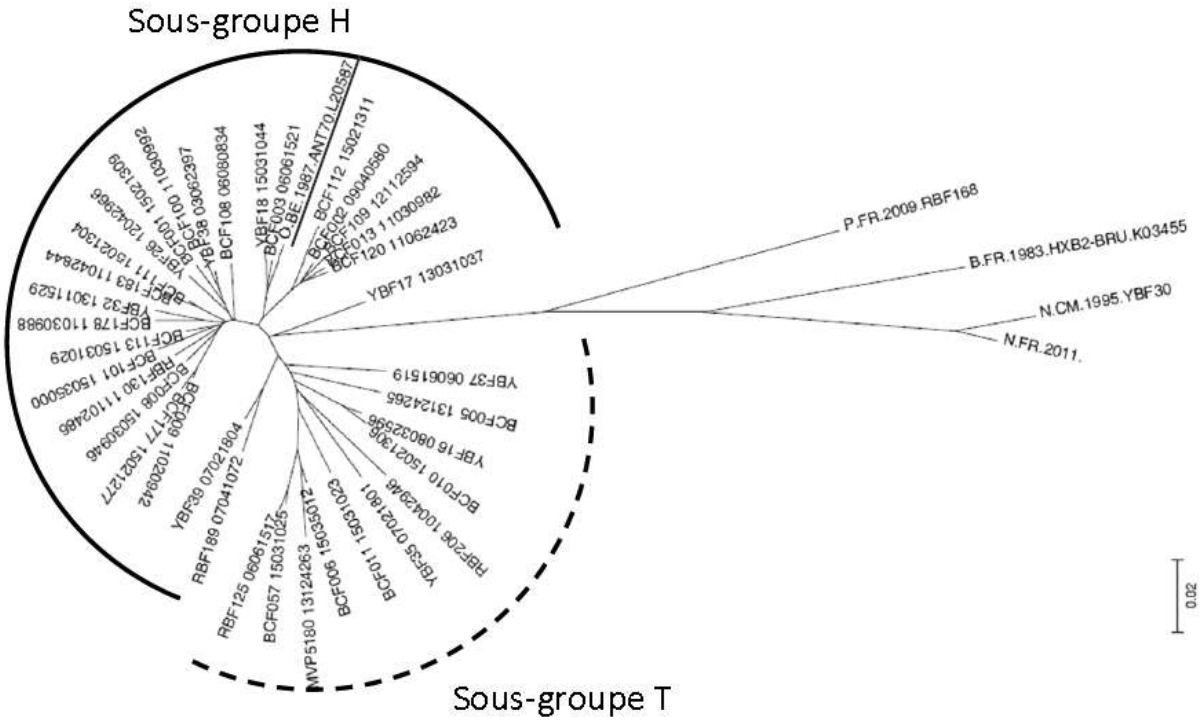


Figure 12. Arbre phylogénétique des 40 séquences d'intégrase du panel analysé et de la séquence de référence VIH-1/O, ANT70 (soulignée).

2.1.2.2. Gène env

Une banque de séquences correspondant à la région de la gp120 de 111 VIH-1 non-M a été constituée à partir des banques de séquences internationales disponibles en ligne (http://www.hiv.lanl.gov/) (N=81 : 70 VIH-1/O, 9 VIH-1/N, 2 VIH-1/P) et de séquences obtenues au laboratoire et non encore publiées (N=30 VIH-1/O). Pour ces dernières, le séquençage du gène *env* (2577 pb) a été réalisé par trois RT-PCR chevauchantes sur 5 µl d'extrait, en utilisant le coffret SuperScript III one step RT-PCR (Life Technologie), 20 pmol de chaque amorce définie dans le tableau en annexe, pour un volume final de 50 µl. Les conditions de cycle étaient les suivantes : 50°C pendant 30 min, 35 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 55°C, 1min 30 s à 68°C et une étape d'élongation de 7 min à 68°C. Sept PCR internes étaient alors réalisées sur 2 µl de produit amplifié avec le coffret High Fidelity PCR master (Roche, Basel, Suisse), dans un volume final de 50µl. Les conditions de cycles étaient les suivantes : 2 min à 94°C, 10 cycles de 10 s à 94°C, 30 s à 55°C, 45 s à 72°C, puis 17 cycles de 15 s à 94°C, 30 s à 55°C, 45 s à 72°C avec une incrémentation de 5 s à chaque cycle, une étape finale de 7 min à 72°C. Le mode opératoire de séquençage était identique à celui décrit dans le paragraphe précédent.

Une analyse phylogénétique sur le modèle précédemment défini, a permis de confirmer la classification des séquences réparties en 100 VIH-1/O (73 de sous-groupe H et 27 de sous-groupe T), 9 VIH-1/N et 2 VIH-1/P (Figure 13).

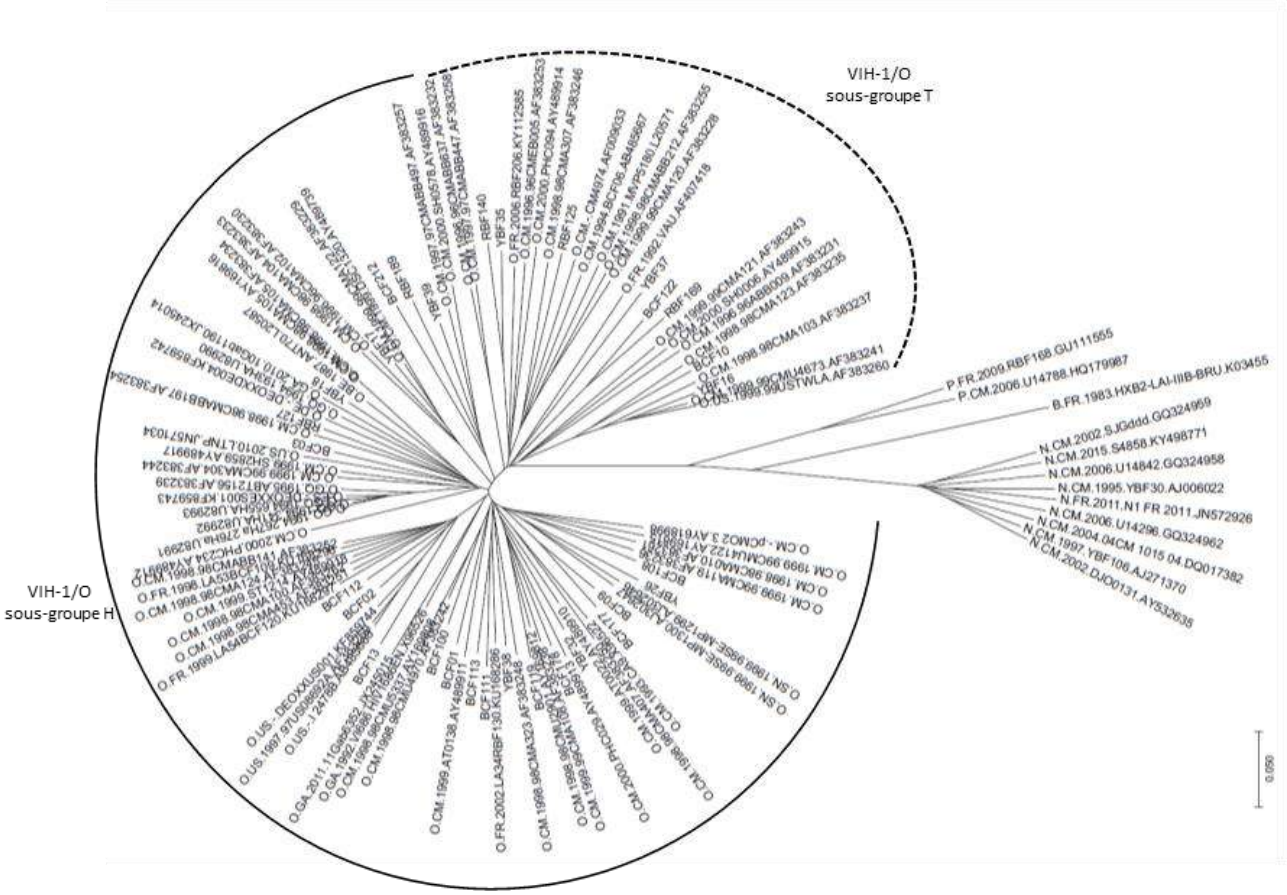


Figure 13. Arbre phylogénétique des 111 séquences de gp120 (2577pb) de VIH-1 non-M **et de la séquence de référence VIH-1/M BRU-HXB2.**

2.2. Analyse de la sensibilité naturelle aux INI et au fostemsavir

2.2.1. Sensibilité phénotypique aux INI

La sensibilité phénotypique a été évaluée par la croissance virale sur CMSP, issue d'un inoculum de surnageant standardisé à 100 TCID50, en présence d'une gamme de concentrations croissantes d'INI. Les molécules antirétrovirales ont été fournies par le laboratoire de virologie de l'hôpital Bichat/Claude-Bernard, sous forme de dilutions mères à 200 000 nM pour le dolutegravir (DTG, ViiV Healthcare, Brentford, Royaume-Uni) et l'elvitegravir (EVG, Gilead Sciences, Foster City, Californie) et 220 000 nM pour le raltegravir (RAL, Merck & Co, Kenilworth, New Jersey), conservées à -80°C. Cinq points de dilution de raison 10 ont été nécessaires à la préparation des gammes de

concentrations à testées en milieu RPMI (Lonza) : 0.2 ; 2 ; 20 ; 200 ; 2 000 nM pour DTG et EVG et 0.22 ; 2.2 ; 22 ; 220 ; 2 200 nM pour RAL.

Le test était basé sur une étape préliminaire d'infection, obtenue par la mise en contact d'un surnageant non dilué et de 2 dilutions (1/10 et 1/100) et 6 millions de CMSP saines stimulées 3 jours en PHA, pendant 2h en tube conique de 50 mL, à 37°C sous 5% de CO_2. Les cellules infectées étaient ensuite lavées, réparties en plaque 96 puits à une concentration de $2x10^6$ cellules/mL et mises en contact avec les dilutions des ARV à tester dans un rapport 1:1, soit 100 µL de suspension cellulaire et 100 µL de dilution d'ARV, réalisant une dilution finale au ½, des gammes de concentrations d'INI (Figure 14 lignes BC). Chaque niveau de concentration d'ARV, noté par ordre croissant de C1 à C5, était testé de façon indépendante dans 4 puits distincts. Les cellules infectées issues des surnageants dilués à 1/10 et 1/100 (ligne D) étaient utilisées pour la standardisation du niveau d'infectiosité et de réplication des virus testés et un témoin négatif (ligne D) non infecté servait à contrôler la qualité des CMSP lors de la culture. Un contrôle de mortalité cellulaire était aussi réalisé par la mise en contact des dilutions de drogue sur des cellules non infectées dans les mêmes conditions (ligne E). Une fois les dépôts réalisés, la plaque était alors incubée 3 jours à 37°C, sous 5% de CO_2.

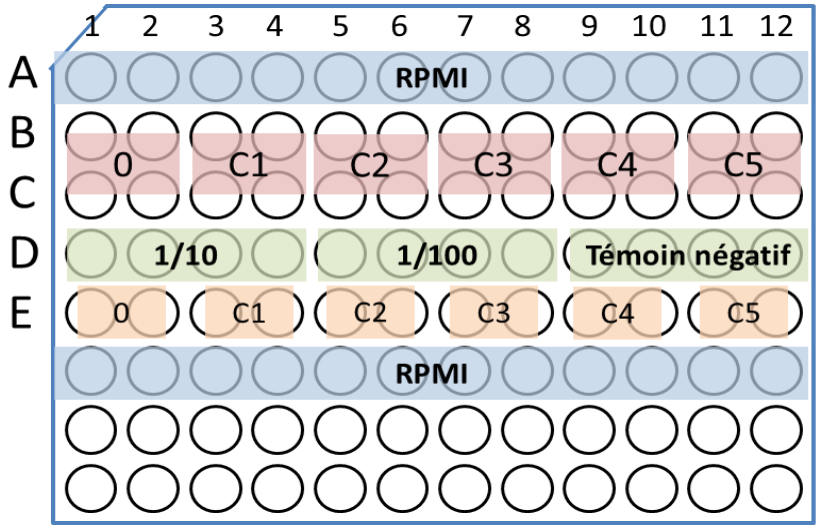


Figure 14. Schéma des dépôts réalisés en plaque 96 puits lors du test phénotypique.
Ligne BC : CMSP infectées mis en contact avec les concentrations croissantes de drogues
Ligne D : CMSP infectées par des dilutions de SN (1/10 et 1/100) et par du RPMI (témoin négatif)
Ligne E : CMSP non infectées mises en contact avec les concentrations croissantes de drogues

En fin d'incubation, la révélation de la croissance virale était réalisée par quantification du génome viral. L'extraction a été réalisée à partir de 100 µl de surnageant, sur une prise d'essai finale de 1 mL diluée en PBS, avec le coffret MagNA

Pure LC total Nucleic Acid Isolation Large Volume (Roche®, Meylan, France). L'amplification par RT-PCR quantitative en temps réel a été adaptée à la nature du virus : technique CNR ciblant l'intégrase pour les VIH-1/O [152], technique CNR ciblant le LTR, pour le VIH-1/P [151], et le kit Generic HIV viral load (Biocentric, Bandol, France) pour les VIH-1/N et VIH-1/M [236].

Pour valider la standardisation du titre infectieux de chaque souche testée à 100 TCID50, les puits dédiés devaient vérifier les critères suivants : 4 puits positifs pour le surnageant pur, au moins 3 puits positifs pour le surnageant à 1/10 et moins de 2 puits positifs pour le surnageant à 1/100 ; la positivité d'un puits était arbitrairement définie comme un titre de CV compris entre 7 et 8 Log cp/mL pour le surnageant pur. Une différence d'au moins 1 Log était attendue entre chaque dilution. En cas de défaut de validation, la prise d'essai ou le temps d'incubation des cultures étaient réévalués, de manière à fournir les critères de validation attendus. La mortalité cellulaire était évaluée par comptage en cellules de Kova après coloration au bleu trypan pour vérifier que les ARV n'avaient pas d'effet toxique propre sur les cellules, en l'absence d'infection. Les conditions de validation du test étaient une mortalité cellulaire <20% pour chaque dilution d'ARV testée.

La croissance virale en présence des ARV était révélée à partir du pool issu des 4 réplicats de chaque dilution. La courbe « dose-inhibition » a été obtenue avec les résultats de CV des surnageants à 3 jours de culture, pour chaque point de la gamme de dilution de la drogue. Le maximum de réplication virale (100%) était défini par la valeur de quantification du point sans drogue (0 nM), et le point d'inflexion de la courbe (CI50) correspondait à la quantité d'ARV nécessaire à obtenir 50% de réduction du niveau de quantification sans drogue. Les résultats de CI50 qui présentaient des valeurs extrêmes étaient vérifiés de manière indépendante lors d'un second essai.

Pour chaque souche, les résultats analysés étaient la valeur de CI50 (en nM) et le *Fold Change* (FC) correspondant au ratio de la CI50 de la souche testée par rapport à celle de la souche de référence. Les FC ont été analysés au seuil de 1 et interprétés par rapport au seuil de 2.5, classiquement retrouvé dans la littérature pour définir une différence de sensibilité [237,238]. Les moyennes de CI50 ont été comparées par molécule, en fonction du groupe (O, N et P). Une comparaison entre les sous-groupes (H et T) des VIH-1/O, a été réalisée par l'application d'un test exact de Fisher et pour un seuil de significativité $p<0.05$. Les graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPadPrism (San Diego, Californie).

2.2.2. Sensibilité génotypique aux INI et au fostemsavir

2.2.2.1. Sensibilité aux INI

L'étude de la sensibilité génotypique aux INI a été réalisée sur les séquences des 39 isolats cliniques au moment de l'infection (J0) du test phénotypique. Elle a consisté à rechercher la présence naturelle de mutations associées à la résistance (MAR). La liste des MAR (Tableau 5) a été définie sur la base des principaux algorithmes d'interprétation de la résistance (ANRS, REGA, Stanford), de la liste des mutations de résistance éditée par l'IAS et des MAR aux INI citées par les articles décrivant le polymorphisme de l'intégrase des variants divergents VIH-1/O [25,239] et VIH-2 [240].

Pour rechercher un éventuel déterminant génotypique corrélé aux niveaux de sensibilité phénotypique, nous avons analysé toutes les positions des séquences de l'intégrase avec le logiciel d'analyse VESPA (*Viral Epidemiology Signature Pattern*) https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/VESPA/vespa.html. Ce logiciel permet de détecter les motifs signatures d'un ensemble de séquences cibles, selon leur niveau de fréquence par rapport à un ensemble équilibré utilisé comme groupe comparateur. Dans notre étude, les ensembles ont été définis sur la base du résultat de FC de chaque souche, et selon les catégories arbitraires suivantes, représentatives des réalités phénotypiques observées sur le panel : $FC \leq 2.5$; $2.5 < FC < 10$; $FC \geq 10$.

2.2.2.2. Sensibilité au fostemsavir

L'étude de la sensibilité génotypique au fostemsavir a consisté à rechercher, parmi les 111 séquences de VIH-1 non-M, la présence naturelle des mutations décrites comme associées à la résistance dans la littérature. Ont été considérées les MAR suivantes : L116P, A204D, S375H/M, M426L, M434I, M475I et V506M [241].

Tableau 5. Liste des mutations de résistance aux INI prises en compte dans l'analyse de sensibilité génotypique aux INI.

	ANRS*	IAS[¶]	Stanford[§]	Rega[■]	*VIH-1/O*[$]	*VIH-2*[#]
A49	G					
M50					T	
H51			Y	Y	Y	Y
V54			I			
T66	A/I/K	A/I/K	A/I/K	A/I/K	I/M	I/M
L68			V			
V72					I	I
L74	I/M	M	I/M	M	I/M/A	I/M/A
E92	Q	Q/G	Q	Q/G	Q/G	Q
Q95			K			
T97	A	A	A	A	A	A
K111					T	
T112					I	I
H114			Y	Y		
G118	R		R	R		
S119					G	
F121	Y	Y	Y	Y	Y	Y
T124				A	N	
T125					K	K
A128			T		T	T
E138	A/K/T	A/K	A/K/T	A/K	A/K	A/K
G140	A/S	A/S	A/S/C	A/S/C	A/S	A/S
Y143	R/C/H/S/G/A	R/C/H	R/C/H	R/C/H	R/C	R/C
P145	S		S	S		
Q146			P	K/P/R/I/L	K	K
S147	G	G	G	G	G	G
Q148	E/G/H/K/R	H/K/R	H/K/R/N	H/K/R	H/R/K	H/K/R/E
V151	L		I/L/A	I	I	I
S153	Y/F		Y/F	Y/F	Y/A	Y/A
M154					I	I
N155	H/S/T	H	H	H/S/T	S/H	S/H
K156				N	N	N
E157	Q		Q			Q
K160					D	D
G163			R/K	K/R	R	R
V165					I	I
S195					C	
V201					I	I
I203					M	M
T206				S	S	S
S230	G/R		R	N		R/N
D232				N		
V249						I
R263	K	K	K	K		K

La position 280 n'a pas été analysée.

*ANRS 2016 http://www.hivfrenchresistance.org/ ;

[¶]IAS-USA 2017 update list https://www.iasusa.org/ ;

[§]Stanford v8.1.1 http://hivdb.stanford.edu en rouge les mutations majeures primaires, en noir les mutations majeures accessoires, en bleu les mutations primaires rares et en vert les mutations diverses ;

[■]Rega v.9.1.0 http://rega.kueleuven.be/cev/avd/software/rega-algorithm ;

[$] [25,239] ; [#] [240] ; (pages internet consultées en mai 2017)

3. Résultats

3.1. Sensibilité naturelle des VIH-1 non-M aux INI

3.1.1. Sensibilité phénotypique

Les détails des résultats obtenus pour les 39 isolats cliniques sont présentés dans le Tableau 6 ci-après.

Tableau 6. Résultats de CI50 et FC par ordre alphabétique d'isolat pour RAL, DTG et EVG.

		RAL		DTG		EVG	
		CI50 (nM)	FC	CI50 (nM)	FC	CI50 (nM)	FC
BRU-HXB2	VIH-1/M	1,68		2,09		0,20	
BCF001	VIH-1/O-H	0,009	0,005	3,893	**1,860**	0,022	0,109
BCF002	VIH-1/O-H	0,003	0,002	0,867	0,414	<0,0001	<0,0001
BCF003	VIH-1/O-H	0,038	0,023	2,190	**1,047**	0,757	**3,781**
BCF005	VIH-1/O-T	1,319	0,786	0,629	0,301	0,943	**4,712**
BCF006	VIH-1/O-T	0,742	0,442	1,882	0,899	1,997	**9,979**
BCF008	VIH-1/O-H	0,024	0,014	0,089	0,042	1,459	**7,291**
BCF009	VIH-1/O-H	0,553	0,329	0,672	0,321	0,883	**4,410**
BCF010	VIH-1/O-T	2,348	**1,399**	0,105	0,050	0,432	**2,159**
BCF011	VIH-1/O-T	0,664	0,396	0,058	0,028	2,611	**13,043**
BCF013	VIH-1/O-H	1,309	0,780	3,120	**1,491**	0,742	**3,709**
BCF057	VIH-1/O-T	3,222	**1,919**	0,253	0,121	0,135	0,672
BCF100	VIH-1/O-H	0,528	0,315	2,147	**1,026**	0,001	0,003
BCF101	VIH-1/O-H	2,736	**1,630**	2,729	**1,304**	1,653	**8,257**
BCF108	VIH-1/O-H	0,239	0,142	0,195	0,093	0,017	0,084
BCF109	VIH-1/O-H	0,320	0,191	0,005	0,003	0,809	**4,044**
BCF111	VIH-1/O-H	2,827	**1,684**	1,543	0,737	2,089	**10,438**
BCF112	VIH-1/O-H	1,793	**1,068**	0,675	0,322	0,028	0,141
BCF113	VIH-1/O-H	0,010	0,006	0,170	0,081	2,881	**14,394**
BCF120	VIH-1/O-H	3,822	**2,277**	0,018	0,009	0,068	0,340
BCF177	VIH-1/O-H	0,812	0,484	0,888	0,424	0,515	**2,570**
BCF178	VIH-1/O-H	0,019	0,011	0,036	0,017	0,040	0,200
BCF183	VIH-1/O-H	0,027	0,016	<0,0001	<0,0001	0,059	0,295
MVP5180	VIH-1/O-T	0,654	0,390	0,184	0,088	0,134	0,672
N1.FR.2011	VIH-1/N	0,589	0,351	<0,0001	<0,0001	0,004	0,019
RBF125	VIH-1/O-T	0,774	0,461	0,007	0,004	<0,0001	<0,0001
RBF130	VIH-1/O-H	0,260	0,155	0,988	0,472	0,115	0,573
RBF168	VIH-1/P	0,978	0,583	0,041	0,020	1,137	**5,678**
RBF189	VIH-1/O-H	0,011	0,007	<0,0001	<0,0001	0,081	0,405
RBF206	VIH-1/O-T	0,021	0,013	<0,0001	<0,0001	0,478	**2,388**
YBF16	VIH-1/O-T	0,057	0,034	0,204	0,097	0,160	0,798
YBF17	VIH-1/O-H	0,352	0,209	1,861	0,889	1,147	**5,729**
YBF18	VIH-1/O-H	0,323	0,192	0,418	0,200	<0,0001	<0,0001
YBF26	VIH-1/O-H	0,488	0,291	0,853	0,408	0,632	**3,159**
YBF30	VIH-1/N	0,286	0,170	<0,0001	<0,0001	0,174	0,867
YBF32	VIH-1/O-H	0,007	0,004	0,085	0,041	0,093	0,466
YBF35	VIH-1/O-T	2,284	**1,361**	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,001
YBF37	VIH-1/O-T	1,055	0,629	<0,0001	<0,0001	2,114	**10,560**
YBF38	VIH-1/O-H	0,151	0,090	0,341	0,163	3,540	**17,684**
YBF39	VIH-1/O-H	1,271	0,757	0,938	0,448	1,225	**6,122**

Les FC>1 sont mentionnés en gras

La CI50 au RAL de la souche de référence de groupe M, BRU-HXB2, était de 1.68 nM (Figure 15). Concernant les échantillons non-M, les CI50 de la souche RBF168 (VIH-1/P) était de 0.98 nM, et de 0.44 nM en moyenne pour les 2 surnageants de groupe N (0.59 et 0.29 nM respectivement pour N1.FR2011 et YBF30). La moyenne et la médiane des 36 CI50 des VIH-1/O étaient de 0.86 et 0.51 nM respectivement, avec des valeurs extrêmes comprises entre 0.003 nM (BCF002) et 3.82 nM (BCF120). On notait une moyenne des CI50 légèrement supérieure pour les souches de sous-groupe T à 1.19 nM, par rapport au sous-groupe H, dont la moyenne était à 0.72 nM, sans que cette différence ne soit significative (p=0.2). Aucune des souches ne présentaient un FC>2.5. Le FC moyen observé pour les VIH-1/O était de 0.51, avec une médiane à 0.3 et un FC maximal à 2.28 ; et 7 échantillons (18%) présentaient un FC compris entre 1.07 et 2.28. Les FC obtenus pour les VIH-1/N et P étaient également sous le seuil de 2.5.

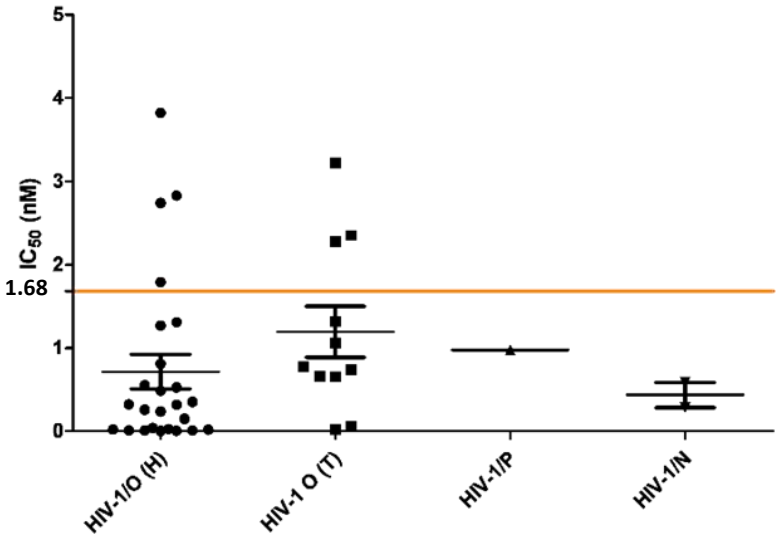


Figure 15. CI50 des VIH-1 non-M obtenues avec RAL.

Les valeurs de CI50 de chaque échantillon sont représentées symboliquement par un cercle pour les VIH-1/O de sous-groupe H, un carré pour les souches de sous-groupe T, un triangle pour le VIH-1/P et un triangle inversé pour les VIH-1/N. Les lignes noires horizontales représentent la moyenne des CI50 du groupe d'échantillons et l'intervalle d'erreur standard autour de la moyenne. La valeur de la CI50 de la souche de référence BRU-HXB2 est représentée par une ligne orange horizontale.

Pour le DTG, l'échantillon de groupe P présentait une CI50 à 0.041 nM, 50 fois plus faible que celle de la souche de référence (2.09 nM) (Figure 16). On observait pour les deux échantillons de groupe N une chute de la réplication virale de l'ordre de 80% d'inhibition entre les points sans drogue et 0.1 nM, plus faible concentration testée. Certains échantillons de groupe O, indifféremment de sous-groupe H (RBF189) et T (YBF35), empruntaient la même tendance. La moyenne et la médiane de CI50 des VIH-1/O étaient 0.78 et 0.30 nM respectivement, pour des valeurs comprises dans l'intervalle <0.0001nM à 3.89 nM. La différence de CI50 moyenne était supérieure pour le sous-groupe H (0.99 nM) par comparaison au sous-groupe T (0.30 nM), inversement à ce qui était observé précédemment avec le raltegravir (p = 0.05). En termes de FC, les valeurs moyenne et médiane obtenues pour les VIH-1/O étaient respectivement de 0.37 et 0.14, avec 5 souches (13%) dont le FC était compris dans l'intervalle [1.03 (BCF100) – 1.86 (BCF001)], 4 d'entre elles étant distinctes de celles à FC>1 avec RAL. Parallèlement au RAL, aucune souche n'avait de FC>2.5.

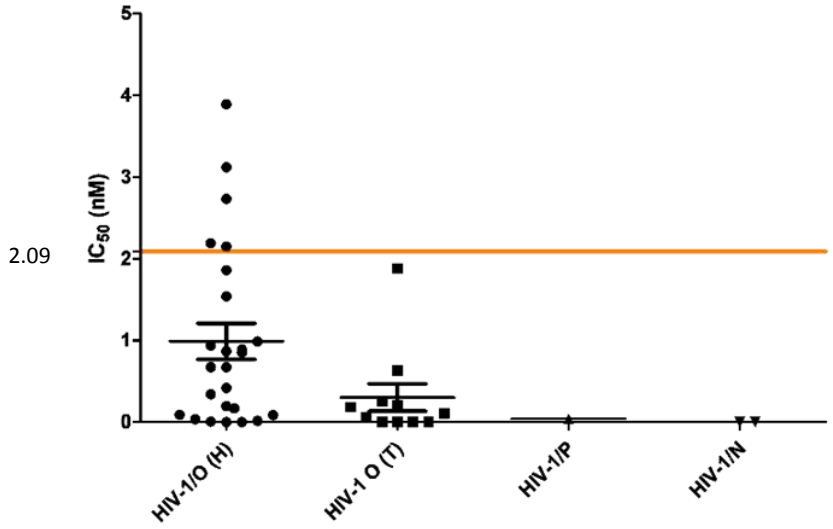


Figure 16. CI50 des VIH-1 non-M obtenues avec DTG.

Les valeurs de CI50 de chaque échantillon sont représentées symboliquement par un cercle pour les VIH-1/O de sous-groupe H, un carré pour les souches de sous-groupe T, un triangle pour le VIH-1/P et un triangle inversé pour les VIH-1/N. Les lignes noires horizontales représentent la moyenne des CI50 du groupe d'échantillons et l'intervalle d'erreur standard autour de la moyenne. La valeur de la CI50 de la souche de référence BRU-HXB2 est représentée par une ligne orange horizontale.

La CI50 de BRU-HXB2 à EVG était de 0.2 nM dans notre étude. Les CI50 des échantillons VIH-1/N étaient inférieures à la CI50 de la souche de référence de groupe M, 0.0037 et 0.17 nM pour N1.FR.2011 et YBF30 respectivement (Figure 17). La souche VIH-1/P, RBF168 présentait à l'inverse une CI50 à 1.14 nM, à plus de 5 fois la référence (FC=5.68). La CI50 moyenne des VIH-1/O était à 0.77nM, la CI50 médiane à 0.46 nM. avec un maximum à 3.54 nM (YBF38). Alors que la répartition des valeurs de CI50 obtenus pour EVG, qui semblent proches de ce qui était observé avec RAL et DTG, les valeurs de FC étaient hétérogènes. En effet, 20 échantillons (52%) présentaient un FC>1 dont 17 (44%), 4 de sous-groupe T et 13 de sous-groupe H, étaient au-dessus de la valeur seuil de 2.5. La moyenne des FC>2.5 était de 7.53, pour un intervalle compris entre 2.57 et 17.68.

Parmi les 6 souches avec des valeurs de FC ≥ 10 pour EVG, seule la souche BCF101 présentait aussi un FC>1 pour les 2 autres drogues (DTG et RAL) et quatre avaient un FC>1 pour au moins une drogue : RAL pour BCF111 et BCF010 ou DTG pour BCF003 et BCF013 (Tableau 6).

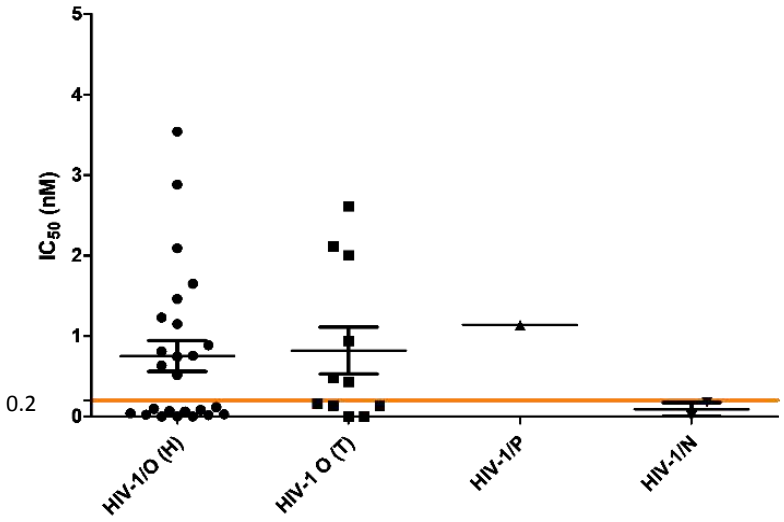


Figure 17. CI50 des VIH-1 non-M obtenues avec EVG.

Les valeurs de CI50 de chaque échantillon sont représentées symboliquement par un cercle pour les VIH-1/O de sous-groupe H, un carré pour les souches de sous-groupe T, un triangle pour le VIH-1/P et un triangle inversé pour les VIH-1/N. Les lignes noires horizontales représentent la moyenne des CI50 du groupe d'échantillons et l'intervalle d'erreur standard autour de la moyenne. La valeur de la CI50 de la souche de référence BRU-HXB2 est représentée par une ligne orange horizontale.

3.1.2. Sensibilité génotypique

Afin d'étudier le polymorphisme naturel des VIH-1 non-M, nous avons recherché les MAR de la liste des 44 mutations considérés pour ce travail, dans les 39 séquences des isolats testés phénotypiquement (Annexe 3). L'analyse a montré un important polymorphisme des séquences VIH-1/O avec 19 positions (41%) concernées par des mutations (Tableau 7). L'ensemble des souches présentaient notamment 5 MAR (L74I, T124A, S153A, V201I et T206S) retrouvées à des fréquences supérieures à 94% et des MAR moins prévalentes (<50%): M50T, L68V, V72I, T97A, T112I, I203M. D'autres mutations atypiques, correspondant à des résidus non décrits sur des positions associées à la résistance, ont été recensées à fréquence élevée (>89% pour S119P, K160S, G163Q, S195T).

A l'inverse, le polymorphisme des séquences de groupe N et P semblait moins important sur cette région avec seulement 11 positions (25%) associées à la résistance concernées par des mutations (Tableau 7). La mutation de résistance V165I était uniquement retrouvée dans les séquences des VIH-1/N.

Bien que présentant un polymorphisme différent, les 3 groupes partageaient des MAR : V72I, T124A et V201I et des mutations atypiques : T112V, S119P et S195T. Le domaine catalytique DDE de l'enzyme, siège de l'activité catalytique, était quant à lui, très conservé pour l'ensemble des VIH-1 non-M.

Selon les algorithmes (ANRS, REGA, Stanford), les polymorphismes majoritairement retrouvés n'avaient pas d'impact sur la résistance génotypique aux INI. Seules quelques souches présentaient ponctuellement une mutation conférant à elles seules, une résistance. Ainsi, une souche (YBF37) présentait la MAR T97A, conduisant à une résistance au RAL et à EVG. Retrouvée chez 7 souches, la L68V a été décrite comme une mutation accessoire par l'algorithme de Stanford. Enfin les mutations T124A et T206S, plus fréquemment retrouvées sur l'ensemble du panel (>94%) rendaient un score faible par l'algorithme de Rega pour DTG et RAL respectivement.

Tableau 7. Fréquence des mutations retrouvées aux positions associées à la résistance aux INI parmi les 39 isolats VIH-1 non-M.

Mutations	Résidu observé (Fréquence %)		
	VIH-1/O	VIH-1/N	VIH-1/P
A49G	P (6)		
M50T	T (14) I (47) R (3)		
H51Y			
V54I			
T66A/I/K/M			
L68V	V (19) A (6) I (3) T (8)		T
V72I	I (42) IV (3)	I (50)	I
L74I/M/A	**I** (100)	I (50)	
E92Q/G/V			
Q95K			
T97A	A (3)		
K111T			
T112I	I (33) IV (3) V (64)	V (100)	V
H114Y			
G118R			
S119G	P (89) T (6) PT (3)	P (50)	P
F121Y			
T124A/N	**A** (94) AT (3)	A (100)	A
T125K	A (28) S (3)		A
A128T			
E138A/K/T			
G140A/S/C	EG (3)		
Y143R/C/H/K/S/G/A			
P145S			
Q146K/P/R/I/L			
S147G			
Q148E/G/H/K/R			
V151L/A/I			
S153Y/F/A	**A** (100)		
M154I			
N155H/S/T			
K156N			
E157Q			
K160D	S (97) A (3)		
G163R/K	Q (97) E (3)		L
V165I		I (100)	
S195C	T (100)	T (100)	T
V201I	**I** (97) L (3)	I (100)	I
I203M	M (3) T (3)		
T206S	**S** (97)		
S230G/R/N			
D232N			
V249I			
R263K			

En gras, sont représentés les MAR dont la fréquence est >50% chez les VIH-1/O.

3.1.3. Recherche de déterminants génotypiques liés aux niveaux de sensibilité phénotypique

Au vu de l'hétérogénéité des résultats de FC de l'EVG, nous avons recherché un lien éventuel entre la présence de mutation et le niveau de FC. Trois catégories de sensibilités phénotypiques ont été distinguées: les souches de FC≥10; les souches de 2.5<FC<10 et les souches de FC≤2.5 (Tableau 8).

Tableau 8. Nombre de souches présentant des mutations aux positions associées à la résistance selon leur niveau de FC et fréquence (en % par rapport à l'ensemble du panel N=39).

	Position associée à la résistance et nature du résidu muté																						
	49		**50**			**68**				**72**		**74**	**97**	**112**			**119**				**124**		
	G	P	**T**	I	R	**V**	A	T	I	**I**	IV*	**I**	**A**	**I**	IV*	V	**G**	P	PT*	T	**N**	**A**	AT*
FC≥10 (N=6)			1	3					1	4		6	1	2		4		4	1	1		6	
2.5<FC<10 (N=12)			2	6	1	3	1	3		3		11		5		7		12				12	
FC≤2.5 (N=21)		2	2	8		4	1	1		10	1	20		5	1	15		18		1		19	1
Fréquences (%)	0	5	13	44	3	18	5	10	3	44	3	95	3	31	3	67	0	87	3	5	0	95	3

	125			**140**		**153**		**160**			**163**				**165**	**195**		**201**		**203**		**206**
	K	A	S	**A/S/C**	EG*	**Y/F**	**A**	**D**	S	A	**R/K**	Q	L	E	**I**	**C**	T	**I**	L	**M**	T	**S**
FC≥10 (N=6)		2					6		6			6					6	6				6
2.5<FC<10 (N=12)		4					11		10	1		10	1	1			12	12			1	11
FC≤ 2.5 (N=21)		5	1		1		19		19			19			2		21	20	1	1		18
Fréquences (%)	0	28	3	0	3	0	92	0	90	3	0	90	3	3	5	0	100	97	3	3	3	90

En gras sont représentées les MAR (par opposition aux résidus atypiques, non en gras), *Résidus mixtes.

Dans le groupe FC≥10, parmi les 15 positions associées à la résistance, 9 présentaient des MAR (M50T, V72I, L74I, T97A, T112I, T124A, S153A, V201I, V206S), mais celles-ci pouvaient aussi être retrouvées dans les 2 autres catégories de FC, à l'exception de la T97A présente ponctuellement sur la souche YBF37. Plusieurs mutations atypiques (M50R, K160A, G163L/E, I203T) étaient uniquement présentes parmi les souches de la catégorie 2.5<FC<10, mais pas pour toutes les souches de cette catégorie. L'analyse sur les positions de résistance considérées dans les différents algorithmes n'a pas permis de mettre en évidence de déterminant génétique associé aux différences de sensibilité à EVG. Nous avons alors analysé l'ensemble de la séquence de l'intégrase.

L'analyse de toutes les positions a été réalisée par le logiciel en ligne VESPA, selon différentes catégories de FC (Tableau 9). La comparaison des séquences cibles par rapport au groupe comparateur, a fait ressortir un ensemble de 4 mutations (V72I, I200L, N222K et R224Q) présentes uniquement dans la catégorie FC≥10. En effet, elles n'étaient pas retrouvées pour la catégorie 2.5<FC<10.

Tableau 9. Résultats de l'analyse VESPA en fonction des catégories de FC des souches à l'EVG.

Séquences cibles	Comparateur	**M50**	L63	**V72**	K173	I200	N222	R224
2.5=<FC<10 EVG	FC<2.5	I	I		R			
FC>=10 EVG	FC<2.5 EVG	I		I		L	K	Q
FC>=10 EVG	2.5=<FC<10 EVG		M	I	K	L	K	Q
FC>=10 EVG	FC<10 EVG	I	M	I		L	K	Q

En gras, sont représentées les positions décrites comme associées à la résistance.

3.2. Sensibilité génotypique des VIH-1 non-M au fostemsavir

L'analyse des 111 séquences en acides aminés de VIH-1 non-M, sur les 7 positions prises en compte (116, 204, 375, 426, 434, 475 et 506) a montré que les résidus aux positions 116, 204 et 475, étaient majoritairement identiques à ceux de la souche de référence de groupe M BRU-HXB2. En effet, les résidus 116L, 204A, 475M étaient retrouvées pour 100% des VIH-1/P ; 100%, 88.9%, 100% respectivement pour les VIH-1/N (Figure 18) et 94%, 96%, 100% respectivement pour les VIH-1/O (Figure 19). Les mutations atypiques présentes à ces positions (L116F/I/S, A204S/T) étaient exprimées à une fréquence faible (<4%) et principalement chez les VIH-1/O.

La fréquence des MAR était différente selon la nature des variants. Les 2 séquences de VIH-1/P possédaient naturellement la MAR S375H et des mutations atypiques aux autres positions : M426S, M434L et V506I (Figure 18). Les 9 séquences (100%) de VIH-1/N présentaient le profil de MAR suivant : S375M + M426L + M434I, conduisant alors à une résistance génotypique naturelle de l'ensemble du groupe au fostemsavir.

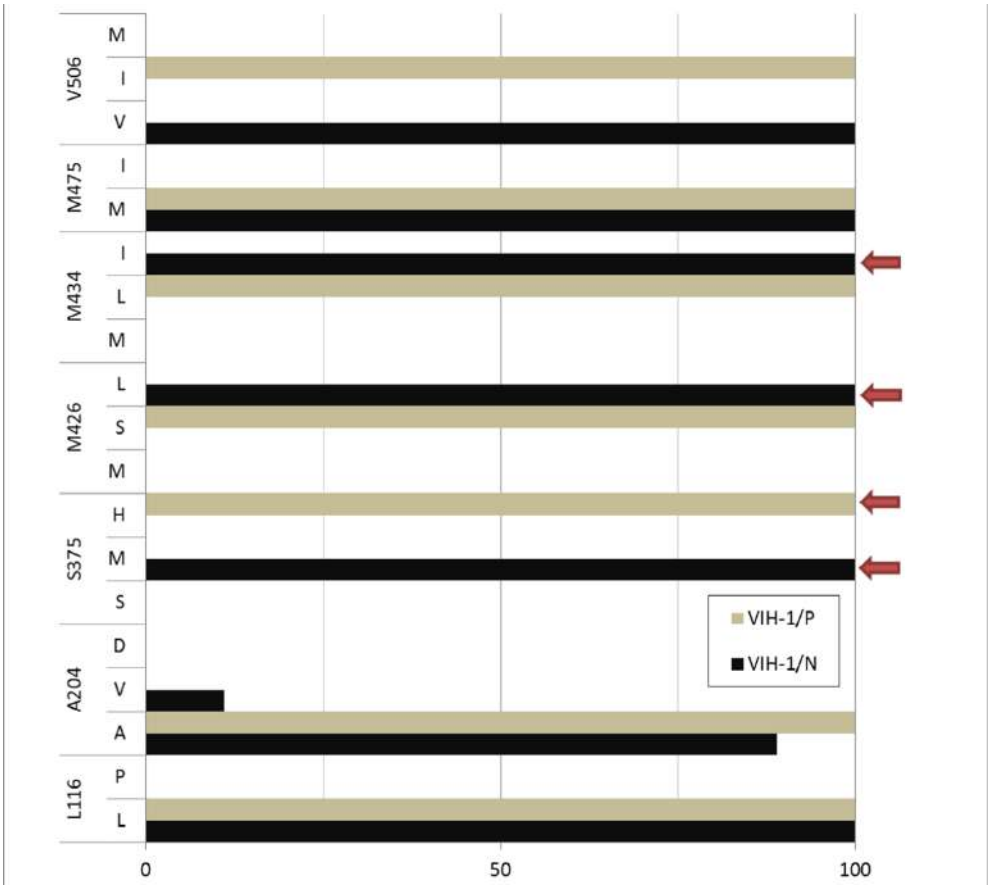


Figure 18. Fréquence (%) et nature des résidus retrouvés pour les VIH-1/N et P, sur les positions associées à la résistance des VIH-1/M au fostemsavir.
Les résidus naturel et associé à la résistance sont représentés pour chaque position, en premier et en dernier, respectivement. Les flèches rouges symbolisent la présence d'une MAR.

Le nombre important de séquences de VIH-1/O (N=100) a permis de montrer des profils mutationnels différents : les MAR S375H, M426L et M434I étaient respectivement présentes à 95%, 1% et 10% des séquences (Figure 19). Pour chacune de ces mutations, la proportion respective de chaque sous-groupe était globalement de 1/3 de séquences de sous-groupe T pour 2/3 issues du sous-groupe H, correspondant grossièrement à la répartition des sous-groupes dans notre panel. Les mutations atypiques M426S, M434L et V506I étaient très fréquemment retrouvées (respectivement à 90%, 87% et 97%). Ainsi, le profil de mutations naturelles prédominant des VIH-1/O était le suivant : 116L+204A+375H+426S+434L+475M+506I. Il ne semblait pas lié à un sous-groupe particulier dans la mesure où il était exprimé indifféremment par les souches H (N=50 ; 75%) ou T (N=17; 25%).

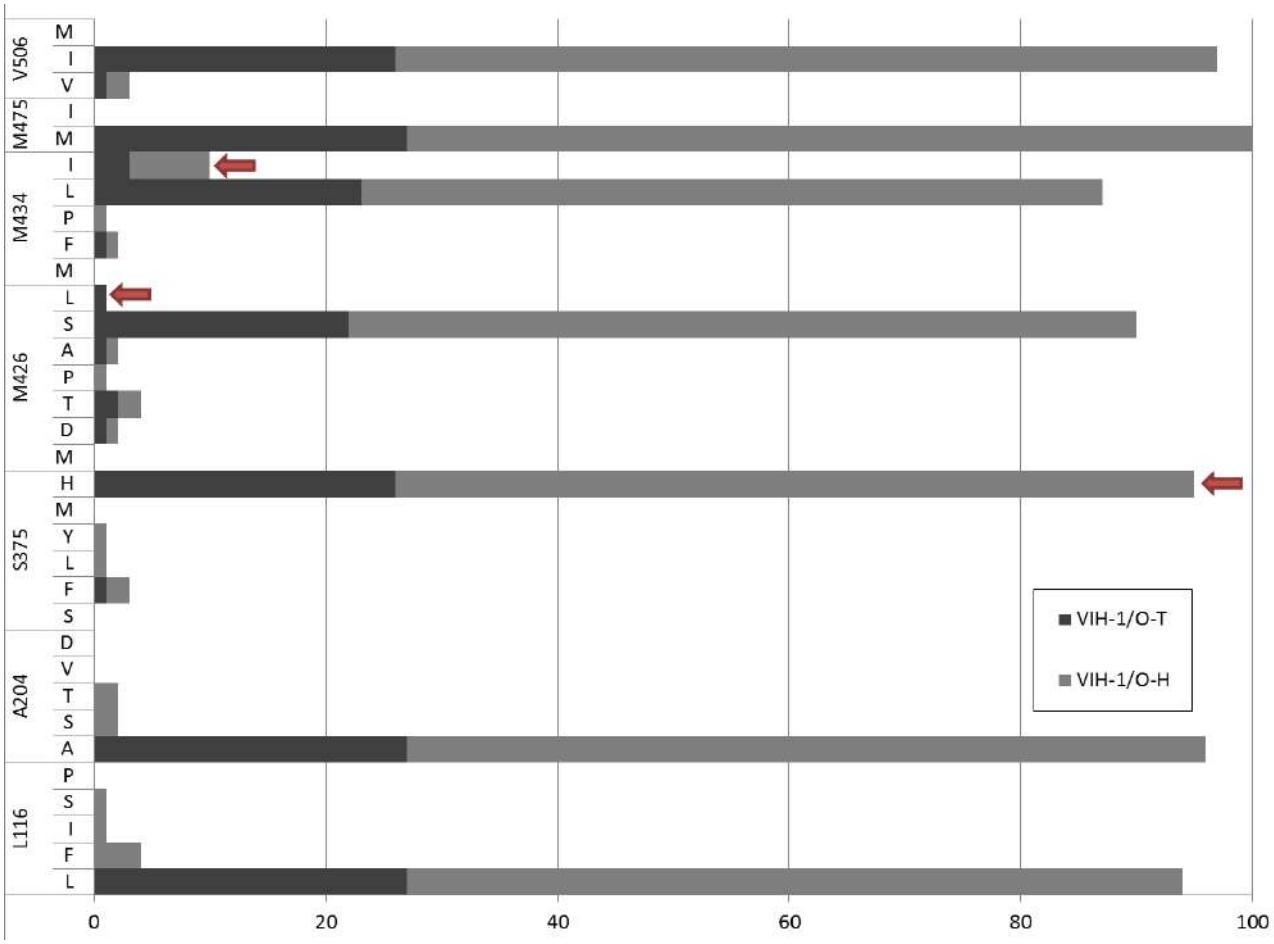


Figure 19. Fréquences (%) et nature des résidus des VIH-1/O selon le sous-groupe H ou T, sur les positions à la résistance des VIH-1/M au fostemsavir.
Les résidus naturel et associé à la résistance sont représentés pour chaque position, en premier et en dernier, respectivement. Les flèches rouges symbolisent la présence d'une MAR.

4. Discussion

Dans les étapes précoces du développement de nouvelles molécules, les études de sensibilité sont systématiquement réalisées sur des panels de souches de laboratoire et d'isolats cliniques représentatifs de la diversité génétique des VIH. La faible représentativité des virus non-M dans ces études -généralement une à deux souches de VIH-1/O et dont l'affiliation phylogénétique aux sous-groupes H ou T n'est généralement pas connue- ne permet qu'un aperçu grossier de la réponse des variants divergents aux nouveaux ARV. Notre démarche était donc fondée sur l'évaluation du plus large panel actuel d'isolats cliniques de VIH-1 non-M, incluant notamment des souches des groupes rares N et P.

Dans les précédentes études sur la sensibilité phénotypique aux INI des VIH-1 divergents, le nombre très limité (N=3) de souches testées, uniquement VIH-1/O [225], ne permettait pas une comparaison appropriée des CI50 entre les 3 molécules. Les résultats de notre étude sur un large panel d'isolats cliniques ont tout d'abord montré que, malgré des intervalles de CI50 identiques pour les 3 molécules, il existait une distribution différente des valeurs de FC des VIH-1 non-M en fonction des INI et de la nature du sous-groupe (H ou T) pour les VIH-1/O. Les valeurs de FC obtenues avec RAL et DTG étaient relativement homogènes, par rapport à la distribution hétérogène des FC observée pour EVG. En effet, l'ensemble du panel présentait des valeurs de FC<2.5 pour RAL et DTG alors que 44% du panel avait un FC>2.5 avec EVG.

Ce résultat était associé à une valeur de CI50 de la souche de référence BRU-HXB2 10 fois plus basse pour EVG (0.2 nM), que pour les autres molécules (1.68 et 2.09 nM pour RAL et DTG respectivement). En conséquence, les hypothèses d'une hypersensibilité de notre souche de référence à EVG ou d'une « anomalie » lors de l'expérimentation pouvaient être évoquées. La comparaison de nos résultats de CI50 avec d'autres études est délicate du fait de la pluralité des méthodes phénotypiques et de l'absence de standardisation de ces tests, basés notamment sur l'utilisation de CMSP. On retrouve dans la littérature des méthodes aussi diverses que la transfection plasmidique d'un vecteur du VIH [242], l'utilisation de virus recombinant dans des essais MAGI (*multinuclear activation of galactosidase indicator*) [243], le test commercial Phenosense® [244], etc. Cependant, en prenant en compte les résultats issus d'une méthode strictement identique à la nôtre et utilisant la même souche de référence BRU-HXB2, nos valeurs de CI50 sont similaires à celle de la littérature, quelle que soit la molécule testée : 1.68 nM *vs* 2.17 nM pour RAL [245] ; 0.2 nM *vs* 0.4 nM pour EVG

[240] et 2.09 nM *vs* 1.86 nM pour DTG [245]. Ces observations valident donc nos résultats de FC, mais ne permettent pas d'exclure une éventuelle hypersensibilité spécifiquement liée à cette souche de référence. Les données des dossiers déposés aux instances de sécurisation du médicament (EMEA et FDA), indiquent des intervalles de CI50 pour l'EVG en concordance avec nos résultats, bien que la méthodologie ne soit pas connue et que les résultats aient été obtenus à partir de panels de souches de laboratoires EVG [0.02 – 1.7 nM], ou d'isolats cliniques EVG [0.1 – 1.3 nM]. Il n'y aurait donc pas de biais lié au choix de notre souche de référence. De plus nos résultats sont similaires à ceux de Tebit *et al*. qui ont récemment comparé la sensibilité à EVG et RAL de 19 VIH-1/O à 9 souches de VIH-1/M [156]. La méthodologie était certes très différente de la nôtre, mais la valeur moyenne de CI50 du panel de VIH-1/M, à 0.14 nM, était proche de de la nôtre (0.2 nM) obtenue avec une seule souche. De plus, les résultats obtenus montraient une sensibilité au RAL similaire entre les deux groupes de VIH, avec des CI50 moyennes de 40.1 ± 7.6 et 23.7 ± 3.8 nM pour les VIH-1/O et M respectivement, et une sensibilité à EVG variable avec une CI50 moyenne des VIH-1/O significativement 10 fois supérieure (1.57 nM) au panel de référence (0.14 nM). Une importante dispersion des CI50 des VIH-1/O étaient également observée pour cette molécule, avec des valeurs comprises dans l'intervalle [0.03 nM – 10 nM], plus étendu par rapport à celui obtenu pour les VIH-1/M [0.01 nM – 0.6 nM]. Ainsi, bien que non strictement superposables à nos valeurs, ces résultats confirment une sensibilité phénotypique des VIH-1 non-M différente vis-à-vis de EVG, seule molécule pour laquelle nous avons d'ailleurs observé des FC>10.

Notre analyse des séquences de l'IN a confirmé le polymorphisme naturel déjà décrit pour les VIH-1/O (L74I, T124A, S153A, V201I, T206) [25,214] mais a aussi permis de présenter pour la première fois des données sur celui des VIH-1/N et P. Bien que décrit à partir de 3 souches, le profil de mutations naturelles des VIH-1/P, dont l'origine simienne (VISgor) est proche des VIH-1/O, est plus proche du profil observé pour les VIH-1/N, qui trouvent pourtant leur origine dans les VIScpz [40]. De plus l'interprétation de ce polymorphisme, par les algorithmes prédictifs ne conduit pas à une résistance génétique aux INI. Les séquences des échantillons avec des FC>2.5 ont ensuite été étudiées pour rechercher une éventuelle association avec un déterminant génétique. Si l'analyse des MAR décrites pour les VIH-1/M n'a pas permis d'identifier de mutations systématiquement associées aux valeurs élevées de FC, l'analyse de toutes les positions de l'intégrase a montré un profil associant les mutations V72I (listée comme MAR),

I200L, N222K et R224Q, plus fréquemment retrouvé pour les souches exprimant un FC>10 avec EVG. Toutefois, les effectifs restreints des groupes de comparaison n'avaient pas la puissance statistique suffisante pour atteindre un seuil de significativité.

Notre travail a donc montré que les VIH-1 non-M étaient phénotypiquement sensibles au RAL et au DTG bien que quelques souches aient présenté des FC>1, mais toujours <2.5, seuil habituellement utilisé dans les études phénotypiques [212,238]. Ces résultats étaient corrélés à nos données de sensibilité génotypique, basée sur l'analyse des MAR décrites pour les VIH-1/M. Pour l'EVG, les résultats sont plus nuancés ; si des différences de sensibilité phénotypiques ont été observées, elles ne semblent pas corrélées directement au polymorphisme des positions de résistance. Il n'y aurait donc pas de corrélation entre FC élevé et les MAR décrites pour les VIH-1/M, mais il pourrait exister un lien avec un profil de mutations, non décrites pour le VIH-1/M. Des études de mutagenèse dirigée seraient maintenant nécessaires pour démontrer l'association de ce profil à une diminution de sensibilité des VIH-1 non-M à EVG. De même, il serait pertinent d'analyser les échecs *in vivo* d'un traitement incluant EVG, pour déterminer l'impact de ce profil sur l'émergence de résistance.

Le second objectif de ce travail était d'étudier la sensibilité génotypique des VIH-1 non-M au fostemsavir, molécule de la classe des inhibiteurs d'attachement, actuellement en phase 3. Les données de sensibilité génotypique des VIH-1/M déjà publiées, indiquaient une résistance naturelle des virus CRF01_AE [234] et dans une moindre mesure pour 46% des virus D, 7% des CRF02_AG et le CRF30_cpx [246]. Par contre, les données concernant les VIH-1 non-M faisaient état, uniquement, de 2 isolats cliniques de VIH-1/O (BCF01 et BCF03) montrant des CI50 très élevées, >2 000 nM [234]. Ces valeurs, 2 000 fois supérieures à la valeur moyenne obtenue pour la souche de référence LAI (0.7 +- 0.4 nM) indiquaient une probable résistance génotypique de l'ensemble du groupe. Dans notre étude, la comparaison à la sensibilité phénotypique n'a pas été possible du fait de l'indisponibilité de la molécule pour réaliser les essais *in vitro*, mais nous avons pu mettre en évidence un polymorphisme naturel distinct selon le groupe (N, O ou P). Ainsi, le polymorphisme génétique des VIH-1/N présentait naturellement le profil des MAR S375M+M426L+M434I au fostemsavir. Le rôle de ces mutations dans la résistance a été identifié lors d'un essai de 8 jours de monothérapie impliquant 50 sujets [241]. Cinq des 6 virus isolés des sujets non répondeurs qui présentaient des CI50 très élevées (>100 nM) étaient porteurs de la mutation M426L. Cette mutation était également

retrouvée isolément chez 2 sujets répondeurs, soulignant donc, que sa seule présence n'est pas suffisante à induire la résistance et qu'elle nécessite d'être associée à d'autres MAR. Seul un virus isolé d'un sujet non répondeur ne portait pas la MAR M426L mais cumulait les mutations S375M et M434I. Des études précédentes de génétique inverse avaient d'ailleurs déjà montré la contribution des mutations en position 375 sur l'émergence de la résistance [247]. Aussi, l'effet de la MAR M434I sur la réduction de sensibilité, a été démontré bienqu'il semble inférieur à celui de la M426L : les virus porteurs de la M426L présentaient un FC moyen à 81, alors qu'il était à 11 avec la M434I [248]. Au final, l'association des 3 MAR issues du profil génétique des VIH-1/N, malgré un impact phénotypique variable sur la réduction de sensibilité, implique une résistance naturelle certaine de l'ensemble du groupe au fostemsavir.

Le polymorphisme le plus important a été mis en évidence pour les VIH-1/O, lié au nombre plus important de séquences analysées (N=100), avec le profil de mutations majoritaires S375H+M426S+M434I/L+V506I, également partagé avec le groupe P. Dans le détail, une et 10 séquences VIH-1/O présentaient les associations de MAR S375H+M426L et S375H+M434I respectivement, conduisant à une résistance génotypique au fostemsavir des souches correspondantes. C'est d'ailleurs ce second profil que l'on retrouve pour la souche BCF003 de notre panel, et qui est une des 2 souches utilisées dans l'étude de Nowicka-Sans *et al.* présentant une CI50>2 000 nM [234]. Concernant la seconde souche de l'étude (BCF01) avec une CI50>2 000 nM, l'analyse de la séquence BCF01 disponible dans notre panel, montrait la MAR S375H isolément, comme les 2 VIH-1/P et 95% des VIH-1/O étudiés. Il a déjà été observé pour les virus porteurs de la mutation S375H isolément, une réduction de sensibilité de plus de 135 fois [248]. D'ailleurs, en association à la MAR M475I, c'est cette mutation qui avait montré un impact délétère sur la sensibilité de l'ensemble des VIH-1 CRF01_AE [234].

En conclusion, les 3 MAR (M426L, S375H, M434I) retrouvées dans notre étude conduisent à la résistance génotypique naturelle des VIH-1 non-M au fostemsavir mais dans des proportions variables selon les groupes de virus : la mutation M426L identifiée comme le déterminant majeur de la résistance de l'ensemble des VIH-1/N ; la mutation S375H associée à la résistance naturelle des VIH-1/P et présente pour 95% des VIH-1/O, indépendamment du sous-groupe H ou T et enfin la mutation M434I, dont l'effet est plus modérée, présente pour 10% des VIH-1/O. L'impact des profils de mutations naturelles identifiés dans ce travail sur la sensibilité au fostemsavir, nécessite maintenant d'être confirmé par des essais phénotypiques et de mutagénèse dirigée.

PARTIE 2 :

REPONSES IMMUNOLOGIQUE ET VIROLOGIQUE AUX ANTIRETROVIRAUX DES PATIENTS INFECTES PAR DES VIH-1 NON-M

1. Problématique et objectifs

Si les conséquences de l'importante diversité génétique des infections à VIH-1/O sont maintenant bien décrites sur le plan du diagnostic et du suivi virologique, leurs répercussions sur la réponse immuno-virologique sous pression thérapeutique sont mal connues. La prise en charge thérapeutique de ces infections est calquée sur les recommandations émises pour les infections à variants pandémique, avec pour seule réserve la résistance naturelle aux INNTI, mais sans savoir si cette stratégie est parfaitement adaptée à la diversité génétique des VIH-1/O. En effet il n'existe pas d'étude à grande échelle de la réponse immunologique et virologique des patients VIH-1/O, du fait de l'absence de cohorte dédiée. Les seules données disponibles sont pour la plupart anciennes et sur un nombre très limité de patients [22,135], elles concernent essentiellement des trithérapies incluant des molécules maintenant désuètes (zalcitabine, didanosine, indinavir…). Quelques observations de cas ont cependant permis d'incrémenter des données *in vivo* plus récentes, avec l'utilisation des INI notamment [69,229,230]. Au global, ces résultats concernaient 14 patients VIH-1/O et pour 11 d'entre eux la mise sous INI, exclusivement RAL, correspondait à une thérapie de sauvetage. Par ailleurs, les cas d'échecs virologiques décrits dans ces séries, n'ont pas tous fait l'objet d'une analyse génotypique pour identifier les MAR. C'est pourquoi, le laboratoire de virologie du CHU de Rouen, associé au CNR du VIH, a mis en place en 2005, un réseau (RES-O) de surveillance viro-clinique des variants divergents en France. Ce sont 135 cas de mono-infections à VIH-1/O (données CNR, à l'exclusion des doubles infections VIH-1/M + VIH-1/O, et formes recombinantes VIH-1/MO) qui ont pu être répertoriées depuis le 1er cas décrit en 1992 [74]. Ainsi notre laboratoire dispose d'une importante collection d'échantillons de plasma, sérum, sang total, CMSP et de données cliniques, immunologiques et virologiques (charge virale, génotypage et séquençage de

résistance) des patients identifiés et suivis au sein du RES-O. Ce répertoire d'informations a permis l'élaboration du projet SIDACTION/ANRS EP50 : Observatoire de la Réponse Immuno-Virologique aux ARV des patients infectés par un VIH-1/O en France (ORIVAO), basé sur une large cohorte de patients.

Parallèlement au suivi des patients VIH-1/O, le RES-O a également permis d'identifier la souche RBF168, prototype d'un nouveau groupe de VIH-1 : le groupe P [29]. La patiente infectée par cette souche est d'origine camerounaise et vit en région parisienne depuis 2004, année du diagnostic d'infection à VIH. Les 13 ans de son suivi clinco-biologique étaient une occasion unique de décrire l'évolution naturelle et sous pression thérapeutique, de cette infection extrêmement rare (deux cas décrits à ce jour, dont un seul suivi), mais aussi d'évaluer les conséquences de la forte divergence génétique de cette souche singulière.

Les objectifs de ce travail étaient donc :

- d'étudier sur une large population de patients infectés par un VIH-1/O, la réponse immunologique et virologique à une première combinaison d'ARV (cARV) ;
- de décrire spécifiquement la réponse virologique des patients recevant une trithérapie incluant des INI et les mutations présentes à l'échec virologique ;
- et de caractériser l'évolution immuno-virologique naturelle et sous cARV de l'infection à VIH-1/P, ainsi que certaines propriétés virologiques *in vitro* de la souche RBF168.

2. Réponses immunologique et virologique aux ARV des patients infectés par un VIH-1/O

Ce travail a fait l'objet, d'une communication affichée

21st AIDS International Conference (Durban, Juillet 2016) : *Immuno-virological response to cART of HIV-1 group O infected patients -ANRS EP50 ORIVAO study-*

et de deux publications (en premier et deuxième auteur respectivement)

AIDS 2015 Jun 19;29(10):1271-3 : *HIV-1 group O resistance pathway with raltegravir is similar to HIV-1 group M* ; doi: 10.1097/QAD.0000000000000703 (Annexe 5)

Clin Inf Dis 2017 Dec 21, epub: *HIV-1 group O infection in France: clinical features and immunovirological response to antiretrovirals* ; doi: 10.1093/cid/cix1087 (Annexe 6)

2.1. Etude SIDACTION/ANRS EP50 ORIVAO

Le projet ORIVAO est une étude non-interventionnelle non-comparative dont l'objectif principal était de mesurer la réponse immuno-virologique à un cARV et la durée pour atteindre le succès thérapeutique, chez tous les patients infectés par un VIH-1/O et suivis en France.

2.1.1. Patients inclus

Tous les patients du RES-O, pour lesquels un diagnostic d'infection à VIH-1/O avait été établi, étaient éligibles, quelle que soit l'ancienneté de l'infection. Le diagnostic virologique reposait sur un sérotypage, test immuno-enzymatique développé par le CNR, permettant la discrimination des VIH-1, VIH-2 et des différents groupes de VIH-1 (M à P), et une confirmation moléculaire (sur plasma réplicatif ou à défaut sur ADN proviral à partir de CMSP/sang total) [60]. Les patients qui manifestaient leur opposition à la requalification des prélèvements issus des soins vers la recherche, ou les patients doublement infectés (VIH-1/M + VIH-1/O), infectés par un virus recombinant (VIH-1/MO), ont été exclus de l'étude.

2.1.2. Méthodes

2.1.2.1. Recueil des données

Les données démographiques, biologiques (immunologiques et virologiques), cliniques et thérapeutiques ont été recueillies entre avril 2012 et mai 2014, via trois types de cahiers d'observation : un « cahier J0 » rempli à l'inclusion, un « cahier rétrospectif » concernant toutes les données antérieures au J0 (unique cahier concernant les données des patients décédés ou perdus de vue) et des « cahiers de suivi » pour chacune des visites ultérieures des patients. Toutes les données recueillies ont fait l'objet d'un monitoring sur site, puis ont été validées par le clinicien référent de l'étude.

2.1.2.2. Suivi virologique

Le suivi virologique des patients inclus était réalisé soit par le laboratoire de Rouen, disposant d'une technique de mesure de la charge virale plasmatique (CVp), spécifique de groupe O ciblant l'intégrase avec un seuil de détection à 40 cp/mL [152], soit par le laboratoire de virologie du site de prise en charge du patient, au moyen de techniques commerciales adaptées à la quantification des VIH-1/O : HIV-1 Real*Time* avec un seuil de détection à 40 cp/mL (Abbott®, Des Plaines, Illinois, USA) ou Cobas ampliprep/Taqman HIV-1 V2 au seuil de détection de 20 cp/mL (Roche® Diagnostics, Meylan, France). Du fait des conséquences de la diversité génétique des VIH-1/O sur les mesures de quantification de l'ARN, les résultats recueillis ont nécessairement fait l'objet d'une validation au cas par cas pour chaque souche de patient. Cette validation tenait compte des résultats de CVp prospectifs, mais aussi rétrospectifs, et s'effectuait selon le schéma suivant :

- Les résultats obtenus par des techniques connues comme non adaptées à la quantification des VIH-1/O (Tableau 10) déclenchaient une ré-anlayse sur fond de tubes, par une technique adaptée ou à défaut, exclus des analyses.

Tableau 10. Liste des techniques commerciales non adaptées à la quantification des VIH-1/O.

Nom commercial de la technique	**Fabricant**
NASBA HIV-1 RNA amplification	Organon Teknika®
Amplicor HIV-1 Monitor v1.0	Roche®
Amplicor HIV-1 Monitor v1.5	Roche®
Cobas ampliprep/Taqman HIV-1 v1	Roche®
Versant HIV-1 RNA 3.0	Siemens®
Versant HIV-1 RNA 1.5	Siemens®
Quantiplex HIV-1 RNA v2.0	Bayer®
Quantiplex HIV-1 RNA v3.0	Bayer®

- Les résultats de CVp positifs obtenus avec les techniques non spécifiques de groupe O étaient comparés à ceux obtenus avec la technique CNR, sur un point élevé de CVp et sur un point plus faible (autour du seuil de quantification de la technique CNR à 40 cp/mL soit 1.6 Log). L'observation d'une discordance de plus de 0.5 Log, conduisait à la quantification de l'ensemble des échantillons du suivi virologique encore disponibles, par la technique la plus adaptée, c'est-à-dire la méthode donnant la valeur la plus élevée. En cas d'indisponibilité du matériel réplicatif, la concordance d'indétectabilité entre les 2 techniques (technique commerciale sur site *vs* technique CNR) était testée, par défaut. Les résultats et conclusions de ces vérifications faisaient l'objet d'un courrier d'information aux cliniciens et biologistes sur site qui orientait, le cas échéant, vers un suivi par notre laboratoire.

2.1.2.3. Analyses statistiques

2.1.2.3.1. Analyse longitudinale

Les analyses ont été menées dans un premier temps de manière longitudinale, chez les patients naïfs d'ARV qui initiaient une cARV d'au moins trois molécules, considérée dans l'étude comme la première ligne de traitement ARV, quels que soient la date d'initiation et les changements effectués au cours du suivi. Toute interruption de plus d'un mois de la cARV ou switch vers une mono ou bi-thérapie étaient interprétés comme un arrêt de cARV. Les résultats de phénotypage lymphocytaire et CVp obtenus entre les 2 mois précédents et les 7 jours suivants l'initiation de la cARV, étaient considérées comme données de statut initial.

La réponse immunologique a été analysée par un modèle à effets mixtes pour estimer les pentes de remontée des CD4, elles-mêmes nécessaires à l'estimation du gain en CD4, pour des patients initiant une cARV à 200 CD4 mm^{-3}. La réponse virologique a été analysée chez tout patient présentant au moins une CVp disponible au cours de la première année de traitement et indépendamment de la disponibilité d'un résultat de CVp à l'initiation. Le temps médian nécessaire à atteindre l'indétectabilité a été calculé au seuil de 200 cp/mL en concordance avec les performances des différentes techniques, et à 40 cp/mL en prenant en compte uniquement les techniques indiquant ce seuil.

Du fait de la résistance naturelle des VIH-1/O aux INNTI, une analyse a été menée plus spécifiquement chez les patients à l'initiation d'une première ligne de traitement incluant un INNTI, par comparaison à ceux initiant un traitement incluant un IP/r. Pour cette analyse, la fin de ligne de traitement était définie par un arrêt de l'INNTI

ou de l'IP/r. L'objectif était de comparer la réponse immunologique, estimée par le gain en CD4 dans chaque groupe de patients et de déterminer la réponse virologique dans le groupe INNTI, au dernier point de suivi disponible sous la ligne. Chez ces patients qui disposaient d'une CVp>200 cp/mL soit 2.3 Log cp/mL et quelle que soit la durée du traitement, un séquençage des régions PR et RT était systématiquement réalisé selon les modalités précédemment décrites [214]. Le détail des amorces utilisées est disponible en Annexe 1. En l'absence d'algorithme d'interprétation spécifique des VIH-1/O, les MAR étaient interprétées par rapport à l'algorithme ANRS 2017 v27 défini pour le VIH-1/M.

2.1.2.3.2. Analyse transversale

Dans un second temps, une étude transversale du statut immunologique et virologique a été réalisée parmi les patients encore suivis entre 2007-2014, période correspondant à l'arrivée des INI (classe thérapeutique antirétrovirale la plus récemment commercialisée) et du DRV (dernier IP en date sur le marché). Les analyses ont été faites sur le dernier point de suivi disponible pour chaque patient et indépendamment des lignes thérapeutiques précédentes.

Le logiciel STATA® (release 13 ; Stata Corp, College Station, Texas) a été utilisé pour l'exploitation statistique des résultats.

2.1.3. Résultats

Entre avril 2012 et mai 2014, 101 patients, issus de 48 centres cliniques français, ont été inclus dans l'étude. Les principales caractéristiques de la population d'étude sont décrites dans le Tableau 11. Soixante-et-onze patients (71.7%) étaient originaires du Cameroun ou d'autres pays d'Afrique (9%). L'année médiane du diagnostic d'infection à VIH et spécifiquement de l'infection à VIH-1/O étaient 2001 et 2004 respectivement. Le plus ancien diagnostic avait été posé en 1989 pour le VIH et en 1997 pour le VIH-1/O. La durée médiane entre ces deux diagnostics était de 21.3 mois (calculée à partir des données disponibles pour 76 patients) ; cette durée était allongée pour les 31 patients pris en charge avant 2000 (65.5 mois, en médiane), par rapport à ceux pris en charge entre 2000 et 2006 (7.3 mois N=33) ou à partir de 2007 (2.75 mois, N=12).

Tableau 11. Caractéristiques épidémiologiques des patients inclus dans l'étude ORIVAO.

		Patients inclus N=101	
Age au diagnostic, *années*	Médiane (IQR)	36.5 (27.4; 43.0)	
Sexe, % (n)	Femme	65.4%	(66)
Groupe de transmission % (n)	Sexuel (Hétérosexuel)	82.2%	(83)
	Sanguin	11.9%	(12)
	Mère-enfant	3.0%	(3)
	Non connu	3.0%	(3)
Pays de naissance, % (n)	**N**	**99**	
	Cameroun	71.7%	(71)
	France	19.2%	(19)
	Congo (RDC)	2.0%	(2)
	Sénégal	2.0%	(2)
	Gabon	1.0%	(1)
	Guinée	1.0%	(1)
	Libéria	1.0%	(1)
	Tchad	1.0%	(1)
	Tunisie	1.0%	(1)
Année du diagnostic VIH	Médiane (IQR)	2001 (1997 ; 2004)	
Durée entre le diagnostic VIH et le diagnostic VIH-1/O, *mois*	**N**	**76**	
	Médiane (IQR)	21.3 (2.2 ; 77.8)	
Durée entre l'arrivée en France et le diagnostic VIH-1/O, *mois*	**N/N nés à l'étranger**	**63/80**	
	Médiane (IQR)	46.8 (5.0 ; 130.6)	
Nombre de CD4 au diagnostic*, *mm^{-3}*	**N**	**65**	
	Médiane (IQR)	250 (150 ; 404)	
CVp au diagnostic *, *Log cp/mL*	**N**	**39**	
	Médiane (IQR)	4.0 (3.6 ; 4.7)	

* dans l'année ayant suivi le diagnostic

2.1.3.1. Analyse longitudinale

Au moment du diagnostic d'infection à VIH, les patients naïfs pour lesquels au moins un résultat de CD4 était disponible (N=65), présentaient une médiane de CD4 à 250 mm^{-3} et 40% d'entre eux avaient un taux <200 mm^{-3}. La médiane de CVp au diagnostic était de 4.0 Log cp/mL (N=39, Tableau 11).

A l'initiation de la cARV, la médiane des CD4 et de CVp des patients (N=80) étaient respectivement de 201 CD4 mm^{-3} et 4.1 Log cp/mL. La combinaison initiée en médiane à 6.1 mois du diagnostic d'infection à VIH, associait majoritairement 2INTI+1IP/r (51.3%) et dans une moindre mesure 2INTI+INNTI (18.8%). La réponse immunologique sous ARV a été analysée pour 74 patients, présentant une médiane de

suivi de 44 [17 ; 90] mois. Le modèle utilisé estimait que les patients initiant un traitement avec 200 CD4mm^{-3} avaient un gain moyen de 147 [324 ; 370] et 170 [344 ; 396] CD4 mm^{-3}, respectivement après 12 et 24 mois de traitement (toute combinaison confondue). Concernant la réponse virologique, l'analyse possible pour 49 patients a montré que 45 (91.8%) atteignaient une CVp < 200 cp/mL en 3.1 mois en médiane (IC95 : 1.4 ; 4.9). Le modèle montrait également que 89.3% des patients atteignaient l'indetectabilité au seuil de 40 cp/mL, en un temps médian de 3.8 mois [2.0 ; 5.5].

Nous avons ensuite voulu analyser la réponse immunologique et virologique des patients naïfs, initiant une cARV comprenant un INNTI (N=14) par comparaison à ceux initiant un cARV comprenant un IP/r (N=37). Le gain moyen en CD4, après un an de cARV initié avec 200 CD4 mm^{-3}, était significativement plus faible (p=0.02) pour les patients ayant initié un cARV incluant un INNTI (+79 CD4 mm^{-3}) par rapport à ceux recevant un IP/r (+177 CD4 mm^{-3}). La durée de traitement était en médiane de 6.7 mois [0.2 ; 30].

L'analyse de la réponse virologique n'a été possible que pour 4 (EFV N=3 ; RPV N=1) de ces 14 patients, par comparaison entre un résultat de CVp naïf d'ARV et au moins un résultat de CVp au cours du traitement. La médiane de CVp avant l'initiation du cARV, était de 4.0 Log cp/mL et la médiane de durée de traitement, de 6.4 mois (Tableau 12). L'indétectabilité (au seuil de 40 cp/mL) était atteinte à 2.5 mois en médiane [0.5 ; 5.1]. Au dernier point de suivi, on observait une CVp indétectable pour 3 patients sur 4. Ces résultats étaient mesurés relativement précocement par rapport à l'initiation de la cARV ; seul le succès virologique à 30 mois du patient RBF230, paraît donc interprétable. Les données du patient RBF236, à défaut de CVp disponible à l'état naïf, ont été ajoutées car le dernier point de suivi virologique correspondait à un échec virologique de fin de la première ligne thérapeutique, d'une durée de 12 mois (Tableau 12).

Tableau 12. Données virologiques et thérapeutiques des patients initiant une cARV avec INNTI.

	Sous-groupe (résidu en 181)$^{\$}$	Combinaison ARV	Durée cARV (mois)	CVp moyenne avant INNTI (Log cp/mL)	Délai* avant 1ère CVp indétecatble (mois)	CVp au dernier point de suivi (Log cp/mL)	Délai* au dernier point de suivi (mois)
RBF137	H (C)	EFV+TDF+3TC	6.7	4.0	5.1	<1.6	5.1
RBF230	H (C)	EFV+AZT+3TC	30	2.8	3.7	<1.6	28.2
RBF220	H (C)	EFV+TDF+FTC	6.4	3.5	0.5	2.9	3.2
RBF233	H (Y)	RPV+TDF+FTC	1.8	4.6	1.4	<1.6	1.4
RBF236	H (C)	NVP+TDF+3TC	12.0	DM	DM	4.0	11.8

[$]Y : Tyrosine, C : Cystéine, sur la ou les séquences disponibles ; *par rapport à l'initiation de la cARV ; DM : Données manquantes

Associées aux données d'échec virologique du patient RBF220 ; les données du patient RBF236 ont permis l'étude des mutations de résistance (Tableau 13). Le séquençage pour RBF236 a montré en plus des mutations classiques de polymorphisme naturel des VIH-1/O (198G, L210Y), la présence des MAR K103R, Y181C et G190A associées aux INNTI ; K65R et M184V associées aux INTI. La souche RBF220 présentait en plus la MAR V106I et la mutation de polymorphisme naturel, V179E. L'ensemble de ce profil induisait une résistance génotypique à l'ensemble de la classe des INNTI et à tous les INTI sauf AZT.

Tableau 13. Profil de résistance des deux patients en échec d'une première ligne d'INNTI.

	Mutations associées au polymorphisme naturel*	MAR sous cARV	Interprétation sur la sensibilité aux ARV d'après ANRS v27
RBF220	A98G, V179E, L210Y	K65KR K103R V106I Y181C M184V G190AG	R : INNTI R : INTI, sauf S : AZT
RBF236	A98G, L210Y	K65R K103R M184V Y181C G190A	R : INNTI R : INTI, sauf S : AZT

R : Résistant, S : Sensible ; *prévalence de 100% sur les séquences de VIH-1/O

2.1.3.2. Analyse transversale

La seconde analyse transversale sur la période plus récente de 2007-2014, a été réalisée sur 85 patients (84%) toujours suivis et sous cARV. Parmi eux, 57 (67%) avaient initié une cARV avant 2007, 37% avec 2INTI+IP/r, 32% avec 2INTI+IP, 18% avec 2INTI+INNTI et 14% avec 3INTI. A l'initiation, la médiane de CD4 était à 213 mm^{-3} et la médiane de CVp à 4.3 Log cp/mL. A la dernière visite, qui avait lieu en médiane à 12.8 ans de traitement, les patients avaient reçu en médiane 8 lignes de traitement (5 ; 12). Les principales combinaisons de traitement au point le plus récent incluaient majoritairement un IP/r ou un INI (40.3% et 36.8% respectivement). La mesure de CD4 la plus récente était en médiane à 498 mm^{-3} et 85.2% des patients avait une CVp <40 cp/mL.

Pour les 28 (33%) autres patients ayant initié des ARV après 2007, les cARV incluaient pour 78.6%, 17.9% et 3.6%, un IP/r, un INNTI et un IP respectivement. A l'initiation, les médianes de CD4 et CVp étaient respectivement de 256 mm^{-3} et 4.1 Log cp/mL. A la dernière visite, les patients recevaient majoritairement un traitement à base d'IP/r (78.6%) ou d'INI (14.3%). La valeur la plus récente de CD4 atteignait en médiane 506 mm^{-3} et le succès virologique (CVp <40 cp/mL) était obtenu pour 91.3 % des patients.

2.2. Réponse virologique des patients recevant un traitement incluant un INI

En parallèle de nos analyses phéno-génotypiques réalisées *in vitro,* nous avons entrepris d'étudier la réponse virologique des patients infectés par un VIH-1/O recevant un traitement incluant un INI. L'objectif principal était de déterminer la fréquence du succès ou de l'échec virologique d'une cARV incluant un INI, quelles que soient les lignes thérapeutiques précédentes (mono, bi ou trithérapie) et le motif d'instauration de cette ligne (switch, échec d'un précédent traitement ou arrêt de traitement). L'objectif secondaire était de décrire le profil de mutations présentes sur l'IN à l'échec virologique.

2.2.1. Patients inclus

Tout patient identifié par le RES-O du CNR et/ou inclus dans l'étude ORIVAO, naïf d'INI mais pas d'ARV, et qui initiait pour la première fois un traitement incluant RAL, EVG ou DTG en cours de prise en charge, était inclus dans l'étude. Les données thérapeutiques (nature des ARV et motifs éventuels de changement), de CVp et de séquençage de résistance ont été recueillies jusqu'en mai 2017, correspondant à la fin du suivi des patients de l'étude. Pour les patients perdus de vue en cours d'étude, la date de fin de suivi correspondait à la date des dernières informations disponibles.

2.2.2. Méthodes

Nous avons d'abord analysé la réponse virologique à une première cARV incluant un INI. La notion de succès virologique était définie par une CVp inférieure à 20 cp/mL ou 40 cp/mL (respectivement pour les techniques Cobas Taqman HIV-1 V2 (Roche®) ou HIV-1 Real*Time* (Abbott®) et la technique spécifique du CNR). Pour ce travail, nous avons considéré :

- Les patients en succès virologique de la ligne précédant l'introduction des INI.

En l'absence de données de CVp à la date d'introduction des INI, le succès était extrapolé si l'on disposait d'un résultat de CVp indétectable datant de moins de 3 mois avant INI, avec un motif autre qu'un échec immuno-virologique (lipodystrophie, allègement, souhait du patient…).

- Les patients en échec virologique (CVp > 20 ou 40 cp/mL) de la ligne précédant l'introduction des INI.

Puis, nous avons analysé la réponse virologique au dernier point de suivi disponible pour tous les patients sous cARV incluant des INI, qu'ils aient été prétraités ou non par des INI.

L'étude de résistance sur la région IN a été systématiquement réalisée pour toute CVp>200 cp/mL soit 2.3 Log cp/mL (voir protocole et détail des amorces précédemment décrits et disponibles en annexe 1). L'interprétation des mutations était ensuite réalisée par rapport à l'algorithme ANRS v27 (2017).

2.2.3. Résultats

2.2.3.1. Caractéristiques des patients à l'inclusion

Trente-neuf patients ont initié une combinaison thérapeutique incluant un INI (RAL, EVG ou DTG), à un moment de leur prise en charge. Tous étaient d'origine camerounaise ou avait un lien avec ce pays (partenaire(s) camerounais) ; 69.2% étaient des femmes, sans que l'une d'elles n'ait été enceinte au moment de l'administration d'INI ; la médiane d'âge était de 52 ans [15 ; 77]. En l'absence de traitement, la médiane de CVp (37 points), calculée chez 15 patients, était de 3.69 Log cp/mL [3.10 ; 6] et les données immunologiques (115 mesures) disponibles pour 25 patients, indiquaient un taux de CD4 à 395 mm^{-3} [41 ; 987] en médiane. A l'inclusion, aucun des patients n'était naïf d'ARV : les 39 patients avaient reçu, en médiane, 4 lignes d'ARV [1 ; 12] entre novembre 1992 et Juillet 2013, avant d'initié une première cARV incluant RAL majoritairement (N=26 ; 66.7%), DTG (N=7 ; 18%) ou EVG (N=6 ; 15%).

Parmi ces 39 patients, 21 (54%) étaient en succès de leur précédente ligne d'ARV, alors que 15 (38%) étaient en situation d'échec virologique avec une CVp en moyenne à 3.62 Log cp/mL (de 1.8 à 5.1 Log c/mL) ; les données manquaient pour 3 patients (8%) (Figure 20).

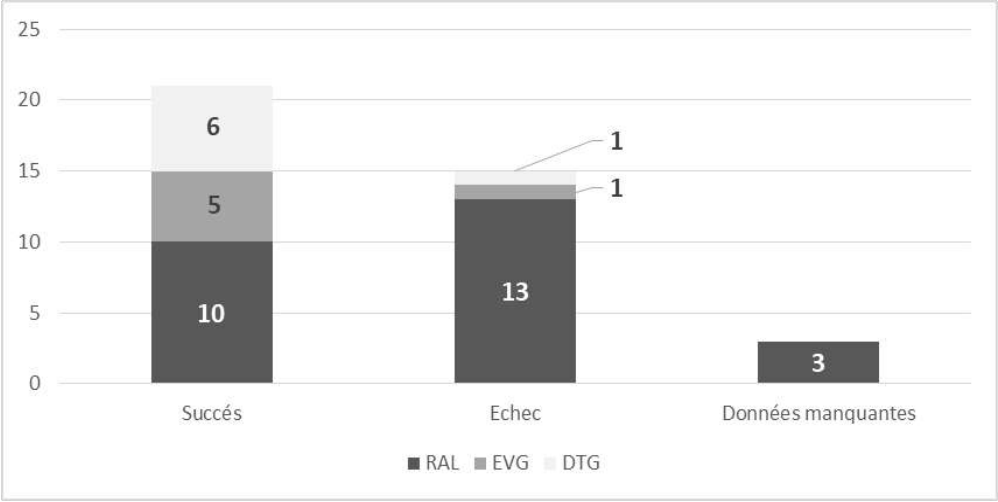


Figure 20. Statut virologique à l'introduction d'une cARV avec INI (N=39 patients) en fonction des molécules prescrites (RAL, EVG, DTG).

La composition des molécules ARV associées à l'INI dans les cARV, est présentée en Tableau 14, selon la nature de l'INI administré. Outre la diversité des associations rencontrées, 72% (N=28) des patients recevait une trithérapie. Toutes les combinaisons comprenaient généralement au moins une molécule de la classe des INTI, quelle que soit la nature de l'INI associé. Parmi les 7 combinaisons contenant du DTG, 6 concernaient l'association fixe de TRIUMEQ (ABC+3TC+DTG). Les combinaisons associées au RAL étaient aussi diverses en terme de composition qu'en nombre de classes associées, mais le socle de la combinaison était généralement fait de 2 INTI. Il est à noter que les quadri et pentathérapie faites de 2INTI+1INNTI+1IP+/-1IF, correspondaient à des schémas d'intensification de traitement.

Tableau 14. Détails des classes thérapeutiques des cARV, à l'initiation des INI (N= 39).

Composition des cARV par INI	N
DTG	**7**
2INTI	7
EVG	**6**
2INTI	6
RAL	**26**
2INTI	11
2INTI + 1IP	4
1INTI + 1IP	4
2INTI + 1IP + IF	3
2INTI + 1INNTI + 1IP + 1IF	2
2INTI + 1INNTI + 1IP	1
3INTI + 1IP	1

INTI: Inhibiteur nucléos(t)idique de la TI ; INNTI : Inhibiteur non nucléosdique de la TI (ici ETV pour les 3 cas) IP: Inhibiteur de protéase ; IF: Inhibiteur de fusion

2.2.3.2. *Réponse virologique des patients à la première ligne d'INI*

Parmi les 21 patients ayant une CVp indétectable à l'initiation, 19 (90%) était toujours en succès virologique au dernier point de suivi de la première ligne d'INI, d'une durée de traitement de 10.6 mois en médiane [3.7 ; 96.1]. Deux patients (RBF144 et BCF172), respectivement sous STRIBILD (20 mois) et TRIUMEQ (11 mois), étaient en situation d'échec virologique, avec des CVp à 55 cp/mL et 673 cp/mL (Tableau 15).

Tableau 15. Caractéristiques virologiques et thérapeutiques des patients avec CVp positive au dernier point de suivi de la première ligne d'INI.

Identité patient cARV	Nombre de lignes thérapeutiques précédentes	Score de sensibilité génotypique (GSS)	Durée (mois)	Dates (JJ/MM/AA) Dernier point de CVp J0 INI	CVp cp/mL (Log cp/mL)
RBF144 EVG+cobi+FTC+TDF	7	DM	20.0	20/06/16 20/10/14	*55 (1.7)* ind
BCF172 DTG+3TC+ABC	9	DM	11.0	01/06/16 01/07/15	673 (2.8) ind
BCF182 EVG+cobi+FTC+TDF	6	DM	22.1	27/07/16 10/12/14	986 (3.0) *69 (1.8)*
RBF236 RAL+FTC+TDF	1	1	2.0	15/01/14 15/11/13	2 970 (3.5) 9 620 (3.9)
RBF229 RAL+DDI+DRV/r	2	3	0.3	16/04/12 06/04/12	*32 (1.5)* 115 715 (5.1)
BCF160 RAL+3TC+ABC	12	DM	42.8	13/05/16 15/10/12	*33 (1.5)* DM

Ind : CVp indétectable (<40 cp/mL); DM : Données manquantes ; *En rouge et en italique*, les résultats de CVp positive mais <200cp/mL

Les 15 patients en échec de leur précédente ligne de traitement avaient reçu une combinaison avec INI pendant 11.9 mois en médiane [10 jours ; 7.9 ans]. Douze d'entre eux (80%) étaient en succès virologique au dernier point de suivi de la première ligne d'INI. Sur les trois patients toujours en échec, deux (BCF182 et RBF236), traités par STRIBILD et TDF+FTC+RAL pendant 22.1 mois et 2 mois respectivement, avaient des CVp proches de 3 Log cp/mL. Le troisième patient, RBF229, présentait un échec relatif avec une CVp au dernier point de suivi à 32 cp/ml. En effet, la durée de sa première ligne de traitement par INI n'était que de 10 jours (0.3 mois) avec une CVp initiale à 5.1 Log cp/mL (Tableau 15).

Parmi les trois patients pour lesquels les données de CVp manquaient, deux étaient en succès de leur première ligne d'INI, d'une durée respective de 17.6 mois et 4.4 ans. Le dernier patient (BCF160) présentait une CVp 33 cp/mL à la fin d'un traitement de 3.6 ans par RAL+3TC+ABC (Tableau 15).

2.2.3.3. Réponse virologique des patients au dernier point de suivi

A la dernière visite de suivi, deux patients étaient sous une combinaison incluant du DRV/r et 37 patients (95%) recevaient toujours un traitement incluant un INI : RAL pour 46% (N=17), DTG pour 38% (N=14) ou EVG pour 16% (N=6) ; parmi lesquels 19 (51%) étaient toujours sous leur première ligne d'INI. Les 18 autres patients avaient reçus en médiane 2 et au maximum 7, cARV différentes incluant un INI.

Au dernier point de CVp disponible, 31 patients (84%) étaient en succès virologique sous une cARV incluant RAL (N=13), EVG (N=5) ou DTG (N=13), quelle que soit la ligne instaurée, dont 15 (48%) étaient toujours en première ligne d'INI (Figure 21). Les 6 cas d'échecs virologiques correspondaient :

- aux 4 patients (RBF144, BCF172, RBF229, BCF160) précédemment décrits lors de leur échec de fin de première ligne d'INI qui correspondait également au dernier point de suivi ;
- aux patients BCF101 et RBF230 qui étaient en seconde ligne d'INI au dernier point de suivi. Le patient BCF101 avait reçu une quadrithérapie incluant du RAL (11ème ligne de traitement ARV) pendant 6.5 ans, et présentait une CVp à 439 cp/ml (2.6 Log). Le patient RBF230, traité par une bithérapie RAL+DRV/r (9ème ligne d'ARV) et présentait une CVp à 10 400 cp/mL (4 Log) au dernier point de suivi, à 32 mois du début de cette ligne.

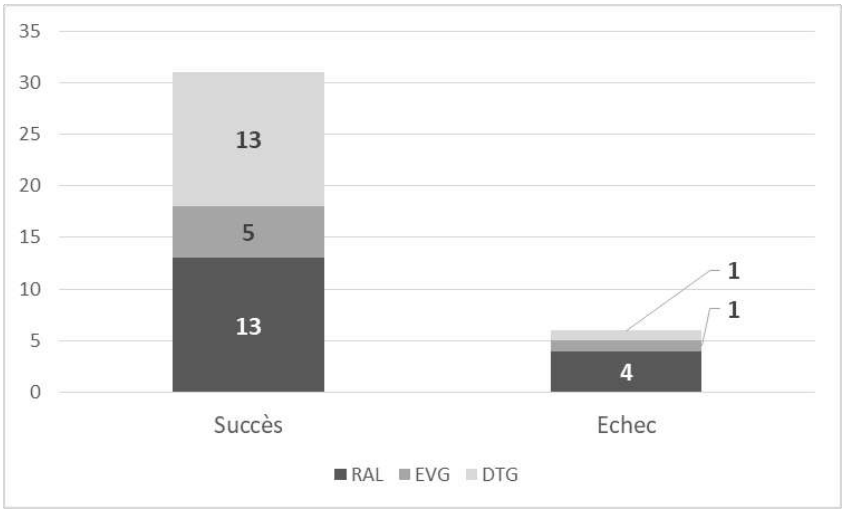


Figure 21. Statut virologique au dernier point de suivi des patients recevant une cARV avec INI (N=37 patients), selon la molécule reçue (RAL, EVG ou DTG).

2.2.3.4. Analyse des mutations de résistances aux INI présentes à l'échec

Nous avons analysé les séquences disponibles pour les 8 situations d'échec au dernier point de suivi disponible, recensées dans ce travail (6 échecs de première ligne et 2 échecs de seconde ligne). Nous avons pu étudier la sélection de MAR par comparaison à une séquence obtenue à l'état naïf d'ARV (N=2 patients ; BCF101, RBF230) et à défaut, sous une ligne de traitement précédente sans INI (N=4 patients ; BCF160, BCF172, BCF182, RBF236). Pour 2 patients (RBF144 ; RBF229), le faible niveau de réplication sous INI (55 et 32 cp/ml respectivement), n'a pas permis de réaliser un séquençage sur ces échantillons (Tableau 16).

Les mutations de polymorphisme naturel associées au VIH-1/O (L74I et S153A sans impact génotypique sur la résistance), étaient retrouvées sur 100% des séquences (Tableau 16). Pour 2 patients (BCF160 et BCF182) on observait la présence naturelle de la MAR T97A avant l'instauration des INI ; celle-ci n'était donc pas sélectionnée par RAL, contrairement aux 2 profils associant d'une part les MAR E138K+Q148R et la mutation atypique E157T (BCF160), et d'autre part les MAR N155H+E157EQ (BCF182). Les patients RBF230 et RBF236 avaient sélectionné sous RAL les MAR Y143CHRY et Q148QR respectivement. Concernant les patients BCF101 et BCF172, aucune MAR prise en compte dans l'algorithme de l'ANRS n'a été observée à l'échec, seul un résidu atypique sous forme de population mixte en position 230 (S230SN), était sélectionnée sous RAL (BCF101). En l'absence d'information génotypique sous INI, une séquence du patient RBF144 à l'état naïf montrait la présence naturelle de la MAR E157Q, impliquant une résistance à RAL, EVG et une sensibilité intermédiaire au DTG d'après l'algorithme ANRS v27. Cette mutation n'est pas prise en compte dans les scores d'interprétation des autres algorithmes (REGA et Stanford).

Au final sur les 8 patients concernés, l'analyse génotypique montrait :

- une résistance à l'ensemble de la classe des INI pour 3 patients (BCF160, BCF182 et RBF236), du fait de la sélection de deux voies de résistance principales décrites pour les VIH-1/M (N155H, Q148R) ;
- une sensibilité conservée voire intermédiaire au DTG pour 3 patients, avec la sélection des mutations en positions 143 et 157 de l'IN, pour RBF230 et RBF144 respectivement ; et la sélection de la mutation S230N pour le patient BCF101, définie comme atypique avec l'algorithme de l'ANRS mais associée à un faible score génotypique de résistance au RAL, selon l'algorithme de Rega.

Concernant les 2 derniers patients (BCF172 et RBF229), les données disponibles ne permettaient pas de conclure.

Nous avons également analysé les séquences par rapport à la liste de mutations associées aux FC élevés de l'étude phénotypique précédente (V72I, I200L, N222K et R224Q). Il est à noter que seule la mutation N222K était présente chez tous les patients ayant développé une MAR aux INI sauf un (BCF101) ayant développé la mutation S230N. Les séquences de ces patients présentaient ces mutations à des fréquences variables et n'exprimaient jamais le profil complet, en dehors du patient RBF230. On observait chez celui-ci en plus de la présence naturelle des mutations N222K et R224Q, l'émergence des mutations 72I et 200L (sous forme de résidus mixtes) à l'échec d'un traitement par RAL.

Tableau 16. Mutations présentes lors des 8 échecs aux INI sur les positions associées à la résistance selon l'algorithme ANRS v27 et aux positions identifiées comme associées aux FC élevés.

		Date de prélèvement	A	T	*V*	L	E	T	G	F	E	G	Y	P	S	Q	V	S	N	E	*I*	*N*	*R*	S	R
	Statut*	JJ/MM/AAAA	49	66	*72*	74	92	97	118	121	138	140	143	145	147	148	151	153	155	157	*200*	*222*	*224*	230	263
BCF101	naïf	10/09/1997	.	.	.	**I**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.				
BCF101	naïf	11/05/1999	.	.	.	**I**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.				
BCF101	naïf	11/05/1999	.	.	.	**I**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	*K*	*Q*	.	.
BCF101	RAL	22/10/2012	.	.	.	**I**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	*K*	*Q*	.	
BCF101	RAL	17/05/2016	.	.	.	**I**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	*K*	*Q*	SN	.
BCF160	ARV	02/05/2005	.	.	*I*	**I**	.	**A**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	*L*				
BCF160	ARV	09/11/2005	.	.	*I*	**I**	.	**A**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	*L*				
BCF160	RAL	01/03/2013	.	.	*I*	**I**	.	**A**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	*L*	*K*	.	.	.
BCF160	RAL	08/03/2016	.	.	*I*	**I**	.	**A**	.	.	**K**	.	.	.	.	**R**	.	A	.	T	*L*	*K*	.	.	.
BCF172	ARV	22/08/2005	.	.	*I*	**I**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
BCF172	DTG	01/06/2016	.	.	*I*	**I**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
BCF182	ARV	07/11/2005	P	.	.	**I**	.	**A**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	*L*				
BCF182	EVG	27/07/2016	P	.	.	**I**	.	**A**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	**H**	**EQ**	*L*	*K*	.	.	.
RBF144	naïf	11/12/2002	.	.	*I*	**I**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	**Q**	.				
RBF229	ARV	21/02/2012	.	.	*I*	**I**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	
RBF230	naïf	28/11/2000	.	.	.	**I**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	*K*	*Q*	.	.
RBF230	ARV	16/09/2011	.	.	.	**I**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	*K*	*Q*	.	
RBF230	RAL	23/03/2016	.	.	.	**I**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	*K*	*Q*	.	.
RBF230	RAL	16/03/2017	.	.	*VI*	**I**	.	.	.	.	.	.	**CHRY**	.	.	.	.	A	.	.	*IL*	*K*	*Q*	.	.
RBF236	ARV	08/11/2013	.	.	*I*	**I**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	*K*	.	.	.
RBF236	RAL	27/11/2013	.	.	*I*	**I**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	*K*	.	.	.
RBF236	RAL	15/01/2014	.	.	*I*	**I**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**QR**	.	A	.	.	.	*K*	.	.	.

Les statuts thérapeutiques sont définis par « naïf » : naïf d'ARV ; « ARV » : ligne thérapeutique ne comprenant pas d'INI ; « RAL/EVG/DTG » : nature de l'INI compris dans la ligne d'ARV ; **En gras,** les MAR aux INI, *En italique* le panel des 4 substitutions associées aux FC>10 pour EVG de notre étude phénotypique (V72I, I200L, N222K, R224Q)

2.3. Discussion

Si quelques études ont permis d'obtenir des données de sensibilité naturelle géno-phénotypiques des VIH-1 non-M aux ARV qui mettent en lumière les conséquences potentielles de leur diversité génétique [156,219,225], les données concernant la réponse immunologique et virologique sous traitement, sont pour la plupart anciennes et ne concernent que la description de cas isolés d'infection à VIH-1/O [22,135,136].

Le projet non interventionnel ORIVAO, avait donc pour objectif d'étudier la réponse immunologique et virologique à toute ligne d'ARV sur un nombre important de patients, représentatifs de la population infectée et de la diversité des souches infectantes. Les 101 patients inclus représentaient ainsi la plus importante file active de patients infectés par un VIH-1/O, mais avec la réserve de résider en France. Ceux-ci ne reflètent donc pas exactement la population touchée qui vit principalement au Cameroun, car les patients étudiés avaient sûrement les moyens et l'état de santé permettant de se déplacer jusqu'en France. Par ailleurs, les données ont été recueillies depuis les premiers diagnostics d'infection et jusqu'en 2014, elles étaient donc très hétéroclites. Elles témoignaient en effet de l'évolution au cours du temps des stratégies thérapeutiques, des molécules antirétrovirales et des techniques de quantification du virus. Malgré ces limites, les résultats ont permis de montrer qu'avant la mise sous traitement, la médiane de CVp était de 4.1 Log cp/mL pour 201 CD4 mm^{-3}. Cette valeur semblait intermédiaire par rapport à celle du VIH-2 et de VIH-1/M, avec des plateaux de CVp au diagnostic à 2.6 et 4.4 Log cp/mL respectivement [249]. Concernant la réponse à une première cARV, elle était globalement favorable avec un gain de 147 et 170 CD4 respectivement à 12 et 24 mois de l'initiation et le succès virologique (200 cp/mL) était atteint en 3.1 mois, en médiane. S'agissant des suivis les plus récents (à partir de 2007), le succès virologique au seuil de 40 cp/mL était obtenu chez 87% des patients et atteignait 90.5% en cas de traitement associant un INI. Le taux médian de CD4 était de 498 mm^{-3} au dernier point de suivi, pour 213 CD4 mm^{-3} à l'initiation. Ces observations sont similaires aux données de l'infection à VIH-1/M sur la même période. En effet, sur 8714 patients français de la cohorte NADIS de 7 centres universitaires français (Marseille, Martinique, Nantes, Nice, Paris, Toulouse, Tourcoing), étudiés de manière transversale en 2006, le taux médian de CD4 sous ARV était de 478 mm^{-3} et 84.8% de patients avaient une CVp < 400 cp/mL [250]. De même sur la cohorte française FHDH ANRS CO4 de patients infectés nés à

l'étranger dont 80% sont d'Afrique sub-saharienne, 47% des patients avaient plus de 500 CD4 mm^{-3} et 84% avaient une CVp<50 cp/mL [251]. Ainsi, les recommandations de traitement françaises édictées pour les infections à VIH-1/M, semblent permettre d'atteindre un contrôle immunologique et virologique des infections à VIH-1/O quasiment comparable à ce qui est observé pour les VIH-1/M.

Une particularité épidémiologique de notre population d'étude était l'origine africaine de 80% des patients et plus spécifiquement, le Cameroun (72%), pays identifié comme l'épicentre des infections à VIH-1/O [60,252]. Cette observation a toute son importance, car dans ce pays, le diagnostic d'infection à VIH-1/O n'est possible que dans les grandes villes (principalement Yaoundé et Douala) qui bénéficient des moyens et des compétences techniques. Or, les recommandations de l'OMS privilégient en première intention un traitement ARV inaugural incluant un INNTI (EFV ou NVP) [253], classe thérapeutique non recommandée pour les VIH-1/O. De plus, comme dans les pays du Sud l'accès aux examens de biologie est coûteux et peut être aux frais des patients, les infections à VIH-1/O ne sont pas systématiquement diagnostiquées. Le suivi clinique demeure alors le recours majeur pour l'adaptation thérapeutique. Alors que l'essai STRATTAL (ANRS 12110/ESTHER) n'a pas montré la non-infériorité du suivi clinique des patients infectés par rapport à un suivi clinique et biologique, il existait par ailleurs une différence significative sur le nombre de patients qui initiaient une seconde ligne de traitement lorsqu'ils bénéficiaient d'un suivi biologique, par rapport à ceux qui n'avaient qu'un suivi clinique [254]. Ainsi, la méconnaissance de l'appartenance au groupe O et l'absence de suivi biologique régulier pourraient impliquer, pour ces patients vivant au Cameroun et injustement traités par INNTI, un probable taux d'échec immuno-virologique supérieur.

Nos observations, certes issues de très faibles effectifs, montrent déjà une moindre restauration immunologique sous NVP, EFV ou RPV, mais il n'a pas été possible d'établir de conclusion interprétable sur la réponse virologique. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de trithérapie inaugurale incluant ETV, pour laquelle la réponse virologique aurait été intéressante à analyser. En effet, Tebit *et al.* a montré un profil phénotypique des isolats cliniques de VIH-1/O à ETV très proche de celui des VIH-1/M (p=0.196), à l'inverse de celui obtenu pour NVP (p<0.005) [156]. Cette variabilité de réponse est probablement portée en partie par la mutation naturelle Y181C, car les données phénotypiques d'un isolat clinique de VIH-1/O 181Y (K103R, V179E, G190A)

indiquaient une sensibilité à ETV (FC à 3) alors que la souche était résistante à NVP (FC à 42) [156]. Ainsi, il pourrait exister une moindre sensibilité de certaines souches, probablement en lien avec un déterminant génotypique particulier. Une étude à plus large échelle de la réponse clinique et virologique des patients VIH-1/O aux INNTI en fonction de leur génotype, bien qu'épistolaire, paraîtrait intéressante pour proposer un ARV de recours aux patients en multi-échecs (notamment d'INI).

En Europe et en France, où le diagnostic d'infection à VIH-1/O est probablement plus accessible, les recommandations thérapeutiques actuelles attribuent aux INI une place de choix dans les stratégies d'initiation des ARV [169,189]. Il est donc apparu opportun d'étudier la réponse virologique des patients VIH-1/O à cette classe d'ARV. Nous n'avons observé aucun patient naïf qui initiait une première trithérapie incluant un INI, reflet indirect de la très faible prévalence des nouveaux diagnostics d'infections à VIH-1/O en France actuellement [73]. Deux-tiers des patients recevaient des cARV incluant du RAL, après un passé thérapeutique d'en médiane 4 lignes d'ARV et on relevait même chez un patient en onzième ligne d'ARV, une sextathérapie incluant des INI. Ces données ne sont pas surprenantes, RAL ayant été le premier INI sur le marché et donc le premier INI accessible aux patients infectés par un VIH-1/O, suivant ainsi une évolution de prise en charge similaire aux patients infectés par un VIH-1/M. Les résultats indiquaient une proportion importante de succès virologique au dernier point de CVp disponible sous première ligne d'INI, comme en fin de suivi, avec respectivement 90% et 84% d'indétectabilité. Ces résultats nécessitent encore d'être complétés par des données sur le temps nécessaire pour atteindre l'indétectabilité et la durée du succès. On observait aussi quelques situations pour lesquelles l'indétectabilité n'était pas atteinte au dernier point de suivi, quelle que soit la ligne d'INI. Parmi ces situations, considérées selon nos critères comme des échecs virologiques, on distinguait :

- les patients qui bénéficiaient d'une très courte durée de traitement (de l'ordre d'une dizaine de jours à 2 mois), chez qui la réponse virologique à la cARV n'était pas interprétable, selon les critères d'évaluation en vigueur [169]. Toutefois pour l'un d'eux (RBF229), la cinétique rapide de décroissance de 4 Log cp/ml à 10 jours de traitement témoignait déjà d'une réponse très favorable à la cARV incluant un INI ;
- les patients infectés par un virus porteur de MAR (T97A ou E157Q) à l'échec, mais déjà présentes avant l'instauration des INI. Ainsi, l'initiation d'une cARV avec EVG en 2014 chez le patient BCF182, semble en contre-indication avec la présence naturelle de la T97A, MAR à EVG (d'après ANRS v27). Il faut cependant

reconnaître que cette MAR n'est apparue dans les algorithmes d'interprétation de la résistance qu'à partir de 2016, alors que l'initiation avait eu lieu en 2014. Ce cas illustre aussi l'importance de la réalisation d'un séquençage de résistance systématique en amont de la mise sous INI (et plus largement sous ARV), pour rechercher non seulement les mutations naturelles mais aussi les mutations transmises, comme décrit très récemment pour les VIH-1/O. Par ailleurs, il est probable que certaines MAR naturelles aient un rôle facilitateur, voire accélérateur d'acquisition de la résistance, comme en témoignent non seulement le cas du patient BCF182 mais aussi le patient BCF160, tous deux porteurs de la MAR T97A avant la mise sous INI, mais chez qui on observait, en plus des mutations de polymorphisme naturel, l'apparition des MAR A49P+N155H+E157EQ sous EVG et E138K+Q148R sous RAL, respectivement.

- les patients pour lesquels on observait une sélection, sous INI, de virus porteurs de MAR. L'analyse des différentes MAR a permis de montrer qu'il existait déjà des voies de résistance identiques à celles des VIH-1/M (Y143, N155, Q148), à défaut d'avoir pu rechercher des voies supplémentaires, spécifiques des VIH-1/O. L'étude des voies de sélection de la résistance des VIH-1/O par Depatureaux *et al*. a justement consisté à étudié l'émergence de MAR de 4 isolats sous pression de sélection d'INI [255]. Les résultats indiquaient l'apparition de MAR déjà identifiées pour les VIH-1/M : T97A, Q148R, V151A/I sélectionnées par RAL, T66I, E92Q, E157Q avec EVG et M50I, R263K avec DTG. Contrairement à ce que nous observons *in vivo* dans notre étude, aucune des MAR N155H et Y143C n'était sélectionnée, même après 40 semaines de pression de sélection. Le faible effectif d'étude ne reflétait probablement pas complètement la diversité génétique intra-groupe O et ne permettait donc pas de montrer toutes les voies possibles d'acquisition de la résistance.

  Par ailleurs, en l'absence d'information de résistance génotypique aux autres molécules entrant dans la cARV (INTI et/ou IP), il est difficile d'identifier la cinétique de sélection des MAR aux INI. Toutefois, le cas du patient RBF236, mis précipitamment sous cARV en amont des résultats de séquençage de résistance, montre qu'un GSS bas conduit à l'échec d'une monothérapie de RAL, par la sélection rapide de la MAR Q148R (Annexe 5).

- les patients pour lesquels on n'observait pas de sélection de MAR sur les séquences de la région de l'IN, la résistance ayant probablement été sélectionnée par les autres

molécules associées dans la cARV. Il faudrait ainsi rechercher des MAR sur les régions de la TI et PR pour analyser plus en détails ces situations. L'absence d'information sur l'observance et les niveaux de concentrations plasmatiques en principe actif, gène également notre interprétation de ces cas. On notait l'absence de mutation sur l'IN pour l'unique patient de notre étude en échec d'un traitement par DTG (BCF172). Ce cas intéressant mériterait une investigation phénotypique pour connaître le niveau de sensibilité au DTG de la souche infectieuse. Un résultat de sensibilité diminuée évoquerait l'existence d'un probable déterminant génotypique non encore décrit, et qui pourrait être spécifique des VIH-1/O. Le travail de Depatureaux *et al.* a ainsi envisagé la sélection de mutations jamais décrites pour les VIH1/M : F121C, V75I et S153V/M50I. A l'inverse, une sensibilité conservée ferait rechercher le profil génotypique des autres régions PR et RT pour identifier des mutations associées à effet protecteur sur la sensibilité au DTG [256].

Nos travaux montrent donc une bonne réponse immunologique et virologique des VIH-1/O aux ARV et un essai interventionnel randomisé comparatif serait néanmoins nécessaire pour le confirmer. Un premier essai thérapeutique, ANRS 12168 DYNAMO, a d'ailleurs été récemment proposé, visant à comparer la réponse immunologique et virologique de l'initiation d'un traitement par AZT+3TC+LPV/r chez des patients VIH-1/O naïfs d'ARV camerounais, appariés à des patients VIH-1/M (1 : 2) sur des critères d'âge, de sexe et de niveau de CD4. Le critère de jugement principal était le pourcentage de patients présentant une CVp indétectable (<60 cp/mL) à M24. L'analyse des résultats montrait 95% d'indétectabilité dans le groupe VIH-1/O, contre 84% dans le groupe VIH-1/M (p ajusté = 0.14), concluant à une réponse virologique équivalente entre les 2 groupes. Le gain en CD4 était par contre significativement plus élevé dans le groupe VIH-1/M (+2 CD4/mois, p=0.04) [257].

En conclusion, la prise en charge thérapeutique actuelle des infections à VIH-1/O en France, calquée sur les recommandations émises pour les infections à VIH-1/M, semble donner des résultats globalement satisfaisants. Il existe toutefois des écueils à considérer comme une probable variabilité de réponse des VIH-1/O à EVG et la contre-indication de l'usage des INNTI, pour lesquels nous montrons, pour la première fois, un impact clinique. Au Cameroun, les INNTI ont une place prépondérante dans les

recommandations de traitement. On pourrait ainsi envisager le recours à la classe des INI, molécules certes très peu accessibles aux pays du Sud, pour les patients infectés par un VIH-1/O en switch ou après un échec virologique, situations pour lesquelles nous avons démontré une bonne efficacité *in vivo*, sous réserve d'un génotype compatible.

3. Réponses immunologique et virologique aux ARV de la patiente infectée par la souche prototype VIH-1/P RBF168 et caractéristiques phénotypiques de la souche

Ce travail a fait l'objet de 2 communications affichées

18th international HIV Dynamics & Evolution (Galway, Mai 2011): *Immuno-virological response of RBF168 prototype strain to antiretroviral therapy*

et d'un article en révision

AIDS, soumis en octobre 2017 : *HIV-1 group P infection : Towards a dead-end infection ?* (Annexe 7)

3.1. Problématique et objectifs

Notre équipe a identifié en 2009 un nouveau variant divergent chez une patiente d'origine camerounaise de 62 ans, dont le diagnostic d'infection à VIH avait été posé en France, en 2004 [29]. La caractérisation moléculaire de la souche RBF168 a montré qu'elle présentait un lien phylogénétique très étroit avec les VISgor, et a conduit à la définition du groupe P.

La divergence génétique de RBF168 par rapport aux VIH-1/M mais également sa proximité phylogénétique avec les VIH-1/O, nous ont conduits à étudier son profil de résistance naturelle aux ARV et parallèlement la réponse immunologique et virologique de la patiente infectée. A ce titre, la prise en charge de cette dernière au sein du service de maladies infectieuses de l'hôpital Louis Mourier de Colombes (92) pendant 13 ans, a permis de collecter des données d'évolution naturelle, puis sous traitement.

Parallèlement, l'isolement en culture cellulaire du virus RBF168 a donné l'opportunité d'étudier certaines de ses propriétés phénotypiques, notamment son pouvoir infectieux (évalué par la dose nécessaire à infecter 50 % des cellules de culture ou TCID50) et ses capacités d'adaptation à l'homme. Nous avons ainsi analysé l'évolution du résidu situé en position 30 du gène *gag*, précédemment identifié comme marqueur d'adaptation à l'hôte humain [258]. Ce résidu est de type methionine ou lysine dans les lignées simiennes (VIS*cpz* et VIS*gor*), et a évolué vers un acide aminé basique (arginine ou lysine) dans la plupart des lignées de VIH-1.

3.2. Patiente et méthodes

3.2.1. Suivi et prise en charge thérapeutique de la patiente RBF168

Les données immunologiques et virologiques ont été collectées prospectivement entre Mars 2004 et Mars 2017. Le typage lymphocytaire était réalisé sur site par cytométrie en flux (Beckman Coulter, Brea, Californie) et le suivi virologique, par notre laboratoire, avec la trousse HIV-1 Real*Time* (Abbott®). Un séquençage de résistance aux ARV a été effectué avant l'instauration du traitement en février 2009, selon les recommandations [259]. Le procédé d'amplification consistait en une première étape de XL RT-PCR comme décrit précédemment [29] ; des PCR nichées ont été définies pour cibler les régions PR-TI, IN et gp41. Le détail des amorces utilisées pour l'amplification et la réaction de séquence est disponible en Annexe 1. La séquence de la seconde souche de groupe P, 06CMU14788, (HQ179987) a également été utilisée pour une analyse comparative des positions associées à la résistance aux ARV. Les séquences en acides aminés ont ainsi été alignées avec le logiciel MEGA6® [235]. L'interprétation des MAR a été faite à l'aide de l'algorithme ANRS 2017 v27.

3.2.2. Caractéristiques phénotypiques de la souche prototype

Nous avons réalisé 6 passages successifs de la souche RBF168, initialement isolée sur CMSP à partir d'un échantillon de plasma de février 2009 ; ces passages ont été effectués selon la méthode précédemment décrite (§2.1.1, Partie 1 et Annexe 1).

Le titre infectieux dans les 6 surnageants de culture a été calculé par la dose nécessaire à infecter 50% des cellules (CMSP) ou TCID50, selon la méthode de Spearman-Karber [260]. Parallèlement, le calcul de TCID50 a été réalisé sur 7 isolats primaires représentatifs de la diversité génétique des VIH (4 VIH-1/M ; 2 VIH-1/O et 1 VIH-2).

La détermination de la nature du résidu en position 30 du gène *gag*, a été réalisée pour les 6 surnageants. Pour se faire, un fragment de 493 pb a été amplifié par RT-PCR. Brièvement, une extraction de l'ARN était réalisée à partir de 200µl de surnageants dilués au 1/100, avec le QIAmp viral RNA Minikit (Qiagen, Hilden, Allemagne). L'amplification était réalisée avec le kit Superscipt III one step RT-PCR, contenant une Taq polymerase Platinum (Invitrogen, Carlsbad, Californie), 20 pmol de chaque amorce (Annexe 1) et 1.5 mM $MgSO_4$. Les conditions de cycle en thermocycleur Gene Amp PCR System 9700, Perkin Elmer, étaient les suivantes : 50°C for 30 min, 94°C for 2 min

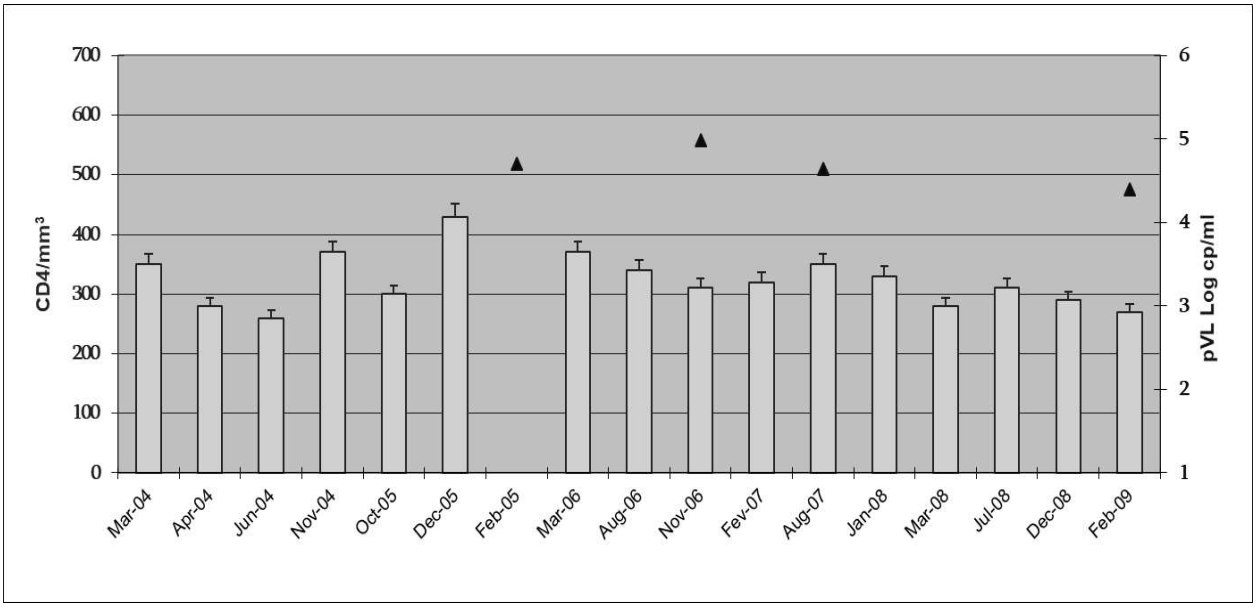
and 35 cycles of 94°C for 30s, 55°C for 30s, 68°C for 1 min. Une étape d'extension finale était réalisée pendant 10 min à 72°C.

3.3. Résultats

3.3.1. Suivi de l'évolution immunologique et virologique de la patiente RBF168

Au moment du diagnostic d'infection à VIH en mars 2004, la patiente RBF168 n'a pas été mise d'emblée sous traitement ARV, conformément aux recommandations de traitement de l'époque [259]. En effet, celle-ci présentait globalement un bon contrôle immunologique depuis la découverte de l'infection avec 350 CD4 mm^{-3} en mars 2004, jusqu'en février 2009 avec 270 CD4 mm^{-3}. Sur cette période exempte d'ARV, la CVp et le taux de CD4 étaient en médiane, à 4.7 Log cp/mL et 315 mm^{-3} respectivement, avec un nadir à 260 CD4 mm^{-3} en juin 2004, et un zénith à 430 CD4 mm^{-3} en décembre 2005 (Figure 22).

Figure 22. Suivi immunologique et virologique de la patiente RBF168 sur la période sans ARV.
Le taux de CD4 (mm^{-3}) et la valeur de CVp (Log cp/mL) sont respectivement représentés par un histogramme et un triangle noir.



En février 2009, les recommandations nationales préconisaient l'instauration d'un traitement chez tout patient qui présentait un taux de CD4<350 mm^{-3}, même asymptomatique. Ainsi, en amont de l'initiation d'un traitement ARV, un séquençage de régions cibles a été réalisé sur un échantillon de plasma et interprété sur la base des mutations de résistances décrites pour les VIH-1/M.

Les résultats montraient un fort polymorphisme de la PR, avec 11 MAR (Tableau 17) entrainant une résistance génotypique à l'ATV, au TPV et une résistance possible au SQV. On notait aussi deux mutations atypiques K20C et L63K, dont l'impact sur la sensibilité aux IP n'est pas connu. Sur la TI, étaient présentes les MAR T69S, A98G, K103R et la mutation atypique V179E, mais sans conséquence sur la résistance aux INNTI et INTI. Aucune mutation aux positions associées à la résistance sur l'IN n'était retrouvée. La présence de la MAR L44M sur la gp41 était quant à elle, associée à une résistance génotypique à l'enfuvirtide. Par comparaison, la souche 06CMU14788 partageait sur la PR 10 des 11 mutations trouvées pour RBF168, conduisant à la même interprétation génotypique sur la résistance aux IP. A l'inverse, on retrouvait sur la TI, deux mutations atypiques supplémentaires, K101Q et E138D mais sans conséquence sur la résistance génotypique. Associée à la région IN, la MAR T97A prédisait une résistance génotypique à EVG. Enfin, cette seconde souche partageait la substitution L44M sur la gp41.

Tableau 17. Polymorphisme naturel des régions PR, RT IN et GP41 des souches RBF168 et 06CMU14788.

Region cible	Type de mutation	Mutations identifies sur des positions associées à la résistance*		
		RBF168	En commun	06CMU14788
PR	MAR**	I15V	L10V, V11I, L33V, M36L, Q58E, D60E, I62V, H69R, A71V, L89I	
	Mutation atypique		K20C, L63K	
TI	MAR		T69S, A98G, K103R	
	Mutation atypique		V179E, L210Y	K101Q, E138D
IN	MAR**			T97A
gp41	MAR**		L44M	

* Algorithme ANRS 2017 v27 ; ** MAR : Mutations Associées à la Résistance

Sur la base de ces résultats, un traitement par TDF+FTC+LPV/r a alors été instauré. En Avril 2009, après 2 mois de traitement, on observait une rapide diminution de la CVp à 2.43 Log cp/mL. A cette même date, la combinaison fixe (TDF+FTC) a nécessité un remplacement par (ABC+3TC), du fait d'effets indésirables imputables au TDF. L'indétectabilité (au seuil de quantification de 40 cp/mL) a été atteinte au mois suivant, en mai 2009. Le succès virologique a été maintenu dès lors et pendant les 8 années qui ont suivi (Figure 23). Sur cette période, les moyenne et médiane du taux de CD4 étaient respectivement de 648 mm^{-3} et 683 mm^{-3}. La valeur au zénith était de 858 CD4 mm^{-3} en août 2015 et on observait un taux de 687 CD4 mm^{-3} au dernier point de suivi en mars 2017.

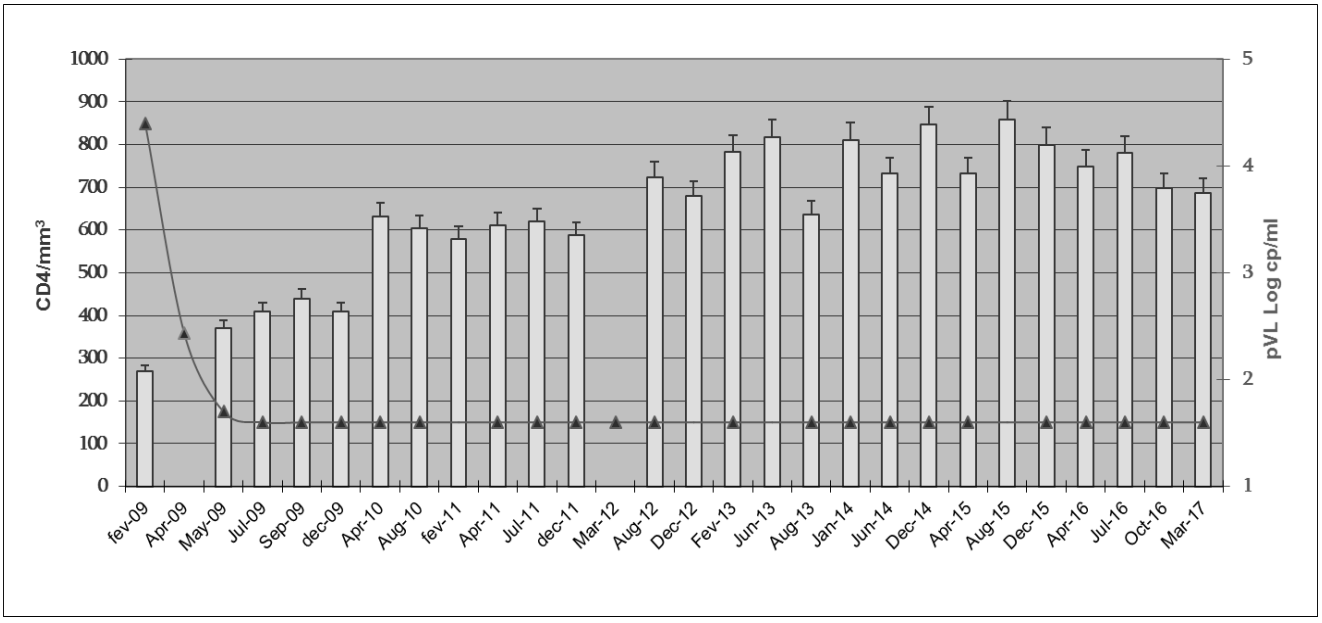


Figure 23. Suivi immunologique et virologique de la patiente RBF168 sur la période avec ARV
Le taux de CD4 (mm^{-3}) et la valeur de CVp (Log cp/mL) sont respectivement représentés par un histogramme et un triangle noir.

3.3.2. Caractéristiques phénotypiques de la souche RBF168

En regard de ces données *in vivo*, nous avons étudié certaines caractéristiques phénotypiques de la souche, *in vitro*. Pour cela, nous avons réalisé 6 passages consécutifs de l'isolat primaire obtenu à partir d'un échantillon de plasma de février 2009, après 17 jours de culture et titrant à 13 227 pg RT/mL (RT Lentivirus assay). Les résultats d'infectiosité des 6 surnageants ont montré une très faible valeur moyenne, 261

TCID50/mL, par comparaison à celles des VIH-1/M (N=4) à 250 625 TCID50/mL, mais également à celles des VIH-1/O (n=2) à 22 627 et d'un VIH-2 titrant à 1 171 TCID50/mL.

Nous avons également cherché à étudier la capacité d'adaptation à l'homme par l'analyse de l'évolution de la nature du résidu en position 30 du gène *gag* lors des 6 passages successifs sur CMSP [258]. Les résultats ont montré qu'une méthionine était exprimée de manière constante par les 6 surnageants de la souche RBF168, contrairement à la seconde souche VIH-1/P, qui exprimait constitutivement une lysine [30].

3.4. Discussion

La découverte de la souche prototype RBF168 a été à l'origine du groupe P, phylogénétiquement lié aux VIH-1/O. Cette observation nous a conduits à rechercher les caractéristiques génotypiques et phénotypiques communes à ces 2 groupes. D'autre part, l'unique suivi clinique de l'un des deux patients connus à ce jour, a donné l'opportunité de mieux connaître l'évolution naturelle de cette infection, de comparer le polymorphisme génétique des VIH-1/P à celui des VIH-1/O, pour définir son impact sur l'utilisation des ARV et la réponse aux ARV.

Des similarités génétiques ont été constatées et concernées un haut degré de polymorphisme sur la PR et la présence des mutations naturelles A98G, K103R, V179E et L210Y sur la TI. Toutefois, certaines différences étaient également observées : la mutation Y181C, majoritairement présente chez les VIH-1/O, était absente des séquences des souches de groupe P ; la MAR L44M sur la région de la gp41, remplaçait la mutation signature N42D bien connue des VIH-1/O, mais toutes deux contre-indiquaient l'usage de l'enfuvirtide. La région de l'intégrase, était conservée dans les deux groupes, mais avec un polymorphisme plus important pour les VIH-1/O. La MAR T97A, exprimée naturellement, était observée uniquement pour la souche 06CMU14788.

En termes d'histoire naturelle de l'infection, ce polymorphisme était associé chez la patiente infectée, à un niveau de réplication virale supérieur à celui des VIH-1/O de l'étude ORIVAO (4.7 Log cp/mL *vs* 4 Log cp/ml), voir plus proche de celui des VIH-1/M (4.4 Log cp/ml) [249] ; et à un niveau basal de CD4 également plus élevé (315 mm^{-3} *vs* 250 mm^{-3}). Cette comparaison est cependant limitée par l'absence de date précise de contamination et donc, de connaissance de la durée réelle de la maladie chez les individus infectés. Pour autant, sur 13 ans de suivi médical, la patiente semblait conserver un bon état général malgré une co-infection par le virus de l'hépatite C, découverte parallèlement au VIH mais non traitée du fait d'un très faible score de fibrose hépatique. On peut aussi noter que l'état immunitaire de la patiente ne s'est pas fortement dégradé pendant les 5 années sans traitement ARV, et ce, malgré une réplication active du virus.

Sous une cARV pleinement active, on observait un maintien à long terme du contrôle virologique (CVp indétectable pendant 8 ans) et un gain d'environ 600 CD4 mm^{-3} en fin de suivi. La réponse virologique et immunologique aux ARV au long cours semble donc favorable, en dépit de l'âge avancé de la patiente (70 ans). On aurait

effectivement pu s'attendre à une moindre restauration immunitaire, comme c'est le cas pour les patients de cette tranche d'âge [261,262]. Ces données viro-cliniques pourraient indiquer que cette infection ne présente pas de difficulté thérapeutique.

La rareté du groupe P, comparativement aux VIH-1/O dont la fréquence est estimée à 0.6% au Cameroun [59], est probablement de nature multifactorielle. Une des hypothèses concerne la relative émergence du groupe P dans l'espèce humaine. L'ancêtre commun le plus récent du groupe P a été estimé entre 1950 et 1990 par Sauter et al. [45], estimations recalculées par notre équipe entre 1939 et 1983 (Annexe 7). Le MRCA du groupe P semblerait donc plus tardif par rapport aux estimations des groupes M et O, respectivement entre 1909-1930 [43] et 1914-1944 [27]. Mais le faible nombre de séquences de groupe P (N<5), incrémentées dans le calcul d'horloge moléculaire, ne permet pas d'obtenir un calcul fiable.

Parmi les autres hypothèses, non exclusives mutuellement, la faible capacité du VIH-1/P à contrecarrer l'action des facteurs de restriction, telle la tetherine, a été avancée. En effet, les protéines Vpu, Nef et Env n'agissent pas sur la tetherine, au contraire de Vpu pour les VIH-1/M et dans une moindre mesure Nef pour les VIH-1/O [164]. Aussi, la moindre diffusion du virus pourrait être liée à une moindre capacité d'adaptation de ce groupe. C'est ainsi que la souche RBF168 présente en position gag-30 une méthionine, de manière identique à la plupart des virus simiens ; ce qui contraste avec la lysine marqueur d'adaptation à l'homme, exprimée par la seconde souche de groupe P, 06CMU14788, comme par les séquences ancestrales de VIH-1/M [258]. Par nos travaux, nous avons montré que 6 amplifications successives de RBF168 sur PBMC humains ne semblaient pas favoriser le phénomène d'adaptation à l'hôte, probablement plus lent encore. De plus, en dépit d'un isolement aisé sur CMSP à partir d'échantillons de plasma et cellules (le surnageant obtenu titrait à environ 14 000 pg RT/mL), l'infectiosité de la souche RBF168 était très faible, à moins de 250 TCID50/mL pour les 6 surnageants, de manière reproductible. Par comparaison aux autres groupes de VIH (de 1171 à 250 625 TCID50/mL), ces résultats confirment une très faible infectiosité. Enfin, l'absence de dépistage spécifique du groupe P pourrait contribuer à sa rareté dans la mesure où les travaux précédents ont montré que la diversité génétique du groupe P n'impactait ni les tests sérologiques, ni la quantification virale par les méthodes commerciales [29]. Les investigations menées jusqu'alors pour rechercher ces variants ont été menées sur des collections d'échantillons cliniques récents [30,51] et n'ont pas permis d'identifier de nouvelles souches (2 réactivités sérologiques non confirmées

moléculairement sur 13 700 échantillons testés). C'est pourquoi nous avons réalisé une recherche rétrospective dans des collections d'échantillons simiens et humains datant des années 1990 (N=1 083), parallèlement à une recherche prospective parmi les échantillons diagnostics reçus au Centre Pasteur du Cameroun (N=28 415) entre mars 2013 et juin 2015 (Annexe 7). Notre stratégie comportait un screening sérologique, sur le principe précédemment décrit [146], associé à une confirmation moléculaire spécifique du groupe P. Au final, aucun virus de groupe P n'a été mis en évidence lors de cette étude, ces résultats confirmant bien qu'il s'agit d'une infection extrêmement rare et qui a problablement diffusé de manière limitée dans l'espèce humaine.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats montrent que l'infection à VIH-1/P semble répondre favorablement aux ARV, dans le cadre d'une prise en charge similaire à celle des VIH-1/M, tout comme observé pour les infections à VIH-1/O dans l'étude ORIVAO. Malgré des similarités entre groupes P et O, certaines distinctions persistent : concernant le polymorphisme génétique, les propriétés d'infectiosité et d'adaptation à l'hôte. En ce sens, la souche RBF168 semble se rapprocher de ses ancêtres simiens et il aurait été très informatif d'avoir des données viro-cliniques sur la souche 06CMU14788, qui elle, semble plus adaptée à l'homme. Bien des pistes sont encore à explorer pour étudier les mécanismes liés à cette infection : les corécepteurs, les facteurs de restriction (autre que la tetherine) et comprendre ce qui a conduit à la probable impasse épidémiologique des VIH-1/P.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La problématique de la divergence génétique des variants non-M du VIH-1, n'est plus, ces dernières années en France, à la caractérisation et au suivi virologique, mais à la prise en charge thérapeutique des patients, et à l'évolution au long cours sous cARV, notamment avec les classes thérapeutiques les plus récentes, pour lesquelles les données sont peu nombreuses.

Nos travaux ont étudié à partir d'un large panel la sensibilité phénotypique et génotypique des VIH-1 non-M à deux nouvelles classes d'ARV (INI et inhibiteurs d'attachement, représentés par le fostemsavir). En dépit de la variabilité génétique de ces variants, nous avons observé une bonne sensibilité globale aux INI (en particulier RAL et DTG) mais aussi une résistance naturelle, groupe-dépendante au fostemsavir. Les résultats issus de notre étude *in vivo* chez des patients infectés par un VIH-1/O, ont quant à eux mis en évidence une réplication virale de 4 log qui semble intermédiaire par rapport aux VIH-1/M et aux VIH-2. Cette observation fait écho à de précédents travaux qui ont montré l'infériorité des VIH-1/O en termes de capacité réplicative [163] ou d'activité enzymatique, en particulier pour l'intégrase, au niveau de l'étape de transfert de brin [225]. Ces différences sont probablement à rapprocher des origines simiennes différentes, de chacun de ces variants à savoir des VIS issus d'espèces distinctes : chimpanzés, gorilles et mangabeys enfumés, respectivement pour les VIH-1/M, VIH-1/O et VIH-2. La moindre production virale et la faible intégration des génomes du groupe O, nous donnent maintenant pour perspectives d'étudier les réservoirs cellulaires, notamment par la quantification spécifique de l'ADN intégré.

Par ailleurs, notre travail a mis en évidence une très bonne réponse immuno-virologique aux ARV (particulièrement aux INI) des patients infectés par des VIH-1/O, mais également de la patiente infectée par un VIH-1/P, ce qui est bien différent des infections à VIH-2 qui présentent une évolution sous traitement bien moindre [263,264]. Concernant le VIH-1/P, virus décrit comme le plus proche des VISgor sur un plan phylogénétique, sa faible diffusion associée à une faible pathogénicité le rapproche des VIH-2 et font évoquer une probable impasse épidémiologique de cette infection (comme certains groupes rares de VIH-2). Pour autant son important niveau de réplication, en

l'absence de déterminants décrits comme facteurs d'adaptation à l'homme, pose encore question…

Les recommandations françaises et européennes actuelles, préconisant l'utilisation des INI ou du DRV/r pour le traitement des adultes infectés par un VIH-1/M, satisfont globalement à la prise en charge des infections à VIH-1 non-M, et peuvent être suivies en l'absence d'une identification spécifique du variant [169,189]. Il n'en demeure pas moins que seuls les schémas de trithérapies vraies, où les 3 ARV associés sont pleinement actifs, ont été évalués. Les stratégies actuelles d'allègement en mono ou bithérapie doivent encore être étudiées. Notre travail a permis de montrer que le polymorphisme génétique des variants sur la région de l'IN ne semble pas avoir d'impact sur la sensibilité naturelle aux INI et que des voies de résistance identiques aux VIH-1/M sont sélectionnées à l'échec. Il est également possible qu'il y ait des MAR spécifiques des VIH-1/O et/ou que les mutations naturelles aient un effet facilitateur sur la sélection d'autres voies de résistance ou même un caractère épistatique. D'autre part, des données récentes démontrent qu'il existe des déterminants de la résistance en dehors des régions cibles des ARV. En effet, de fortes concentrations en DTG induisent, *in vitro*, la sélection d'un motif dans le gène accessoire *nef* (3'PPT) générant un haut niveau de résistance à tous les INI [265]. Ces résultats pourraient indiquer qu'il existe encore de nouveaux motifs génétiques à décrypter pour mieux comprendre comment le virus, dans son ensemble, déjoue la pression thérapeutique. Les essais phénotypiques, loin d'élucider complètement cette question, peuvent néanmoins contribuer à l'éclaircir. En effet, la méthode choisie pour nos essais, est basée sur l'infection de CMSP humaines par des isolats cliniques, virions complets infectieux. Elle semble donc être le reflet le plus approchant de la réalité virale *in vivo*. Mais nos résultats soulignent deux points importants : l'utilisation d'un panel large pour obtenir la meilleure représentativité de la diversité virale intra-groupe ; le choix de la souche prise pour référence et de la valeur seuil de FC, socles de l'interprétation des résultats. Malgré des propositions d'harmonisation maintenant anciennes [260], il n'existe pas actuellement de standardisation des études phénotypiques, ce qui engendre une comparaison relativement limitée des résultats. Il est vrai que la disponibilité de tests phénotypiques commerciaux, basé sur l'utilisation de virus recombinant, a rendu ces explorations bien plus accessibles, mais aucun n'a été validé sur les variants divergents du VIH-1/M.

L’ensemble de nos données a finalement contribué à améliorer les connaissances sur la prise en charge thérapeutique des infections à variants divergents du variant pandémique. Nous avons ainsi analysé l’efficacité de molécules récentes ou en développement sur ces virus. Mais l’évaluation des ARV pour lesquels ils existent peu de données (DRV, maraviroc, etc) et d’autres molécules récentes (cenicriviroc, bictegravir, cabotegravir, doravirine, elsulfavirine…), doit maintenant être poursuivie. Dans cette optique, un premier projet visant à étudier la réponse phénotypique au maraviroc et cenicriviroc sur un large panel d’échantillons VIH-1/O, est actuellement en cours (étude TROPI-CO).

En conclusion, même si la diversité des variants divergents est maintenant bien connue pour son impact sur les techniques moléculaires et de diagnostic, ses conséquences sur la réponse immuno-virologique avec les stratégies thérapeutiques actuelles restent à surveiller. Ceci est particulièrement important dans le contexte clinique moderne, qui tend à une prise en charge la plus adaptée possible au virus infectant, mais surtout au patient, à son observance et à sa qualité de vie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1.Centers for Disease C. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. ***MMWR Morb Mortal Wkly Rep*** 1981;30:250-2.

2.Centers for Disease C. Follow-up on Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia. ***MMWR Morb Mortal Wkly Rep*** 1981;30:409-10.

3.Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F*, et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). ***Science*** 1983;220:868-71.

4.WHO/AFRO. *The health of the people: what works - the African Regional Health Report 2014*. Luxembourg, 2014.

5.Barin F, M'Boup S, Denis F*, et al.* Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. ***Lancet*** 1985;2:1387-9.

6.Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F*, et al.* Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. ***Science*** 1986;233:343-6.

7.Barin F, McLane MF, Allan JS*, et al.* Virus envelope protein of HTLV-III represents major target antigen for antibodies in AIDS patients. ***Science*** 1985;228:1094-6.

8.Guyader M, Emerman M, Sonigo P*, et al.* Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. ***Nature*** 1987;326:662-9.

9.Alizon M, Wain-Hobson S, Montagnier L*, et al.* Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients. ***Cell*** 1986;46:63-74.

10.Benn S, Rutledge R, Folks T*, et al.* Genomic heterogeneity of AIDS retroviral isolates from North America and Zaire. ***Science*** 1985;230:949-51.

11.Myers G, MacInnes K, Korber B. The emergence of simian/human immunodeficiency viruses. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 1992;8:373-86.

12.Louwagie J, McCutchan FE, Peeters M*, et al.* Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. ***AIDS*** 1993;7:769-80.

13.Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA*, et al.* HIV-1 nomenclature proposal. ***Science*** 2000;288:55-6.

14.Hemelaar J. Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. ***J Infect*** 2013;66:391-400.

15.Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE*, et al.* The challenge of HIV-1 subtype diversity. ***N Engl J Med*** 2008;358:1590-602.

16.De Leys R, Vanderborght B, Vanden Haesevelde M*, et al.* Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. ***J Virol*** 1990;64:1207-16.

17. Gurtler LG, Hauser PH, Eberle J*, et al.* A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. ***J Virol*** 1994;68:1581-5.

18. Charneau P, Borman AM, Quillent C*, et al.* Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. ***Virology*** 1994;205:247-53.

19. Loussert-Ajaka I, Chaix ML, Korber B*, et al.* Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. ***J Virol*** 1995;69:5640-9.

20. Janssens W, Heyndrickx L, Van der Auwera G*, et al.* Interpatient genetic variability of HIV-1 group O. ***AIDS*** 1999;13:41-8.

21. Bibollet-Ruche F, Peeters M, Mboup S*, et al.* Molecular characterization of the envelope transmembrane glycoprotein of 13 new human immunodeficiency virus type 1 group O strains from six different African countries. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 1998;14:1281-5.

22. Quinones-Mateu ME, Albright JL, Mas A*, et al.* Analysis of pol gene heterogeneity, viral quasispecies, and drug resistance in individuals infected with group O strains of human immunodeficiency virus type 1. ***J Virol*** 1998;72:9002-15.

23. Roques P, Robertson DL, Souquiere S*, et al.* Phylogenetic analysis of 49 newly derived HIV-1 group O strains: high viral diversity but no group M-like subtype structure. ***Virology*** 2002;302:259-73.

24. Yamaguchi J, Bodelle P, Vallari AS*, et al.* HIV infections in northwestern Cameroon: identification of HIV type 1 group O and dual HIV type 1 group M and group O infections. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 2004;20:944-57.

25. Leoz M, Depatureaux A, Vessiere A*, et al.* Integrase polymorphism and HIV-1 group O diversity. ***AIDS*** 2008;22:1239-43.

26. Tebit DM, Lobritz M, Lalonde M*, et al.* Divergent evolution in reverse transcriptase (RT) of HIV-1 group O and M lineages: impact on structure, fitness, and sensitivity to nonnucleoside RT inhibitors. ***J Virol*** 2010;84:9817-30.

27. Leoz M, Feyertag F, Kfutwah A*, et al.* The Two-Phase Emergence of Non Pandemic HIV-1 Group O in Cameroon. ***PLoS Pathog*** 2015;11:e1005029.

28. Simon F, Mauclere P, Roques P*, et al.* Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. ***Nat Med*** 1998;4:1032-7.

29. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE*, et al.* A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. ***Nat Med*** 2009;15:871-2.

30. Vallari A, Holzmayer V, Harris B*, et al.* Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. ***J Virol*** 2011;85:1403-7.

31. Gao F, Bailes E, Robertson DL*, et al.* Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. ***Nature*** 1999;397:436-41.

32. Vanden Haesevelde MM, Peeters M, Jannes G*, et al.* Sequence analysis of a highly divergent HIV-1-related lentivirus isolated from a wild captured chimpanzee. ***Virology*** 1996;221:346-50.

33. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y*, et al.* Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. ***Science*** 2006;313:523-6.

34. Peeters M, Honore C, Huet T*, et al.* Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. ***AIDS*** 1989;3:625-30.

35. Huet T, Cheynier R, Meyerhans A*, et al.* Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. ***Nature*** 1990;345:356-9.

36. Van Heuverswyn F, Li Y, Neel C*, et al.* Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. ***Nature*** 2006;444:164.

37. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM*, et al.* AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. ***Science*** 2000;287:607-14.

38. Mourez T, Simon F, Plantier JC. Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. ***Clin Microbiol Rev*** 2013;26:448-61.

39. Takehisa J, Kraus MH, Ayouba A*, et al.* Origin and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas. ***J Virol*** 2009;83:1635-48.

40. D'Arc M, Ayouba A, Esteban A*, et al.* Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 2015;112:E1343-52.

41. Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ*, et al.* An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. ***Nature*** 1998;391:594-7.

42. Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE*, et al.* Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. ***Nature*** 2008;455:661-4.

43. Faria NR, Rambaut A, Suchard MA*, et al.* HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. ***Science*** 2014;346:56-61.

44. Wertheim JO, Worobey M. Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2. ***PLoS Comput Biol*** 2009;5:e1000377.

45. Sauter D, Schindler M, Specht A*, et al.* Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. ***Cell Host Microbe*** 2009;6:409-21.

46. Pepin J. The expansion of HIV-1 in colonial Leopoldville, 1950s: driven by STDs or STD control? ***Sex Transm Infect*** 2012;88:307-12.

47. ONUSIDA. Dernières statistiques sur l'état de l'épidémie de SIDA: ONUSIDA, 2017.

48. ONUSIDA. *Le rapport sur les villes*. Genève, 2014.

49. Sante-Publique-France. Point épidémiologique - Découvertes de séropositivité VIH et de SIDA, 2017:6.

50. Wertheim JO, Leigh Brown AJ, Hepler NL*, et al.* The global transmission network of HIV-1. ***J Infect Dis*** 2014;209:304-13.

51. Rodgers MA, Vallari AS, Harris B*, et al.* Identification of rare HIV-1 Group N, HBV AE, and HTLV-3 strains in rural South Cameroon. ***Virology*** 2017;504:141-51.

52. Ayouba A, Souquieres S, Njinku B*, et al.* HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. ***AIDS*** 2000;14:2623-5.

53. Bodelle P, Vallari A, Coffey R*, et al.* Identification and genomic sequence of an HIV type 1 group N isolate from Cameroon. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 2004;20:902-8.

54. Vallari A, Bodelle P, Ngansop C*, et al.* Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 2010;26:109-15.

55. Yamaguchi J, McArthur CP, Vallari A*, et al.* HIV-1 Group N: evidence of ongoing transmission in Cameroon. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 2006;22:453-7.

56. Yamaguchi J, Coffey R, Vallari A*, et al.* Identification of HIV type 1 group N infections in a husband and wife in Cameroon: viral genome sequences provide evidence for horizontal transmission. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 2006;22:83-92.

57. Pere H, Roques P, Talla F*, et al.* Sustained virological failure in Cameroonese patient infected by HIV-1 group N evidenced by sequence-based genotyping assay. ***AIDS*** 2015;29:1267-9.

58. Delaugerre C, De Oliveira F, Lascoux-Combe C*, et al.* HIV-1 group N: travelling beyond Cameroon. ***Lancet*** 2011;378:1894.

59. Villabona-Arenas CJ, Domyeum J, Mouacha F*, et al.* HIV-1 group O infection in Cameroon from 2006 to 2013: Prevalence, genetic diversity, evolution and public health challenges. ***Infect Genet Evol*** 2015;36:210-6.

60. Vessiere A, Rousset D, Kfutwah A*, et al.* Diagnosis and monitoring of HIV-1 group O-infected patients in Cameroun. ***J Acquir Immune Defic Syndr*** 2010;53:107-10.

61. Ayouba A, Mauclere P, Martin PM*, et al.* HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998. ***Emerg Infect Dis*** 2001;7:466-7.

62. Peeters M, Gaye A, Mboup S*, et al.* Presence of HIV-1 group O infection in West Africa. ***AIDS*** 1996;10:343-4.

63. Sullivan PS, Do AN, Ellenberger D*, et al.* Human immunodeficiency virus (HIV) subtype surveillance of African-born persons at risk for group O and group N HIV infections in the United States. ***J Infect Dis*** 2000;181:463-9.

64. Gould K. Infection with HIV-1 group O. ***AIDS Patient Care STDS*** 1997;11:399-405.

65. Depatureaux A, leBlanc R, Moisi D*, et al.* The first report of HIV-1 group O infection in Canada. ***J Infect Dis Ther*** 2015;3:203.

66. Lindboe CF, Froland SS, Wefring KW*, et al.* Autopsy findings in three family members with a presumably acquired immunodeficiency syndrome of unknown etiology. ***Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A*** 1986;94:117-23.

67. Froland SS, Jenum P, Lindboe CF*, et al.* HIV-1 infection in Norwegian family before 1970. ***Lancet*** 1988;1:1344-5.

68. Hampl H, Sawitzky D, Stoffler-Meilicke M*, et al.* First case of HIV-1 subtype 0 infection in Germany. ***Infection*** 1995;23:369-70.

69. Briz V, Garrido C, Poveda E*, et al.* Raltegravir and etravirine are active against HIV type 1 group O. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 2009;25:225-7.

70. Soriano V, Gutierrez M, Garcia-Lerma G*, et al.* First case of HIV-1 group O infection in Spain. ***Vox Sang*** 1996;71:66.

71. Garcia-Lerma G, Gutierrez M, Mas A*, et al.* [Report of the first 2 cases of HIV-1 group O infection in Spain]. ***Med Clin (Barc)*** 1996;107:418-21.

72. Mas A, Quinones-Mateu E, Soriano V*, et al.* Env gene characterization of the first HIV type 1 group O Spanish isolate. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 1996;12:1647-9.

73. Barin F, Cazein F, Pillonel J*, et al.* Prevalence of HIV-2 and HIV-1 group O infections among new HIV diagnoses in France, 2003-2015. IAS. Paris, 2017.

74. Agut H, Candotti D, Rabanel B*, et al.* Isolation of atypical HIV-1-related retrovirus from AIDS patient. ***Lancet*** 1992;340:681-2.

75. Paillart JC, Shehu-Xhilaga M, Marquet R*, et al.* Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. ***Nat Rev Microbiol*** 2004;2:461-72.

76. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC*, et al.* CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. ***Science*** 1996;272:1955-8.

77. Choe H, Farzan M, Sun Y*, et al.* The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. ***Cell*** 1996;85:1135-48.

78. Klatzmann D, Barre-Sinoussi F, Nugeyre MT*, et al.* Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. ***Science*** 1984;225:59-63.

79. Choi WT, An J. Biology and clinical relevance of chemokines and chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in human diseases. ***Exp Biol Med (Maywood)*** 2011;236:637-47.

80. Reeves JD, Gallo SA, Ahmad N*, et al.* Sensitivity of HIV-1 to entry inhibitors correlates with envelope/coreceptor affinity, receptor density, and fusion kinetics. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 2002;99:16249-54.

81. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. ***Nat Rev Microbiol*** 2012;10:279-90.

82. Weber IT, Miller M, Jaskolski M*, et al.* Molecular modeling of the HIV-1 protease and its substrate binding site. ***Science*** 1989;243:928-31.

83. Toth G, Borics A. Flap opening mechanism of HIV-1 protease. ***J Mol Graph Model*** 2006;24:465-74.

84.Toth G, Borics A. Closing of the flaps of HIV-1 protease induced by substrate binding: a model of a flap closing mechanism in retroviral aspartic proteases. ***Biochemistry*** 2006;45:6606-14.

85.Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. ***Microbiol Rev*** 1993;57:183-289.

86.Sarafianos SG, Marchand B, Das K*, et al.* Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. ***J Mol Biol*** 2009;385:693-713.

87.Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM*, et al.* Crystal structure at 3.5 A resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. ***Science*** 1992;256:1783-90.

88.Jacobo-Molina A, Ding J, Nanni RG*, et al.* Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 A resolution shows bent DNA. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 1993;90:6320-4.

89.Schauer G, Leuba S, Sluis-Cremer N. Biophysical Insights into the Inhibitory Mechanism of Non-Nucleoside HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors. ***Biomolecules*** 2013;3:889-904.

90.Asante-Appiah E, Skalka AM. A metal-induced conformational change and activation of HIV-1 integrase. ***J Biol Chem*** 1997;272:16196-205.

91.Craigie R. HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics. ***J Biol Chem*** 2001;276:23213-6.

92.Dyda F, Hickman AB, Jenkins TM*, et al.* Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases. ***Science*** 1994;266:1981-6.

93.Ellison V, Gerton J, Vincent KA*, et al.* An essential interaction between distinct domains of HIV-1 integrase mediates assembly of the active multimer. ***J Biol Chem*** 1995;270:3320-6.

94.Wolfe AL, Felock PJ, Hastings JC*, et al.* The role of manganese in promoting multimerization and assembly of human immunodeficiency virus type 1 integrase as a catalytically active complex on immobilized long terminal repeat substrates. ***J Virol*** 1996;70:1424-32.

95.Lodi PJ, Ernst JA, Kuszewski J*, et al.* Solution structure of the DNA binding domain of HIV-1 integrase. ***Biochemistry*** 1995;34:9826-33.

96.Eijkelenboom AP, Lutzke RA, Boelens R*, et al.* The DNA-binding domain of HIV-1 integrase has an SH3-like fold. ***Nat Struct Biol*** 1995;2:807-10.

97.Cereseto A, Manganaro L, Gutierrez MI*, et al.* Acetylation of HIV-1 integrase by p300 regulates viral integration. ***EMBO J*** 2005;24:3070-81.

98.Huang H, Chopra R, Verdine GL*, et al.* Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. ***Science*** 1998;282:1669-75.

99.Whitcomb JM, Hughes SH. Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems. ***Annu Rev Cell Biol*** 1992;8:275-306.

100.Ellison V, Brown PO. A stable complex between integrase and viral DNA ends mediates human immunodeficiency virus integration in vitro. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 1994;91:7316-20.

101.Bushman F, Lewinski M, Ciuffi A*, et al.* Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. ***Nat Rev Microbiol*** 2005;3:848-58.

102.Schroder AR, Shinn P, Chen H*, et al.* HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. ***Cell*** 2002;110:521-9.

103.Albanese A, Arosio D, Terreni M*, et al.* HIV-1 pre-integration complexes selectively target decondensed chromatin in the nuclear periphery. ***PLoS One*** 2008;3:e2413.

104.Van Maele B, Busschots K, Vandekerckhove L*, et al.* Cellular co-factors of HIV-1 integration. ***Trends Biochem Sci*** 2006;31:98-105.

105.Busschots K, Voet A, De Maeyer M*, et al.* Identification of the LEDGF/p75 binding site in HIV-1 integrase. ***J Mol Biol*** 2007;365:1480-92.

106.Lusic M, Siliciano RF. Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. ***Nat Rev Microbiol*** 2017;15:69-82.

107.Sakalian M, Parker SD, Weldon RA, Jr.*, et al.* Synthesis and assembly of retrovirus Gag precursors into immature capsids in vitro. ***J Virol*** 1996;70:3706-15.

108.Singh AR, Hill RL, Lingappa JR. Effect of mutations in Gag on assembly of immature human immunodeficiency virus type 1 capsids in a cell-free system. ***Virology*** 2001;279:257-70.

109.Carlson LA, Briggs JA, Glass B*, et al.* Three-dimensional analysis of budding sites and released virus suggests a revised model for HIV-1 morphogenesis. ***Cell Host Microbe*** 2008;4:592-9.

110.Jacks T. Translational suppression in gene expression in retroviruses and retrotransposons. ***Curr Top Microbiol Immunol*** 1990;157:93-124.

111.Strebel K. HIV accessory proteins versus host restriction factors. ***Curr Opin Virol*** 2013;3:692-9.

112.Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD*, et al.* Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. ***Nature*** 2002;418:646-50.

113.Yu X, Yu Y, Liu B*, et al.* Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. ***Science*** 2003;302:1056-60.

114.Tristem M, Marshall C, Karpas A*, et al.* Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpx and vpr. ***EMBO J*** 1992;11:3405-12.

115.Gibbs JS, Lackner AA, Lang SM*, et al.* Progression to AIDS in the absence of a gene for vpr or vpx. ***J Virol*** 1995;69:2378-83.

116.Varthakavi V, Heimann-Nichols E, Smith RM*, et al.* Identification of calcium-modulating cyclophilin ligand as a human host restriction to HIV-1 release overcome by Vpu. ***Nat Med*** 2008;14:641-7.

117.Schindler M, Munch J, Kutsch O*, et al.* Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1. ***Cell*** 2006;125:1055-67.

118.Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M*, et al.* HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. ***Science*** 1996;271:1582-6.

119.Abram ME, Ferris AL, Shao W*, et al.* Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. ***J Virol*** 2010;84:9864-78.

120.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;69:5087-94.

121.Nowak MA. What is a quasispecies? ***Trends Ecol Evol*** 1992;7:118-21.

122.Meyerhans A, Cheynier R, Albert J*, et al.* Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. ***Cell*** 1989;58:901-10.

123.Weiss KK, Chen R, Skasko M*, et al.* A role for dNTP binding of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase in viral mutagenesis. ***Biochemistry*** 2004;43:4490-500.

124.Jewell NA, Chen R, Raices R*, et al.* Nucleoside reverse transcriptase inhibitors and HIV mutagenesis. ***J Antimicrob Chemother*** 2003;52:547-50.

125.Back NK, Nijhuis M, Keulen W*, et al.* Reduced replication of 3TC-resistant HIV-1 variants in primary cells due to a processivity defect of the reverse transcriptase enzyme. ***EMBO J*** 1996;15:4040-9.

126.Coffin JM. Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses. ***J Gen Virol*** 1979;42:1-26.

127.Temin HM. Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 1993;90:6900-3.

128.Svarovskaia ES, Delviks KA, Hwang CK*, et al.* Structural determinants of murine leukemia virus reverse transcriptase that affect the frequency of template switching. ***J Virol*** 2000;74:7171-8.

129.Andrews SM, Rowland-Jones S. Recent advances in understanding HIV evolution. ***F1000Res*** 2017;6:597.

130.Garcia PM, Kalish LA, Pitt J*, et al.* Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group. ***N Engl J Med*** 1999;341:394-402.

131.Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N*, et al.* Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. ***N Engl J Med*** 2000;342:921-9.

132.Abrahams MR, Anderson JA, Giorgi EE*, et al.* Quantitating the multiplicity of infection with human immunodeficiency virus type 1 subtype C reveals a non-poisson distribution of transmitted variants. ***J Virol*** 2009;83:3556-67.

133.Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. ***Lancet*** 2014;384:258-71.

134.Jonassen TO, Stene-Johansen K, Berg ES*, et al.* Sequence analysis of HIV-1 group O from Norwegian patients infected in the 1960s. ***Virology*** 1997;231:43-7.

135.Nkengasong JN, Fransen K, Willems B*, et al.* Virologic, immunologic, and clinical follow-up of a couple infected by the human immunodeficiency virus type one, group O. ***J Med Virol*** 1997;51:202-9.

136.Buckheit RW, 3rd, Sexauer SB, Sedaghat AR*, et al.* Long-term control of viral replication in a Group O, human immunodeficiency virus type 1-infected individual. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 2014;30:511-3.

137.Chaix-Baudier ML, Chappey C, Burgard M*, et al.* First case of mother-to-infant HIV type 1 group O transmission and evolution of C2V3 sequences in the infected child. French HIV Pediatric Cohort Study Group. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 1998;14:15-23.

138.Gueudin M, Lemee V, Ferre V*, et al.* Virologic diagnosis and follow-up of children born to mothers infected by HIV-1 group O. ***J Acquir Immune Defic Syndr*** 2004;36:639-41.

139.Jaffe HW, Schochetman G. Group O human immunodeficiency virus-1 infections. ***Infect Dis Clin North Am*** 1998;12:39-46.

140.Loussert-Ajaka I, Ly TD, Chaix ML*, et al.* HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients. ***Lancet*** 1994;343:1393-4.

141.Simon F, Ly TD, Baillou-Beaufils A*, et al.* Sensitivity of screening kits for anti-HIV-1 subtype O antibodies. ***AIDS*** 1994;8:1628-9.

142.Zouhair S, Roussin-Bretagne S, Moreau A*, et al.* Group o human immunodeficiency virus type 1 infection that escaped detection in two immmunoassays. ***J Clin Microbiol*** 2006;44:662-5.

143.Mourez T, Lemee V, Delbos V*, et al.* Performance of 9 rapid diagnostic HIV tests on a wide panel of whole blood samples. IAS. Paris, 2017.

144.Lemee V, Leoz M, Etienne M*, et al.* Performance of the Liaison XL Murex HIV Ab/Ag test on clinical samples representing current epidemic HIV variants. ***J Clin Microbiol*** 2014;52:3277-9.

145.Ly TD, Plantier JC, Leballais L*, et al.* The variable sensitivity of HIV Ag/Ab combination assays in the detection of p24Ag according to genotype could compromise the diagnosis of early HIV infection. ***J Clin Virol*** 2012;55:121-7.

146.Simon F, Souquiere S, Damond F*, et al.* Synthetic peptide strategy for the detection of and discrimination among highly divergent primate lentiviruses. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 2001;17:937-52.

147.Barin F, Lahbabi Y, Buzelay L*, et al.* Diversity of antibody binding to V3 peptides representing consensus sequences of HIV type 1 genotypes A to E: an approach for HIV type 1 serological subtyping. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 1996;12:1279-89.

148.Swanson P, Harris BJ, Holzmayer V*, et al.* Quantification of HIV-1 group M (subtypes A-G) and group O by the LCx HIV RNA quantitative assay. ***J Virol Methods*** 2000;89:97-108.

149.Plantier JC, Gueudin M, Damond F*, et al.* Plasma RNA quantification and HIV-1 divergent strains. ***J Acquir Immune Defic Syndr*** 2003;33:1-7.

150.Gueudin M, Baron A, Alessandri-Gradt E*, et al.* Performance Evaluation of the New HIV-1 Quantification Assay, Xpert HIV-1 Viral Load, on a Wide Panel of HIV-1 Variants. ***J Acquir Immune Defic Syndr*** 2016;72:521-6.

151.Gueudin M, Plantier JC, Damond F*, et al.* Plasma viral RNA assay in HIV-1 group O infection by real-time PCR. ***J Virol Methods*** 2003;113:43-9.

152.Gueudin M, Leoz M, Lemee V*, et al.* A new real-time quantitative PCR for diagnosis and monitoring of HIV-1 group O infection. ***J Clin Microbiol*** 2012;50:831-6.

153.Gorry PR, Ancuta P. Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. ***Curr HIV/AIDS Rep*** 2011;8:45-53.

154.Morner A, Bjorndal A, Albert J*, et al.* Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates, like HIV-1 isolates, frequently use CCR5 but show promiscuity in coreceptor usage. ***J Virol*** 1999;73:2343-9.

155.Peeters M, Vincent R, Perret JL*, et al.* Evidence for differences in MT2 cell tropism according to genetic subtypes of HIV-1: syncytium-inducing variants seem rare among subtype C HIV-1 viruses. ***J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*** 1999;20:115-21.

156.Tebit DM, Patel H, Ratcliff A*, et al.* HIV-1 Group O Genotypes and Phenotypes: Relationship to Fitness and Susceptibility to Antiretroviral Drugs. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 2016;32:676-88.

157.Dittmar MT, Zekeng L, Kaptue L*, et al.* Coreceptor requirements of primary HIV type 1 group O isolates from Cameroon. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 1999;15:707-12.

158.Zhang L, Huang Y, He T*, et al.* HIV-1 subtype and second-receptor use. ***Nature*** 1996;383:768.

159.Zhang L, Carruthers CD, He T*, et al.* HIV type 1 subtypes, coreceptor usage, and CCR5 polymorphism. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 1997;13:1357-66.

160.Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. ***Annu Rev Microbiol*** 1997;51:151-78.

161.Harrigan PR, Bloor S, Larder BA. Relative replicative fitness of zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 isolates in vitro. ***J Virol*** 1998;72:3773-8.

162.Martinez-Picado J, Savara AV, Sutton L*, et al.* Replicative fitness of protease inhibitor-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1. ***J Virol*** 1999;73:3744-52.

163.Arien KK, Abraha A, Quinones-Mateu ME*, et al.* The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates. ***J Virol*** 2005;79:8979-90.

164.Sauter D, Hue S, Petit SJ*, et al.* HIV-1 Group P is unable to antagonize human tetherin by Vpu, Env or Nef. ***Retrovirology*** 2011;8:103.

165.Yang SJ, Lopez LA, Exline CM*, et al.* Lack of adaptation to human tetherin in HIV-1 group O and P. ***Retrovirology*** 2011;8:78.

166.Mack K, Starz K, Sauter D*, et al.* Efficient Vpu-Mediated Tetherin Antagonism by an HIV-1 Group O Strain. ***J Virol*** 2017;91.

167.Sauter D, Unterweger D, Vogl M*, et al.* Human tetherin exerts strong selection pressure on the HIV-1 group N Vpu protein. ***PLoS Pathog*** 2012;8:e1003093.

168.Cassan E, Arigon-Chifolleau AM, Mesnard JM*, et al.* Concomitant emergence of the antisense protein gene of HIV-1 and of the pandemic. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 2016;113:11537-42.

169.Morlat P. *Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH, recommandations du groupe d'experts*: La documentation française, 2017.

170.Rose JD, Rhea AM, Weber J*, et al.* Current tests to evaluate HIV-1 coreceptor tropism. ***Curr Opin HIV AIDS*** 2009;4:136-42.

171.Shioda T, Levy JA, Cheng-Mayer C. Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 1992;89:9434-8.

172.Jensen MA, Li FS, van 't Wout AB*, et al.* Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. ***J Virol*** 2003;77:13376-88.

173.Lengauer T, Sander O, Sierra S*, et al.* Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. ***Nat Biotechnol*** 2007;25:1407-10.

174.Coakley E, Reeves JD, Huang W*, et al.* Comparison of human immunodeficiency virus type 1 tropism profiles in clinical samples by the Trofile and MT-2 assays. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2009;53:4686-93.

175.Trouplin V, Salvatori F, Cappello F*, et al.* Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using a recombinant phenotypic assay. ***J Virol*** 2001;75:251-9.

176.Raymond S, Delobel P, Mavigner M*, et al.* Development and performance of a new recombinant virus phenotypic entry assay to determine HIV-1 coreceptor usage. ***J Clin Virol*** 2010;47:126-30.

177.De Clercq E. New developments in anti-HIV chemotherapy. ***Biochim Biophys Acta*** 2002;1587:258-75.

178.Yarchoan R, Broder S. Development of antiretroviral therapy for the acquired immunodeficiency syndrome and related disorders. A progress report. ***N Engl J Med*** 1987;316:557-64.

179.Das K, Clark AD, Jr., Lewi PJ*, et al.* Roles of conformational and positional adaptability in structure-based design of TMC125-R165335 (etravirine) and related non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors that are highly potent and effective against wild-type and drug-resistant HIV-1 variants. ***J Med Chem*** 2004;47:2550-60.

180.de Bethune MP. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: a review of the last 20 years (1989-2009). ***Antiviral Res*** 2010;85:75-90.

181.Kempf DJ, Marsh KC, Kumar G*, et al.* Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir. ***Antimicrob Agents Chemother*** 1997;41:654-60.

182.King NM, Prabu-Jeyabalan M, Bandaranayake RM*, et al.* Extreme entropy-enthalpy compensation in a drug-resistant variant of HIV-1 protease. ***ACS Chem Biol*** 2012;7:1536-46.

183.Espeseth AS, Felock P, Wolfe A*, et al.* HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 2000;97:11244-9.

184.McColl DJ, Chen X. Strand transfer inhibitors of HIV-1 integrase: bringing IN a new era of antiretroviral therapy. ***Antiviral Res*** 2010;85:101-18.

185.Jones J, Taylor BS, Tieu HV*, et al.* CROI 2017: Advances in Antiretroviral Therapy. ***Top Antivir Med*** 2017;25:51-67.

186.Sax PE, DeJesus E, Crofoot G*, et al.* Bictegravir versus dolutegravir, each with emtricitabine and tenofovir alafenamide, for initial treatment of HIV-1 infection: a randomised, double-blind, phase 2 trial. ***Lancet HIV*** 2017;4:e154-e60.

187.Margolis DA, Brinson CC, Smith GH*, et al.* Cabotegravir plus rilpivirine, once a day, after induction with cabotegravir plus nucleoside reverse transcriptase inhibitors in antiretroviral-naive adults with HIV-1 infection (LATTE): a randomised, phase 2b, dose-ranging trial. ***Lancet Infect Dis*** 2015;15:1145-55.

188.Volberding PA. HIV Treatment and Prevention: An Overview of Recommendations From the IAS-USA Antiretroviral Guidelines Panel. ***Top Antivir Med*** 2017;25:17-24.

189.European guidelines for the clinical management and treatment of HIV-infected adults in Europe, v 9.0. In: Society EAC, ed., 2017:103.

190.Nettles RE, Schurmann D, Zhu L*, et al.* Pharmacodynamics, safety, and pharmacokinetics of BMS-663068, an oral HIV-1 attachment inhibitor in HIV-1-infected subjects. ***J Infect Dis*** 2012;206:1002-11.

191.Lalezari JP, Latiff GH, Brinson C*, et al.* Safety and efficacy of the HIV-1 attachment inhibitor prodrug BMS-663068 in treatment-experienced individuals: 24 week results of AI438011, a phase 2b, randomised controlled trial. ***Lancet HIV*** 2015;2:e427-37.

192.Kelly BN, Kyere S, Kinde I*, et al.* Structure of the antiviral assembly inhibitor CAP-1 complex with the HIV-1 CA protein. ***J Mol Biol*** 2007;373:355-66.

193.Lemke CT, Titolo S, von Schwedler U*, et al.* Distinct effects of two HIV-1 capsid assembly inhibitor families that bind the same site within the N-terminal domain of the viral CA protein. ***J Virol*** 2012;86:6643-55.

194.Kortagere S, Madani N, Mankowski MK*, et al.* Inhibiting early-stage events in HIV-1 replication by small-molecule targeting of the HIV-1 capsid. ***J Virol*** 2012;86:8472-81.

195.Shi J, Zhou J, Shah VB*, et al.* Small-molecule inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection by virus capsid destabilization. ***J Virol*** 2011;85:542-9.

196.Lamorte L, Titolo S, Lemke CT*, et al.* Discovery of novel small-molecule HIV-1 replication inhibitors that stabilize capsid complexes. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2013;57:4622-31.

197.Fricke T, White TE, Schulte B*, et al.* MxB binds to the HIV-1 core and prevents the uncoating process of HIV-1. ***Retrovirology*** 2014;11:68.

198.Margot NA, Gibbs CS, Miller MD. Phenotypic susceptibility to bevirimat in isolates from HIV-1-infected patients without prior exposure to bevirimat. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2010;54:2345-53.

199.Van Baelen K, Salzwedel K, Rondelez E*, et al.* Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 to the maturation inhibitor bevirimat is modulated by baseline polymorphisms in Gag spacer peptide 1. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2009;53:2185-8.

200.Tang J, Jones SA, Jeffrey JL*, et al.* Discovery of a novel and potent class of anti-HIV-1 maturation inhibitors with improved virology profile against gag polymorphisms. ***Bioorg Med Chem Lett*** 2017;27:2689-94.

201.Nowicka-Sans B, Protack T, Lin Z*, et al.* Identification and Characterization of BMS-955176, a Second-Generation HIV-1 Maturation Inhibitor with Improved Potency, Antiviral Spectrum, and Gag Polymorphic Coverage. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2016;60:3956-69.

202.Hombrouck A, De Rijck J, Hendrix J*, et al.* Virus evolution reveals an exclusive role for LEDGF/p75 in chromosomal tethering of HIV. ***PLoS Pathog*** 2007;3:e47.

203.Poeschla EM. Integrase, LEDGF/p75 and HIV replication. ***Cell Mol Life Sci*** 2008;65:1403-24.

204.Patel D, Antwi J, Koneru PC*, et al.* A New Class of Allosteric HIV-1 Integrase Inhibitors Identified by Crystallographic Fragment Screening of the Catalytic Core Domain. ***J Biol Chem*** 2016;291:23569-77.

205.Christ F, Shaw S, Demeulemeester J*, et al.* Small-molecule inhibitors of the LEDGF/p75 binding site of integrase block HIV replication and modulate integrase multimerization. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2012;56:4365-74.

206.Zhang FH, Debnath B, Xu ZL*, et al.* Discovery of novel 3-hydroxypicolinamides as selective inhibitors of HIV-1 integrase-LEDGF/p75 interaction. ***Eur J Med Chem*** 2017;125:1051-63.

207.Pironti A, Pfeifer N, Walter H*, et al.* Using drug exposure for predicting drug resistance - A data-driven genotypic interpretation tool. ***PLoS One*** 2017;12:e0174992.

208.Tang MW, Shafer RW. HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. ***Drugs*** 2012;72:e1-25.

209.Liu TF, Shafer RW. Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation. ***Clin Infect Dis*** 2006;42:1608-18.

210.Pironti A, Walter H, Pfeifer N*, et al.* Determination of Phenotypic Resistance Cutoffs From Routine Clinical Data. ***J Acquir Immune Defic Syndr*** 2017;74:e129-e37.

211.Winters B, Montaner J, Harrigan PR*, et al.* Determination of clinically relevant cutoffs for HIV-1 phenotypic resistance estimates through a combined analysis of clinical trial and cohort data. ***J Acquir Immune Defic Syndr*** 2008;48:26-34.

212.Parkin NT, Hellmann NS, Whitcomb JM*, et al.* Natural variation of drug susceptibility in wild-type human immunodeficiency virus type 1. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2004;48:437-43.

213.Wang K, Samudrala R, Mittler J. Weak agreement between Antivirogram and Phenosense assays in predicting reduced susceptibility to antiretroviral drugs. ***J Clin Microbiol*** 2004;42:2353-4; author reply 54.

214.Depatureaux A, Charpentier C, Leoz M*, et al.* Impact of HIV-1 group O genetic diversity on genotypic resistance interpretation by algorithms designed for HIV-1 group M. ***J Acquir Immune Defic Syndr*** 2011;56:139-45.

215.Descamps D, Collin G, Letourneur F*, et al.* Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 group O isolates to antiretroviral agents: in vitro phenotypic and genotypic analyses. ***J Virol*** 1997;71:8893-8.

216.Luk KC, Kaptue L, Zekeng L*, et al.* Naturally occurring sequence polymorphisms within HIV type 1 group O protease. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 2001;17:1555-61.

217.de Baar MP, Janssens W, de Ronde A*, et al.* Natural residues versus antiretroviral drug-selected mutations in HIV type 1 group O reverse transcriptase and protease related to virological drug failure in vivo. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 2000;16:1385-94.

218.Parkin NT, Schapiro JM. Antiretroviral drug resistance in non-subtype B HIV-1, HIV-2 and SIV. ***Antivir Ther*** 2004;9:3-12.

219.Depatureaux A, Charpentier C, Collin G*, et al.* Baseline genotypic and phenotypic susceptibilities of HIV-1 group O to enfuvirtide. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2010;54:4016-9.

220.Unal G, Mourez T, Leoz M*, et al.* First report of transmission of a highly resistant strain of HIV-1 group O. ***AIDS*** 2016;30:2565-68.

221.Tuaillon E, Gueudin M, Lemee V*, et al.* Phenotypic susceptibility to nonnucleoside inhibitors of virion-associated reverse transcriptase from different HIV types and groups. ***J Acquir Immune Defic Syndr*** 2004;37:1543-9.

222.Andries K, Azijn H, Thielemans T*, et al.* TMC125, a novel next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor active against nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2004;48:4680-6.

223.Descamps D, Collin G, Loussert-Ajaka I*, et al.* HIV-1 group O sensitivity to antiretroviral drugs. ***AIDS*** 1995;9:977-8.

224.Dierynck I, De Meyer S, Lathouwers E*, et al.* In vitro susceptibility and virological outcome to darunavir and lopinavir are independent of HIV type-1 subtype in treatment-naive patients. ***Antivir Ther*** 2010;15:1161-9.

225.Depatureaux A, Quashie PK, Mesplede T*, et al.* HIV-1 group O integrase displays lower enzymatic efficiency and higher susceptibility to raltegravir than HIV-1 group M subtype B integrase. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2014;58:7141-50.

226.Poveda E, Barreiro P, Rodes B*, et al.* Enfuvirtide is active against HIV type 1 group O. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 2005;21:583-5.

227.Rodes B, de Mendoza C, Rodgers M*, et al.* Treatment response and drug resistance in patients infected with HIV type 1 group O viruses. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 2005;21:602-7.

228.Depatureaux A, Leoz M, De Oliveira F*, et al.* [Specific diagnosis and follow-up of HIV-1 group O infection: RES-O data]. ***Med Mal Infect*** 2010;40:669-76.

229.Depatureaux A, Leoz M, Le Moal G*, et al.* Raltegravir-based regimens are effective in HIV-1 group O-infected patients. ***J Acquir Immune Defic Syndr*** 2012;61:e1-3.

230.Aghokeng AF, Kouanfack C, Peeters M*, et al.* Successful integrase inhibitor-based highly active antiretroviral therapy for a multidrug-class-resistant HIV type 1 group O-infected patient in Cameroon. ***AIDS Res Hum Retroviruses*** 2013;29:1-3.

231.Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents Living with HIV. DHHS Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection. In: Services DoHaH, ed., 2017:298.

232.Depatureaux A, Mesplede T, Quashie P*, et al.* HIV-1 group O integrase displays lower susceptibility to raltegravir and has a different mutational pathway for resistance than HIV-1 group M. ***J Int AIDS Soc*** 2014;17:19738.

233.ViiV_Healthcare_companies. Press Release : Positive phase 3 results from the BRIGHTE study of fostemsavir in heavily treatment-experienced patients with HIV. London, 2017.

234.Nowicka-Sans B, Gong YF, McAuliffe B*, et al.* In vitro antiviral characteristics of HIV-1 attachment inhibitor BMS-626529, the active component of the prodrug BMS-663068. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2012;56:3498-507.

235.Tamura K, Stecher G, Peterson D*, et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. ***Mol Biol Evol*** 2013;30:2725-9.

236.Rouet F, Chaix ML, Nerrienet E*, et al.* Impact of HIV-1 genetic diversity on plasma HIV-1 RNA Quantification: usefulness of the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA second-generation long terminal repeat-based real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction test. ***J Acquir Immune Defic Syndr*** 2007;45:380-8.

237.Perno CF, Bertoli A. Clinical cut-offs in the interpretation of phenotypic resistance. In: Geretti AM, ed. Antiretroviral Resistance in Clinical Practice. London, 2006.

238.Harrigan PR, Montaner JS, Wegner SA*, et al.* World-wide variation in HIV-1 phenotypic susceptibility in untreated individuals: biologically relevant values for resistance testing. ***AIDS*** 2001;15:1671-7.

239.Lataillade M, Chiarella J, Kozal MJ. Natural polymorphism of the HIV-1 integrase gene and mutations associated with integrase inhibitor resistance. ***Antivir Ther*** 2007;12:563-70.

240.Roquebert B, Damond F, Collin G*, et al.* HIV-2 integrase gene polymorphism and phenotypic susceptibility of HIV-2 clinical isolates to the integrase inhibitors raltegravir and elvitegravir in vitro. ***J Antimicrob Chemother*** 2008;62:914-20.

241.Ray N, Hwang C, Healy MD*, et al.* Prediction of virological response and assessment of resistance emergence to the HIV-1 attachment inhibitor BMS-626529 during 8-day monotherapy with its prodrug BMS-663068. ***J Acquir Immune Defic Syndr*** 2013;64:7-15.

242.Quashie PK, Mesplede T, Han YS*, et al.* Characterization of the R263K mutation in HIV-1 integrase that confers low-level resistance to the second-generation integrase strand transfer inhibitor dolutegravir. ***J Virol*** 2012;86:2696-705.

243.Kimpton C, Walton A, Gill P. A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. ***Hum Mol Genet*** 1992;1:287.

244.Tsiang M, Jones GS, Niedziela-Majka A*, et al.* New class of HIV-1 integrase (IN) inhibitors with a dual mode of action. ***J Biol Chem*** 2012;287:21189-203.

245.Charpentier C, Bertine M, Visseaux B*, et al.* In-vitro phenotypic susceptibility of HIV-1 'non-B' integrase inhibitors naive clinical isolates to dolutegravir and raltegravir. ***AIDS*** 2013;27:2959-61.

246.Charpentier C, Larrouy L, Visseaux B*, et al.* Prevalence of subtype-related polymorphisms associated with in vitro resistance to attachment inhibitor BMS-626529 in HIV-1 'non-B'-infected patients. ***J Antimicrob Chemother*** 2012;67:1459-61.

247.Zhou N, Nowicka-Sans B, Zhang S*, et al.* In vivo patterns of resistance to the HIV attachment inhibitor BMS-488043. ***Antimicrob Agents Chemother*** 2011;55:729-37.

248.Zhou N, Nowicka-Sans B, McAuliffe B*, et al.* Genotypic correlates of susceptibility to HIV-1 attachment inhibitor BMS-626529, the active agent of the prodrug BMS-663068. ***J Antimicrob Chemother*** 2014;69:573-81.

249.Lewden C, Thiebaut R, Boufassa F*, et al.* Comparison of early CD4 T-cell count in HIV-1 seroconverters in Cote d'Ivoire and France: the ANRS PRIMO-CI and SEROCO cohorts. ***J Acquir Immune Defic Syndr*** 2010;53:260-5.

250.de la Tribonniere X, Pugliese P, Cabie A*, et al.* [Demographic, clinical, immunovirological and therapeutic features of 8714 HIV infected French patients included in the Nadis Hospital Cohorte in 2006]. ***Med Mal Infect*** 2008;38:299-308.

251.Mary-Krause M, Grabar S, Lievre L*, et al.* Cohort Profile: French hospital database on HIV (FHDH-ANRS CO4). ***Int J Epidemiol*** 2014;43:1425-36.

252.Peeters M, Gueye A, Mboup S*, et al.* Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. ***AIDS*** 1997;11:493-8.

253.WHO. *Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection*. Frace, 2016.

254.Laurent C, Kouanfack C, Laborde-Balen G*, et al.* Monitoring of HIV viral loads, CD4 cell counts, and clinical assessments versus clinical monitoring alone for antiretroviral therapy in

rural district hospitals in Cameroon (Stratall ANRS 12110/ESTHER): a randomised non-inferiority trial. ***Lancet Infect Dis*** 2011;11:825-33.

255.Depatureaux A, Mesplede T, Quashie P*, et al.* HIV-1 Group O Resistance Against Integrase Inhibitors. ***J Acquir Immune Defic Syndr*** 2015;70:9-15.

256.Oliveira M, Ibanescu RI, Pham HT*, et al.* The M184I/V and K65R nucleoside resistance mutations in HIV-1 prevent the emergence of resistance mutations against dolutegravir. ***AIDS*** 2016;30:2267-73.

257.Kouanfack C, Vray M, Kfutwah A*, et al.* ANRS 12168 - DYNAMO study, comparing the immuno-virological and clinical responses to HAART between HIV-1 group O and group M-infected patients: results at 96 weeks. CROI. Boston, 2016.

258.Wain LV, Bailes E, Bibollet-Ruche F*, et al.* Adaptation of HIV-1 to its human host. ***Mol Biol Evol*** 2007;24:1853-60.

259.Yeni P. *Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH, recommandations du groupe d'experts*. Paris: Médecine-Sciences Flammarion, 2008.

260.Japour AJ, Mayers DL, Johnson VA*, et al.* Standardized peripheral blood mononuclear cell culture assay for determination of drug susceptibilities of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates. The RV-43 Study Group, the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee Resistance Working Group. ***Antimicrob Agents Chemother*** 1993;37:1095-101.

261.Grabar S, Kousignian I, Sobel A*, et al.* Immunologic and clinical responses to highly active antiretroviral therapy over 50 years of age. Results from the French Hospital Database on HIV. ***AIDS*** 2004;18:2029-38.

262.Viard JP, Mocroft A, Chiesi A*, et al.* Influence of age on CD4 cell recovery in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy: evidence from the EuroSIDA study. ***J Infect Dis*** 2001;183:1290-4.

263.Drylewicz J, Matheron S, Lazaro E*, et al.* Comparison of viro-immunological marker changes between HIV-1 and HIV-2-infected patients in France. ***AIDS*** 2008;22:457-68.

264.Ekouevi DK, Tchounga BK, Coffie PA*, et al.* Antiretroviral therapy response among HIV-2 infected patients: a systematic review. ***BMC Infect Dis*** 2014;14:461.

265.Malet I, Subra F, Charpentier C*, et al.* Mutations Located outside the Integrase Gene Can Confer Resistance to HIV-1 Integrase Strand Transfer Inhibitors. ***MBio*** 2017;8.

ANNEXES

1. Protocoles techniques

2. Algorithme d'interprétation génotypique des mutations associées à la résistance de l'ANRS 2017 v.27

3. Alignement des séquences en acides aminés des 39 isolats cliniques de VIH-1 non-M de l'étude phénotypique selon le niveau de FC (>10 ; >2.5 ; >1 et <1)

4. Article original
   "HIV-1 non-group M phenotypic susceptibility to integrase strand transfer inhibitors"

5. Correspondance
   "HIV-1 group O resistance pathway with raltegravir is similar to HIV-1 group M"

6. Article original
   "HIV-1 group O infection in France: clinical features and immunovirological response to antiretrovirals"

7. Article en révision
   "HIV-1 group P: towards a dead-end infection ?"

Annexe 1: Protocoles techniques

1. Préparation de CMSP cibles

Les cellules cibles sont extraites d'un pool de 3 concentrés leuco-plaquettaires qualifiés par l'Etablissement français du sang et issus de donneurs distincts. Un gradient de densité en milieu séparateur sur ficoll, composé polysaccharidique hydrophile de forte densité (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Europe, Velizy-Villacoublay, France), permet de recueillir, après centrifugation, la fraction cellulaire correspondant aux CMSP. Une fois lavés en milieu RPMI (RPMI 1640 L-Glutamine, Lonza, Verviers, Belgique) et antibiotique (Gentamicine 50 µg/ml, Panpharma, Luitré, France), une suspension cellulaire à 1 million de CMSP/ml est réalisé en milieu d'entretien (RPMI, gentamicine 50 µg/ml, 10% de sérum de veau foetal décomplémenté 30 min à 56°C (SVF, PAA laboratories, Pasching, Autriche). La phytohémagglutine (PHA, Remel Europe, Dartford, Royaume-Uni) est utilisée à 0,2 µg/ml, comme agent mitogène pendant 72 heures à 37°C sous 5% de CO_2. Avant infection les cellules sont activées par l'ajout d'IL-2r à 450 UI/ml (Proleukin, Novartis pharma, Rueil-Malmaison, France) et de bromide d'hexadimethrine à 2 µg/ml (Polybrene sigma, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri).

2. Amorces d'amplification et de séquençage

2.1. Gène *pol*, région de l'IN

	Etapes de PCR	Amorces	Séquences en nucléotides (5' - 3')	Taille (pb) du fragment final
VIH-1/O	PCR externe	POL O 3679 U23	GCCTCCCACACAAATGAKATAAG	1438
		POL O 5117 L23	CTGTCCACTTGCCATACTATCAG	
	PCR interne*	POL O 4297 U22	ATAGAYCAGGCACARGAAGATC	798
		POL O 5095 L21	ACC TGCCATCTGTTTTCCATA	
VIH-1/N	PCR externe	POL N 3753 U24	CWGCACAYAAAGGTATTGGAGGAA	1367
		ACC N 5097 L23	GGTGGCTTTCTCTTCTTTGCTCC	
	PCR interne*	POL N 3806 U29	GGAATTAGAARAGTRTTATTCYTAGATGG	849
		POL O 5095 L21	ACCTGCCATCTGTTTTCCATA	
VIH-1/P	PCR externe	POL O 3388 U22	GGAAARYTRAATTGGGCAAGTC	2633
		ACC O 6021 L20	GCTTCTTCCTGCCATRGGAG	
	PCR interne*	POL M 4151 U20	ATGGGTACCAGCACAYAAAG	944
		POL O 5095 L21	ACCTGCCATCTGTTTTCCATA	

*amorces identiques pour la réaction de séquence

2.2. Gène *env*, région de la gp120

Etapes de PCR	Amorces	Séquences en nucléotides (5' - 3')	Taille (pb) du fragment final
RT-PCR	ACC O 5880 U22	AAGAAGAAATGGATCCAGTAGA	1051
	ENV O 6912 L19	CAWATCCTGCTGGAGCACA	
	ENV O 6897 U24	ATTCCAATACACTATTGTGCTCCA	1698
	ENV O 8574 L21	TAAGTTGCTCAAGAGGTGGTA	
	ENV O 8391 U22	AACATTAGGCAGGGATATCAAC	1359
	LTR O 559 L20	TCAAGGCAAGCTTTATTGAG	
PCR nichées chevauchantes	ACC O 6020 U21	ATCTCCYATGGCAGGAAGAAG	469
	ENV O 6468 L21	TTGTGMTGCCCAAATATTATG	
	ENV O 6341 U21	TTTGMTAACCCCATGTTTGA	590
	ENV O 6912 L19	CAWATCCTGCTGGAGCACA	
	ENV O 6341 U20(2)	TTTGMTAATCCCATGTTTGA	684
	ENV O 7000 L24	CTGTTGGCTTGATGCCATGTGTAC	
	ENV O 6897 U24	ATTCCAATACACTATTGTGCTCCA	519
	ENV O 7392 L24	AAAGAATTCTCCATGACAGTTAAA	
	ENV O 7038 U21	ATAYTHAATGGRACACTCTCT	981
	ENV O 8000 L19	CAGGCGAGCTCGGAGYTGT	
	ENV O 7846 U22	TAAGTGCAGCAGGTAGCACTAT	749
	ENV O 8574 L21	TAAGTTGCTCAAGAGGTGGTA	
	ENV O 8391 U22	AACATTAGGCAGGGATATCAAC	801
	ENV O 9169 L23	GAGTAAATTAACCCWTCCAGTCC	

2.3. Gène *pol,* régions de la PR et RT

*amorces identiques pour la réaction de séquence

	Etapes de PCR	Amorces	Séquence en nucléotides (5' - 3')	Taille (pb) du fragment final
VIH-1/P	PCR interne PR/RT*	GAG O 1295 U18	GCATGGGTAAAGGCAGTA	3170
		POL M 4363 L31	TCTACTTGTCCATGCATGGCTTCTCTCCTTTTA	
	PCR interne IN*	POL O 3304 U20	CTCCAYCCAGACAARTGGAC	1720
		POL O 5005 L20	CCYTCACCTTTCCACAGGAG	
	PCR interne GP41*	ENV G 6804 U22	GCACTCTTCTATAGAACAGACC	1884
		ENV G 8662 L20	GTTAGGAGGTCCTTGATCCC	

2.4. Gène *gag*, position 30

	Etapes de PCR	Amorces	Séquences en nucléotides (5' - 3')	Taille (pb) du fragment final
VIH-1/P	RT-PCR gag	OM LTR152 U	CTCAATAAAGCTTGCCTTGA	493
		LTRO1 L	TGTCTTGAGAGCTGGYTCTA	

Annexe 2 : Algorithme d'interprétation génotypique des mutations associées à la résistance, ANRS 2017 v27

Pour les références, voir http://www.hivfrenchresistance.org/

ANRS - AC 11: RESISTANCE GROUP
GENOTYPE INTERPRETATION: NUCLEOSIDE AND NUCLEOTIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
ZDV	• T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [1, 2, 3, 4] • At least 3 mutations among: M41L, D67N, K70R, L210W, K219Q/E [1, 2, 3, 4] • Q151M • Insertion at codon 69	
3TC/FTC	• K65R [11, 12, 16] • M184V/I • Insertion at codon 69	• Q151M
ddI	• At least a score of + 2 among: M41L + T69D + 215Y/F + K219Q/E – K70R – M184 V/I [5, 14, 15, 17, 18] • K65R [11, 12] • L74V/I [19] • Q151M • Insertion at codon 69	
d4T	• V75A/M/S/T • T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [6] • At least 3 mutations among: M41L, D67N, K70R, L210W, K219Q/E [4, 7, 14, 15] • K65R [30, 31, 32] • Q151M • Insertion at codon 69	
ABC	• At least 3 mutations among: M41L, D67N, M184V/I, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [8, 19, 29] • K65R [9, 11, 12] • L74V/I [24, 25, 26, 27, 28, 29] • Y115F • Q151M • Insertion at codon 69	• 2 mutations among: M41L, D67N, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [8, 19, 29] • M184V/I [36]
TDF/TAF	• At least 4 mutations among: M41L, E44D, D67N, T69D/N/S, L74V/I, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [13, 20, 33, 37, 38] • K65R/E/N [9, 10, 11, 12, 34, 35, 37, 38] • Insertion at codon 69 • K70E [21, 22, 23]	• 3 mutations among: M41L, E44D, D67N, T69D/N/S, L74V/I, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [13, 33, 37, 38]

ZDV: zidovudine, 3TC: lamivudine, FTC: emtricitabine, ddI: didanosine, d4T: stavudine, ABC: abacavir, TDF: tenofovir, TAF: tenofovir alafenamide

For DNA provirus, impact of stop codons and G->A mutations on ARV resistance is unknown

ANRS - AC 11: RESISTANCE GROUP
GENOTYPE INTERPRETATION: NON-NUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
EFV	• L100I • K101E • K103H/N/S/T [1] • V106M [2] • E138K [12, 13] • Y181C/I • Y188C/L • G190A/C/E/Q/S/T/V • P225H • M230L	
NVP	• A98S (for HIV-1 subtype C only) [3] • L100I • K101E • K103H/N/S/T [1] • V106A/M [2] • Y181C/I • Y188C/H/L • G190A/C/E/Q/S/T/V • M230L	• E138K [13]
ETR	• At least 3 among: V90I, A98G, L100I, K101E/H/I/P/R, V106I, V179D/F/I/L/M/T, G190A/S, M230L [4, 7, 8, 9, 10, 11] • E138K [12, 13] • Y181C/I/V [5, 6] • H221Y [12,16]	• 2 mutations among: V90I, A98G, L100I, K101E/H/I/P/R, V106I, V179D/F/I/L/M/T, G190A/S, M230L [4, 7, 8, 9, 10, 11] • E138A/G/Q/R/S [5, 6, 7, 8]
RPV	• K101E/P [9, 13] • E138A/G/K/Q/R/S [12, 13, 14] • V179L [9] • Y181C/I/V [13] • Y188L [9] • F227C [9] • H221Y [13] • M230I/L/V [9] • L100I + K103N/S [9, 15] • L100I + K103R + V179D [15]	• V179D [9,15, 17]

EFV: efavirenz, NVP: nevirapine, ETR: etravirine, RPV : rilpivirine

For DNA provirus, impact of stop codons and G->A mutations on ARV resistance is unknown

ANRS - AC 11: RESISTANCE GROUP
GENOTYPE INTERPRETATION: PROTEASE INHIBITORS

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
IDV	• **M46I/L** • **V82A/F/M/S/T [11]** • **I84A/V [8]** • **L90M and at least 2 among: K20M/R, L24I, V32I, M36I, I54V/L/M/T, A71V/T, G73S/A, V77I**	• **L90M**
SQV/RTV **1000/100 mg BID**	• **G48V** • **At least 3 mutations among: L10F/I/M/R/V, I15A/V, K20I/M/R/T, L24I, I62V, G73S/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M [9]**	• **2 mutations among: L10F/I/M/R/V, I15A/V, K20I/M/R/T, L24I, I62V, G73S/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M [9]**
NFV	• **D30N** • **I84A/V [8]** • **N88S/D** • **L90M**	• **V82A/F/S/T and at least 2 among: L10I, M36I, M46I/L, I54V/L/M/T, A71V/T, V77I [1]**
LPV/r	• **At least 4 mutations among: L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M [3, 4, 5, 21]** • **I47A [15, 16]** • **L76V [18, 19]**	• **3 mutations among: L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M [3, 4, 5, 21]**
FPV/RTV **700/100 mg BID**	• **I50V** • **V32I and I47A/V [2, 13, 14]** • **At least 4 mutations among: L10F/I/V, L33F, M36I,** • **I54A/L/M/S/T/V, I62V, V82A/C/F/G, I84V, L90M [2, 20]**	
ATV/RTV **300/100 mg QD**	• **I50L [6]** • **N88S [28,29,30]** • **At least 3 mutations among: L10F/I/V, G16E, L33F/I/V, M46I/L, D60E, A71V/T, I84V, I85V, L90M [7, 12, 22, 31]**	• **2 mutations among: L10F/I/V, G16E, L33F/I/V, M46I/L, D60E, A71V/T, I84V, I85V, L90M [7, 12, 22, 31]**
TPV/RTV **500/200 mg BID**	• **At least a score of + 3*: 36I/L/V – 53L/W/Y + 58E + 69I/K/N/Q/R/Y + 89I/M/R/T/V [10, 23]**	• **A score of + 2*: 36I/L/V – 53L/W/Y + 58E + 69I/K/N/Q/R/Y + 89I/M/R/T/V [10, 23]**

DRV/RTV** **600/100 mg BID**	• **At least 4 mutations among: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V, L89V [17, 24, 25, 26, 27]**	• **3 mutations among: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V, L89V [17, 24, 25, 26, 27]**
800/100 mg QD	• **2 mutations among: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, T74P, L76V, I84V, L89V [17, 24, 25, 26, 27]**	

IDV: indinavir, SQV: saquinavir, NFV: nelfinavir, RTV: ritonavir, FPV: fosamprenavir, LPV: lopinavir, ATV:atazanavir, TPV: tipranavir, DRV : darunavir

*** Insufficient data for HIV-1 subtype non-B**
**** Please note that rules are different for DRV/RTV 600/100 mg BID and 800/100 mg QD**

For DNA provirus, impact of stop codons and G->A mutations on ARV resistance is unknown

ANRS - AC 11: RESISTANCE GROUP

GENOTYPE INTERPRETATION: FUSION INHIBITOR

	Mutations associated with resistance
ENF **T20**	• **G36A/D/E/S/V [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]** • **V38A/E/K/M** • **Q40H/K/P/T** • **N42D/T** • **N43D/H/K/S** • **L44M** • **L45Q/M**

ENF (T20): enfuvirtide

ANRS - AC 11 : RESISTANCE GROUP

GENOTYPE INTERPRETATION: INTEGRASE STRAND TRANSFER INHIBITORS

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
RAL	• T66K [10] • E92Q [1, 2] • G118R [10, 17] • F121Y [10,17] • G140A/S [7] • Y143A/C/G/H/R/S [1, 3, 4, 5, 8, 14] • Q148E/G/H/K/R [1, 2] • V151L [9] • N155H/S/T [1, 2, 9] • E157Q [2] • A49G + S230G/R + R263K [18]	
EVG	• T66I/A/K [6] • E92Q [6] • T97A [21,22] • G118R [17] • F121Y [9,17] • E138K • G140C/S • Y143A/C/G/H/R/S [14] • P145S [9] • S147G [21] • Q148H/R/K [6] • V151L [9] • N155H/S/T [6,9] • E157Q [11] • R263K [18]	

DTG* **50 mg BID**	• **G118R [12,13]** • **F121Y [17]** • **V151L [9,25]** • **S153Y [9, 25]** • **R263K [16]** • **T66K + L74M [9]** • **E92Q + N155H [9, 23, 24]** • **Q148H/K/R + at least 2 mutations among: L74I or E138A/K/T or G140A/C/S [15]** • **Q148H/K/R + N155H [9, 29,30]**	• **T66K [9]** • **S153F [9, 28]** • **E157Q [19, 20]** • **Q148H/K/R + 1 mutation among: L74I or E138A/K/T or G140A/C/S [15]**
50 mg QD	• **G118R [12,13]** • **F121Y [17]** • **E138A/K/T** • **G140A/C/S** • **Q148H/K/R** • **V151L [9,25]** • **S153Y [9,25]** • **N155H [18]** • **S230R [31]** • **R263K [16]** • **T66K + L74M [9]** • **L74I + E92Q [32]**	• **T66K [9** • **S153F [9, 28]** • **E157Q [19, 20]**
CAB	• **Q148K/R [25, 26, 27]** • **T66K + L74M [25]** • **E92Q + N155H [25]** • **G140S + Q148H [25]** • **Y143H + N155H [25]**	

RAL: raltegravir, EVG: elvitegravir, DTG: dolutegravir, CAB: cabotegravir

*** Please note that rules are different for DTG 50 mg BID and 50 mg QD**

For DNA provirus, impact of stop codons and G->A mutations on ARV resistance is unknown

REFERENCES

Nucleoside and Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors

1/ Riva C et al. Transmitted virus with substitutions at position 215 and risk of virological failure in antiretroviral naive patients starting highly active antiretroviral therapy. XI International HIV drug resistance workshop : basic principles and clinical implications , 2-5 July 2002, Seville, Spain, abstract 124.

2/ Lanier ER et al. Effect of baseline 215D/C/S « revertant » mutations on virological response to lamivudine /zidovudine- containing regimens and emergence of 215Y upon virological failure. XI International HIV drug resistance workshop : basic principles and clinical implications, 2-5 July 2002, Seville, Spain abstract 146.

3/ Garcia-Lerma et al. Increased ability for selection of zidovudine resistance in a distinct class of wild-type HIV-1 from drug-naive persons. PNAS 2001 ; 98 : 13907-13912.

4/ Chappey C et al. Evolution of amino acid 215 in HIV-1 reverse transcriptase in response to intermittent drug selection. XII International HIV drug resistance workshop : basic principles and clinical implications, 10-14 June 2003, Los Cabos, Mexico, abstract 32.

5/ Costagliola D et al. Presence of thymidine –associated mutations and response to d4T, abacavir and ddi in the control arm of the Narval ANRS 088 trial. 8th Conference on Retroviruses and opportunistic Infections. 4-8 february 2001, Chicago, Illinois, poster 450.

6/ Calvez V et al. Impact of stavudine phenotype and thymidine analogs mutations on viral response to stavudine plus lamivudine in ALTIS 2 ANRS trial. Antiviral Therapy 2002, 7(3):211-218.

7/ García-Lerma JG, MacInnes H, Bennett D, Reid P, Nidtha S, Weinstock H, Kaplan JE, Heneine W. A novel genetic pathway of human immunodeficiency virus type 1 resistance to stavudine mediated by the K65R mutation. J Virol. 2003 May;77(10):5685-93.

8/ Brun-Vézinet F et al. Clinically relevant interpretation of genotype for resistance to abacavir : a study from the Narval trial (ANRS 088). AIDS 2003; 17(12):1795-802.

9/ Stone C, Ait-Khaled M, Craig C, Griffin P, Tisdale M. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutation selection during in vitro exposure to tenofovir alone or combined with abacavir or lamivudine. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Apr;48(4):1413-5.

10/ Miller MD et al. Multivariate analyses of antiviral response to tenofovir DF therapy in antiretroviral–experienced patients. XI International HIV drug resistance workshop : basic principles and clinical implications, 2-5 July 2002, Seville, Spain abstract 14.

11/ Margot NA, Lu B, Cheng A, Miller MD; Study 903 Team. Resistance development over 144 weeks in treatment-naive patients receiving tenofovir disoproxil fumarate or stavudine with lamivudine and efavirenz in Study 903. HIV Med. 2006 Oct;7(7):442-50.

12/ Parikh et al. K65R : a multi-nucleoside resistance mutation of a low but increasing frequency. XII International HIV drug resistance workshop : basic principles and clinical implications, 10-14 June 2003, Los Cabos, Mexico, abstract 136.

13/ Masquelier B et al. Genotypic and pharmacological determinants of the virological response to tenofovir in nucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced patients. Antivir Ther. 2004 ; 9(3):315-23.

14/ Izopet J. et al. Mutations conferring resistance to zidovudine diminish the antiviral effect of stavudine plus didanosine. Journal of Medical Virology 1999 ; 59 : 507-511.

15/ Pellegrin I. et al. Emergence of zidovudine and multidrug-resistance mutations in the HIV-1 reverse transcriptase gene in therapy-naive patients receiving stavudine plus didanosine combination therapy. STADI group. AIDS 1999 ; 13 : 1705-1709.

16/ Mulamba GB et al. Pre-steady state kinetic analysis of the incorporation of FTC 5'-monophosphate and 3TC 5'-monophosphate by mutants HIV-1 RTs K65R, K65R/Q151M and Q151M. 16th International Conference on Antiviral Research, 27 April-1 May 2003, Savannah, USA. Abstract 39.

17/ Marcelin AG et al. Clinically relevant genotype interpretation of resistance to didanosine. Antimicrob Agents Chemother. 2005 May;49(5):1739-44.

18/ Capdepont S et al. An additive/subtractive genotypic score as a determinant of the virological response to didanosine in HIV-1 infected patients. J Clin Virol. 2006 May;36(1): 36-42.

19/ Assoumou L, Brun-Vézinet F, Cozzi-Lepri A, Kuritzkes D, Phillips A, Zolopa A, Degruttola V, Miller V, Costagliola D; Standardization and Clinical Relevance of HIV Drug Resistance Testing Project of the Forum for Collaborative HIV Research.Initiatives for Developing and Comparing Genotype Interpretation Systems: External Validation of Existing Systems for Didanosine against Virological Response. J Infect Dis. 2008 Jul 3.

20/ Waters J et al. K65R, L74V and TAMs in HIV-1 RT associated with reduced response to tenofovir DF in antiretroviral-experienced patients. 13th Conference on Retroviruses and opportunistic Infections. 5-8 february 2006, Denver, Colorado, poster 633.

21/ Kagan RM, Lee TS, Ross L, Lloyd RM Jr, Lewinski MA, Potts SJ. Molecular basis of antagonism between K70E and K65R tenofovir-associated mutations in HIV-1 reverse transcriptase. Antiviral Res. 2007 Sep;75(3):210-8.

22/ Kagan R et al. Adefovir HIV-1 RT mutation K70E in the age of tenofovir. XIV International HIV Drug Resistance Workshop: basic principles and clinical implications, 7-11 June 2005, Québec City, Québec, Canada, abstract 93.

23/ Sluis-Cremer N, Sheen CW, Zelina S, Torres PS, Parikh UM, Mellors JW. Molecular mechanism by which the K70E mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Jan;51(1):48-53.

24/ Miller V et al. HIV-1 reverse transcriptase (RT) genotype and susceptibility to RT inhibitors during abacavir monotherapy and combination therapy. AIDS 2000; 14:163–171.

25/ Moyle GJ, et al. Ziagen Once-Daily in Antiretroviral Combination Therapy (CNA30021) Study Team. Abacavir once or twice daily combined with once-daily lamivudine and efavirenz for the treatment of antiretroviral-naive HIV-infected adults: results of the Ziagen Once Daily in Antiretroviral Combination Study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005 Apr 1;38(4):417-25.

26/ Irlbeck D *et al.* Treatment-emergent mutations for previously naïve HIV-infected adults failing ZDV+3TC+EFV and ABC+3TC+EFV (CNA30024). *11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. San Francisco, CA, USA. February 8–11, 2004. Abtract 661.

27/ Rodriguez-French A, *et al.* The NEAT study: a 48-week open-label study to compare the antiviral efficacy and safety of GW433908 versus nelfinavir in antiretroviral therapy-naive HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; **35:**22–32.

28/ Gathe JC Jr et al. SOLO: 48-week efficacy and safety comparison of once-daily fosamprenavir /ritonavir versus twice-daily nelfinavir in naive HIV-1-infected patients. *AIDS*. 2004 Jul 23;18(11):1529-37

29/ Wirden et al. Risk factors for selection of the L74I reverse transcriptase mutation in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Jul;50(7):2553-6.

30/García-Lerma JG et al. A novel genetic pathway of human immunodeficiency virus type 1 resistance to stavudine mediated by the K65R mutation. J Virol. 2003 May;77(10):5685-93

31/Sungkanuparph S et al. Prevalence and risk factors for developing K65R mutations among HIV-1 infected patients who fail an initial regimen of fixed-dose combination of stavudine, lamivudine, and nevirapine. J Clin Virol. 2008 ;41:310-3.

32/Coutsinos D et al. The K65R mutation subtype B and C HIV-1: rates of development and the implications of template-specific dislocation mutagenesis. Antiviral Therapy 2010; 15 suppl 2:A13 (abs 5)

33/ Wirden M et al., Antiretroviral combinations implicated in emergence of the L74I and L74V resistance mutations in HIV-1-infected patients. AIDS. 2009 Jan 2;23(1):95-9.

34/ Fourati S et al. Identification of a rare mutation at reverse transcriptase Lys65 (K65E) in HIV-1-infected patients failing on nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitors. J Antimicrob Chemother. 2013 Jun 19.

35/ Ross LL et al. A rare HIV reverse transcriptase mutation, K65N, confers reduced susceptibility to tenofovir, lamivudine and didanosine. AIDS 2006 Mar 21;20(5):787-9.

36/ Tisdale M et al. Combination of mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase required for resistance to the carbocyclic nucleoside 1592U89. Antimicrob Agents Chemother. 1997 May;41(5):1094-8.

37/Callebaut C et al. In Vitro Virology Profile of Tenofovir Alafenamide, a Novel Oral Prodrug of Tenofovir with Improved Antiviral Activity Compared to That of Tenofovir Disoproxil Fumarate. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Oct;59(10):5909-16.

38/Margot NA et al. Rare emergence of drug resistance in HIV-1 treatment-naïve patients after 48 weeks of treatment with elvitegravir/cobicistat/emtricitabine/tenofovir alafenamide. HIV Clin Trials. 2016 Mar;17(2):78-87.

Non nucleoside transcriptase inhibitors

1/ Harrigan PR, Mo T, Wynhoven B, Hirsch J, Brumme Z, McKenna P, Pattery T, Vingerhoets J, Bacheler LT. Rare mutations at codon 103 of HIV-1 reverse transcriptase can confer resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. AIDS. 2005 Mar 24;19(6):549-54.

2/ Brenner B et al. A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. AIDS. 2003 Jan 3;17(1):F1-5.

3/ Deshpande A et al. Resistance mutations in subtype C HIV type 1 isolates from Indian patients of Mumbai receiving NRTIs plus NNRTIs and experiencing a treatment failure: resistance to AR. AIDS Res Hum Retroviruses 2007; 23 : 335-40.

4/ Vingerhoets J et al. Impact of baseline NNRTI mutations on the virological response to TMC125 in the Phase III clinical trials DUET-1 and DUET-2. XVI International HIV drug resistance workshop : basic principles and clinical implications, 12-16 June 2007, Barbados, West Indies, abstract 32.

5/ Marcelin AG et al. Factors associated with virological response to etravirine in nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced HIV-1-infected patients. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Jan;54(1):72-7.

6/ Vingerhoets J et al. Resistance profile of etravirine: combined analysis of baseline genotypic and phenotypic data from the randomized, controlled Phase III clinical studies. AIDS. 2010 Feb 20;24(4):503-14.

7/ Vingerhoets J et al. Impact of transmitted drug resistance (TDR) on virological response to initial combination antiretroviral therapy (cART). Antiviral Therapy 2010; 15 Suppl 2: A125 (abstract 99).

8/ El A et al. In vitro selection of novel etravirine-associated resistance mutations in B and non-B HIV-1 subtypes. Antiviral Therapy 2010; 15 Suppl 2: A134 (abstract 108).

9/ Azijn H et al. TMC278, a next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), active against wild-type and NNRTI-resistant HIV-1. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Feb;54(2):718-27.

10/Marcelin AG et al. Mutations selected in patients displaying treatment failure under an etravirine-containing regimen. Antiviral Therapy 2011; 10.3851/IMP1886.

11/ Maïga AI et al. Resistance-associated mutations to etravirine (TMC-125) in antiretroviral-naïve patients infected with non-B HIV-1 subtypes. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Feb;54(2):728-33.

12/ Asahchop EL 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 Feb;55(2):600-7.

13/ Eron J et al. Characterization of the resistance profile of TMC278: 48-week analysis of the Phase III studies ECHO and THRIVE. 50th ICAAC 2010 (abstract H-1810).

14/ Haddad M et al. Impact of HIV-1 reverse transcriptase E138 mutations selected on rilpivirine drug susceptibility. Antiviral Therapy 2011; 16 Suppl 1: A18 (abstract 10).

15/ Haddad M et al. Combinations of HIV-1 reverse transcriptase mutations L100I+K103N/S and L100I+K103R+V179D reduce susceptibility to rilpivirine. 53rd ICAAC 2013 (abstract H-677)

16/ Melikian et al. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) cross-resistance: implications for preclinical evaluation of novel NNRTIs and clinical genotypic resistance testing. J Antimicrob Chemother. 2014 Jan;69(1):12-20.

17/ Porter et al. Characterization of HIV-1 drug resistance development through week 48 in antiretroviral naive subjects on rilpivirine/emtricitabine/tenofovir DF or efavirenz/emtricitabine/tenofovir DF in the STaR study (GS-US-264-0110). J Acquir Immune Defic Syndr. 2014 Mar 1;65(3):318-26.

Protease inhibitors

1/ Phenotype/genotype correlation from Stanford database.

2/ Masquelier B, Assoumou KL, Descamps D, Bocket L, Cottalorda J, Ruffault A, Marcelin AG, Morand-Joubert L, Tamalet C, Charpentier C, Peytavin G, Antoun Z, Brun-Vézinet F, Costagliola D; ANRS Resistance Study Group. Clinically validated mutation scores for HIV-1 resistance to fosamprenavir/ritonavir. J Antimicrob Chemother. 2008 Jun;61(6):1362-8.

3/ Marcelin AG, Cohen-Codar I, King MS, Colson P, Guillevic E, Descamps D, Lamotte C, Schneider V, Ritter J, Segondy M, Peigue-Lafeuille H, Morand-Joubert L, Schmuck A, Ruffault A, Palmer P, Chaix ML, Mackiewicz V, Brodard V, Izopet J, Cottalorda J, Kohli E, Chauvin JP, Kempf DJ, Peytavin G, Calvez V. Virological and pharmacological parameters predicting the response to lopinavir-ritonavir in heavily protease inhibitor-experienced patients. Antimicrob Agents Chemother. 2005 May;49(5):1720-6.

4/ Maillard A, Chapplain JM, Tribut O, Bentué-Ferrer D, Tattevin P, Arvieux C, Michelet C, Ruffault A. The use of drug resistance algorithms and genotypic inhibitory quotient in prediction of lopinavir-ritonavir treatment response in human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-experienced patients. J Clin Virol. 2007 Feb;38(2):131-8.

5/ Masquelier B et al. Human Immunodeficiency virus type 1 genotypic and pharmacokinetic determinants of the virological response to lopinavir-ritonavir-containing therapy in protease inhibitor-experienced patients. Antimicrob Agents and Chemother 2002 ; 46 : 2926-2932.

6/ Colonno RJ et al. Identification of I50L as the signature atazanavir (ATV)-resistance mutation in treatment naïve HIV-1 infected patients receiving ATV-containing regimens. Journal of Infectious Diseases 2004; 189: 1802-10.

7/ Vora S et al. Clinical validation of atazanavir/ritonavir genotypic resistance score in PI-experienced patients. AIDS 2006 Jan 2;20(1):35-40.

8/ Mo H, Parkin N, Stewart KD, Lu L, Dekhtyar T, Kempf DJ, Molla A. Identification and structural characterization of I84C and I84A mutations that are associated with high-level resistance to human immunodeficiency virus protease inhibitors and impair viral replication. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Feb;51(2):732-5.

9/ Marcelin AG, Flandre P, de Mendoza C, Roquebert B, Peytavin G, Valer L, Wirden M, Abbas S, Katlama C, Soriano V, Calvez V. Clinical validation of saquinavir/ritonavir genotypic resistance score in protease-inhibitor-experienced patients. Antivir Ther. 2007;12(2):247-52.

10/ Marcelin AG et al. Tipranavir-ritonavir genotypic resistance score in protease inhibitor-experienced patients. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Sept;52(9).

11/ Camacho R et al. Different substitutions under selective pressure at protease codon 82 in HIV-1 subtype G compared to subtype B infected individuals including a novel I82M resistance mutation. XIV International HIV Drug Resistance Workshop: basic principles and clinical implications, 7-11 June 2005, Québec City, Québec, Canada, abstract 138.

12/ Marcelin AG et al. External validation of atazanavir/ritonavir genotypic score in HIV-1 protease inhibitor experienced patients. JAIDS 2006; 42 (1): 127-8.

13/ Brutus A et al. The Neat Study: Virologic response in subjects receiving GW433908 (908) BID by viral load/CD4 cell Counts at study entry. XV International AIDS Conference, July 11-16 2004, Bangkok ,Thailand, abstract TuPeB 4500.

14/ Pellegrin I, Breilh D, Coureau G, Boucher S, Neau D, Merel P, Lacoste D, Fleury H, Saux MC, Pellegrin JL, Lazaro E, Dabis F, Thiébaut R; ANRS Co3 Aquitaine Cohort. Interpretation of genotype and pharmacokinetics for resistance to fosamprenavir-ritonavir-based regimens in antiretroviral-experienced patients. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Apr;51(4):1473-80.

15/ Friend J et al. Isolated lopinavir resistance after virological rebound of a ritonavir/lopinavir-based regimen. AIDS. 2004 Sep 24;18(14):1965-6.

16/ de Mendoza C et al. Prevalence of the HIV-1 protease mutation I47A in clinical practice and association with lopinavir resistance. AIDS 2006 Apr 24; 20(7): 1071-4.

17/ de Meyer S, Vangeneugden T, van Baelen B, de Paepe E, van Marck H, Picchio G, Lefebvre E, de Béthune MP. Resistance profile of darunavir: combined 24-week results from the POWER trials. AIDS Res Hum Retroviruses. 2008 Mar;24(3):379-88.

18/ Nijhuis N et al. A novel genetic pathway involving L76V and M46I leading to lopinavir/r resistance. XVI International HIV drug resistance workshop : basic principles and clinical implications, 12-16 June 2007, Barbados, West Indies, abstract 127.

19/ Delaugerre C et al. Protease inhibitor resistance analysis in the MONARK trial comparing first-line lopinavir-ritonavir monotherapy to lopinavir-ritonavir plus zidovudine and lamivudine triple therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Jul;53(7):2934-9.

20/ Marcelin AG et al. Genotypic resistance analysis of the virological response to fosamprenavir-ritonavir in protease inhibitor-experienced patients in CONTEXT and TRIAD clinical trials. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Dec;52(12):4251-7.

21/ Hill A et al. Identification of new genotypic cut-off levels to predict the efficacy of lopinavir/ritonavir and darunavir/ritonavir in the TITAN trial. HIV Med. 2009 Jul 6.

22/ Di Giambenedetto S et al. A rigorous statistical learning method for the estimation and validation of weighted drug susceptibility scores applied to in vivo virological outcome prediction in atazanavir/ritonavir-containing HAART. XVII International HIV drug resistance workshop : basic principles and clinical implications, 10-14 June 2008, Sitges, Spain, abstract 95.

23/ Bethell R et al. No effect of subtype on susceptibility and virological response to TPV/r for treatment experienced patients. XVII International HIV drug resistance workshop : basic principles and clinical implications, 10-14 June 2008, Sitges, Spain, abstract 111.

24/ Descamps D et al. Mutations associated with virological response to darunavir/ritonavir in HIV-1-infected protease inhibitor-experienced patients. J Antimicrob Chemother. 2009 Mar;63(3):585-92.

25/ De Meyer S. et al. Influence of baseline protease inhibitor resistance on the efficacy of darunavir/ritonavir or lopinavir/ritonavir in the TITAN trial. J Acquir Immune Defic Syndr. 2008 Dec 15;49(5):563-4.

26/ De Meyer S. et al. Phenotypic and genotypic determinants of resistance to darunavir: analysis of data from treatment-experienced patients in POWER 1, 2, 3 and DUET-1 and 2. XVII International HIV drug resistance workshop : basic principles and clinical implications, 10-14 June 2008, Sitges, Spain, abstract 31.

27/ De Meyer S. et al. Confirmation of the negative impact of protease mutations I47V, I54M, T74P and I84V and the positive impact of protease mutation V82A on virological response to darunavir/ritonavir. XVII International HIV drug resistance workshop : basic principles and clinical implications, 9-13 June 2009, Fort Myers, Florida, abstract 126.

28/ Gong YF. Et al. In vitro resistance profile of the human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor BMS-232632. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Sep;44(9):2319-26.

29/ Malan DR; et al. Efficacy and safety of atazanavir, with or without ritonavir, as part of once-daily highly active antiretroviral therapy regimens in antiretroviral-naive patients. J Acquir Immune Defic Syndr. 2008 Feb 1;47(2):161-7.

30/ Malan DR et al. 96-week efficacy and safety of atazanavir, with and without ritonavir, in a HAART regimen in treatment-naive patients. J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic). 2010 Jan-Feb;9(1):34-42.

31/ Morand-Joubert L et al. 15th Emerging resistance mutations in protease inhibitor naive patients failing atazanavir based regimen (ANRS multicentre observational study). European AIDs Conference. October 21-24, Barcelona, Spain (Abstract PE9/9)

Fusion inhibitor

1/ Sista P et al. Subgroup analysis of baseline susceptibility and early virological response to enfuvirtide in the combined TORO studies. XII International HIV drug resistance workshop : basic principles and clinical implications, 10-14 June 2003, Los Cabos, Mexico, abstract 55.

2/ Mink M et al. Impact of HIV-1 gp41 amino acid substitutions (position 36-45) on susceptibility to T20 (enfuvirtide) in vitro ; analysis of primary virus isolates recovered from patients during chronic enfuvirtide treatment and site-directed mutants in NL4-3. XI International HIV drug resistance workshop : basic principles and clinical implications, 2-5 July 2002, Seville, Spain, abstract 22.

3/ Greenberg ML et al. Enfuvirtide (T-20) and T-1249 resistance : observations from phase II clinical trials of enfuvirtide in combination with oral antiretrovirals and a phase I/II dose-ranging monotherapy trial of T-1249. XI International HIV drug resistance workshop : basic principles and clinical implications, 2-5 July 2002, Seville, Spain, abstract 128.

4/ Greenberg ML et al. Baseline and on-treatment susceptibility to enfuvirtide seen in TORO 1 and TORO 2 to 24 weeks. 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, February 10-14, 2003, Boston, USA, abstract 141.

5/ Chakraborty B et al. Replicative fitness of HIV-1 strains with reduced susceptibility to protease-, reverse transcriptase- and entry (enfuvirtide)-inhibitors. XIII International HIV drug resistance workshop : basic principles and clinical implications, 8-12 June 2004, Tenerife, Spain, abstract 61.

6/ Walmsley SL et al. Development of a new genotypic resistance assay involving the entire gp41 sequence for evaluating resistance to enfuvirtide. XIII International HIV drug resistance workshop : basic principles and clinical implications, 8-12 June 2004, Tenerife, Spain, abstract 134.

7/ Melby T et al. Evolution of enfurvitide resistance in longitudinal samples obtained after continued enfuvirtide dosing post-virological failure. XIV International HIV Drug Resistance Workshop: basic principles and clinical implications, 7-11 June 2005, Québec City, Québec, Canada, abstract 67.

Integrase strand transfer inhibitors

1/ Cooper DA et al. Subgroup and resistance analyses of raltegravir for resistant HIV-1 infection. N Engl J Med. 2008 Jul 24;359(4):355-65.

2/ Malet I et al. Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Apr;52(4):1351-8.

3/ Hatano H et al. Evolution of integrase resistance during failure of integrase inhibitor-based antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndr. 2010 Aug 1;54(4):389-93.

4/ Da Silva D et al. HIV-1 resistance patterns to integrase inhibitors in antiretroviral-experienced patients with virological failure on raltegravir-containing regimens. J Antimicrob Chemother. 2010 Jun;65(6):1262-9

5/ Ceccherini-Silberstein F et al. Virological response and resistance in multi-experienced patients treated by raltegravir. XVII International HIV drug resistance workshop : basic principles and clinical implications, 10-14 June 2008, Sitges, Spain, abstract 18.

6/ Waters J et al. Evolution of resistance to the HIV integrase inhibitor (INI) elvitegravir can involve genotypic switching among primary INI resistance patterns. XVII International HIV drug resistance workshop : basic principles and clinical implications, 9-13 June 2009, Fort Myers, Florida, abstract 116.

7/Geretti AM et al. Prevalence and patterns of raltegravir resistance in treated patients in Europe. Antiviral Therapy 2010; 15 Suppl 2: A62 (abstract 51)

8/Huang W et al. Identification of alternative amino acid substitutions at HIV-1 integrase codon 143 that confer reduced susceptibility to raltegravir. 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, February 27-March 2, 2011, Boston, USA, abstract 607.

9/ Kobayashi M et al. In Vitro antiretroviral properties of S/GSK1349572, a next-generation HIV integrase inhibitor. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Feb;55(2):813-21.

10/ Malet I et al. The HIV-1 integrase G118R mutation confers raltegravir resistance to the CRF02_AG HIV-1 subtype. J Antimicrob Chemother. 2011 Dec;66(12):2827-30.

11/ White K et al. Integrated Analysis of Emergent Drug Resistance from the HIV-1 Phase 3 QUAD Studies through Week 48. International Workshop on HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance and Curative Strategies June 5-9, 2012 Sitges, Spain, Abstract 4.

12/ Bar-Magen et al. Identification of novel mutations responsible for resistance to MK-2048, a second-generation HIV-1 integrase inhibitor. J Virol. 2010 Sep;84(18):9210-6.

13/ Hare S et al. Structural and functional analyses of the second-generation integrase strand transfer inhibitor dolutegravir (S/GSK1349572). Mol Pharmacol. 2011 Oct;80(4):565-72.

14/ Huang W et al. Contribution of raltegravir selected secondary mutations to reduction in elvitegravir susceptibility of patient-derived HIV integrase containing Y143 mutations. International Workshop on HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance and Curative Strategies June 4-8, 2013 Toronto, Canada, Abstract 89.

15/ Vavro CL et al. Integrase genotypic and phenotypic predictors of antiviral response to dolutegravir (DTG) in subjects with resistance to integrase inhibitors (INIs). International Workshop on HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance and Curative Strategies June 4-8, 2013 Toronto, Canada, Abstract 29.

16/ Underwood MR et al. Analysis and characterization of treatment-emergent resistance in ART-experienced, integrase inhibitor-naive subjects with dolutegravir (DTG) versus raltegravir (RAL) in SAILING (ING111762). International Workshop on HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance and Curative Strategies June 4-8, 2013 Toronto, Canada, Abstract 21.

17/ Malet I et al. New raltegravir resistance pathways induce broad cross-resistance to all currently used integrase inhibitors. J Antimicrob Chemother. 2014 Aug;69(8):2118-22.

18/ Underwood MR et al. Resistance Post Week 48 in ART-Experienced, Integrase Inhibitor-Naïve Subjects with Dolutegravir (DTG) vs. Raltegravir (RAL) in SAILING (ING111762). 13th European HIV & Hepatitis workshop, june 3-5 2015, Barcelona, Spain (Abstract n°6)

19/ Walmsley S, et al. Dolutegravir Plus Abacavir/Lamivudine for the Treatment of HIV-1 Infection in Antiretroviral Therapy-Naive Patients: Week 96 and Week 144 Results from the SINGLE Randomized Clinical Trial. J Acquir Immune Defic Syndr. 2015 Aug 7.

20/ Danion et al. Non-virological response to a dolutegravir-containing regimen in a patient harbouring a E157Q-mutated virus in the integrase region. J Antimicrob Chemother. 2015 Jun;70(6):1921-3.

21/ Molina et al. Efficacy and safety of once daily elvitegravir versus twice daily raltegravir in treatment-experienced patients with HIV-1 receiving a ritonavir-boosted protease inhibitor: randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority study. Lancet Infect Dis. 2012 Jan;12(1):27-35.

22/ Sax et al. Co-formulated elvitegravir, cobicistat, emtricitabine, and tenofovir versus co-formulated efavirenz, emtricitabine, and tenofovir for initial treatment of HIV-1 infection: a randomised, double-blind, phase 3 trial, analysis of results after 48 weeks. Lancet. 2012 Jun 30;379(9835):2439-48.

23/ Underwood et al.The activity of the integrase inhibitor dolutegravir against HIV-1 variants isolated from raltegravir-treated adults. J Acquir Immune Defic Syndr. 2012 Nov 1;61(3):297-301.

24/ Frantzell et al. Dolutegravir resistance requires multiple primary mutation in HIV-1 integrase. CROI 2015. Abstract Number: 121.

25/ Yoshinoga et al. Antiviral characteristics of GSK1265744, an HIV integrase inhibitor dosed orally or by long-acting injection. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Jan;59(1):397-406

26/ Margolis et al. 744 and Rilpivirine As Two Drug Oral Maintenance Therapy: LAI116482 (LATTE) Week 48 Results. CROI 2014. Abstract Number: 91LB

27/ Dudas et al. Characterization of NNRTI and INI Resistance Mutations Observed in a Study Subject on Oral Two-Drug Maintenance Therapy with 10 mg Cabotegravir + 25 mg Rilpivirine. IHDRW 2015 Seattle, WA, USA. Abstract 13.

28/ Abram ME, Ram RR, White KL, Miller MD, Callebaut C. Pre-existing HIV-1 integrase polymorphisms do not impact treatment response to elvitegravir-containing fixed-dose combination regimens in treatment-naive patients. HIV Drug Therapy 2016 Glasgow. The poster can be found at: http://s3-eu-west-1.amazonaws.com/hivglasgow/wp-content/uploads/2016/12/07153921/3.-Treatment-Strategies-Target-Populations_Poster-Book.pdf

29/ Huang W et al. Impact of Raltegravir/Elvitegravir Selected Mutations on Dolutegravir Cross-resistance. CROI March 3-6, 2014, Boston, MA, USA. Abstract 595.

30/ Blanco JL et al. Pathways of resitance in subjects failing dolutegravir monotherapy. CROI February 13–16, 2017, Seattle, WA, USA. Abstract 42

31/ Wijting I et al. Dolutegravir as maintenance monotherapy for HIV-1: a randomized clinical trial. CROI February 13–16, 2017, Seattle, WA, USA. Abstract LB451

32/ Katlama C et al. Dolutegravir as monotherapy in HIV-1-infected individuals with suppressed HIV viraemia. J Antimicrob Chemother. 2016 Sep;71(9):2646-50

Annexe 3: Alignement des séquences en acides aminés des 39 isolats cliniques de VIH-1 non-M de l'étude phénotypique selon le niveau de FC (>10 ; >2.5 ; >1 et <1), par rapport aux séquences de référence BRU-HXB2 (VIH-1/M) et ANT-70 (VIH-1/O)

Les positions sur le génome sont notées « p » ; les points (.) symbolisent une absence de différence par rapport à la référence BRU-HXB2 ; les tirets (-) indiquent les positions non mentionnées car identiques à la souche de référence pour l'ensemble du panel.

	groupe / sous-groupe H, T)	FC au DTG	FC à EVG	FC au RAL	p19	p20	p21	p22	-	p25	p26	p27	p28	-	p31	-	p34	-	p37	p38	p39	p40	p41	-	p44	p45	p46	-	p49	p50	p51	-	p55
>B.HXB2-BRU					W	R	A	M	-	D	F	N	L	-	V	-	K	-	V	A	S	C	D	-	Q	L	K	-	A	M	H	-	D
>O.ANT70					W	K	A	L	-	E	F	G	L	-	V	-	K	-	I	A	S	C	P	-	H	I	K	-	A	I	H	-	D
>YBF38	H		**17,68**		.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	N	.	P	-	H	I	.	-	.	T	.	-	.
>BCF113	H		**14,39**		.	K	.	L	-	E	Y	G	.	-	.	-	.	-	I	.	N	.	P	-	H	I	.	-	.	I	.	-	.
>BCF011	T		**13,04**		.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	.	.	-	.
>YBF37	T		**10,56**		.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	LV	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	I	.	-	.
>BCF111	H		**10,44**	**1,68**	.		.		-	E	Y	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	I	.	-	.
>BCF006	T		**9,98**		.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	.	.	-	.
>BCF101	H	**1,30**	**8,26**	**1,63**	.	K	.	L	-	E	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	I	.	-	.
>BCF008	H		**7,29**		.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	I	.	-	.
>YBF39	H		**6,12**		.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	N	.	P	-	H	I	.	-	.	I	.	-	.
>YBF17	H		**5,73**		.	.	.	L	-	E	.	G	.	-	I	-	.	-	I	.	N	.	P	-	H	I	.	-	.	I	.	-	.
>RBF168	VIH-1/N		**5,68**		.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	I	-	.	-	I	N	.	.	P	-	.	V	.	-	.	.	.	-	.
>BCF005	T		**4,71**		.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	R	-	.	R	.	-	.
>BCF009	H		**4,41**		.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	N	.	P	-	H	I	.	-	.	T	.	-	.
>BCF109	H		**4,04**		.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	R	-	.	.	.	-	.
>BCF003	H	**1,05**	**3,78**		.	.	.	L	-	E	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	I	.	-	.
>BCF013	H	**1,49**	**3,71**		.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	.	.	-	.
>YBF26	H		**3,16**		.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	N	.	P	-	H	T	.	-	.	I	.	-	.
>BCF177	H		**2,57**		.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	N	.	P	-	H	I	.	-	.	T	.	-	.
>RBF206	T		**2,39**		.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	R	-	.	.	.	-	.
>BCF010	T		**2,16**	**1,40**	.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	N	.	P	-	H	I	.	-	P	.	.	-	.
>BCF120	H			**2,28**	.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	.	.	-	.
>BCF057	T			**1,92**	.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	.	.	-	.
>YBF35	T			**1,36**	.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	V	N	.	P	-	H	M	.	-	.	.	.	-	.
>BCF112	H			**1,07**	.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	.	.	-	.
>BCF001	H	**1,86**			.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	N	.	P	-	H	I	.	-	.	I	.	-	.
>BCF100	H	**1,03**			.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	N	.	P	-	H	I	.	-	.	T	.	-	.
>RBF130	H	0,47	0,57	0,16	.	.	.	L	-	E	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	I	.	-	.
>BCF002	H	0,41	<0,001	0,0017	.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	.	.	-	.
>YBF18	H	0,20	<0,001	0,19	.	K	.	L	-	E	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	I	.	-	.
>YBF16	T	0,10	0,80	0,034	.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	KR	-	P	.	.	-	.
>BCF108	H	0,09	0,084	0,14	.	.	.	L	-	.	.	EG	.	-	.	-	.	-	I	.	N	.	P	-	H	T	.	-	.	I	.	-	.
>MVP5180	T	0,088	0,67	0,39	.	.	.	L	-	.	.	G	.	-	I	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	T	.	-	.
>YBF32	H	0,041	0,47	0,0042	.	K	.	L	-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	I	.	-	.
>BCF178	H	0,017	0,20	0,011	.		.		-	.	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	I	.	-	.
>RBF125	T	0,0035	<0,001	0,46	.	.	.	L	-	.	.	G	I	-	.	-	.	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	.	.	-	.
>YBF30	VIH-1/P	<0,001	0,87	0,17	.	K	.	.	.	.	.	.	.	-	I	-	.	-	.	.	.	.	.	-	.	.	.	-	.	.	.	-	N
>RBF189	H	<0,001	0,41	0,0067	.	.	.	L	-	E	.	G	.	-	.	-	.	-	I	.	N	.	P	-	H	I	.	-	.	I	.	-	.
>BCF183	H	<0,001	0,29	0,016	.	K	.	L	-	E	.	G	.	-	.	-	KR	-	I	.	.	.	P	-	H	I	.	-	.	I	.	-	.
>N.FR.2011	VIH-1/P	<0,001	0,02	0,35	.	.	.	.	-	.	.	.	.	-	I	-	.	-	.	.	.	.	.	-	.	.	.	-	.	.	.	-	N

	p56	-	p59	p60	-	p63	-	p68	-	p72	p73	p74	-	p83	p84	-	p91	p92	p93	-	p95	p96	p97	p98	p99	p100	p101	-	p106	-	p110
>B.HXB2-BRU	C	-	G	I	-	L	-	L	-	V	I	L	-	Y	I	-	A	E	T	-	Q	E	T	A	Y	F	L	-	G	-	V
>O.ANT70	C	-	E	V	-	I	-	M	-	I	I	I	-	F	I	-	A	E	T	-	Q	E	T	A	Y	F	L	-	A	-	V
>YBF38	Y	-	E	V	-	I	-	.	-	.	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF113	.	-	E	V	-	I	-	I	-	I	.	I	-	F	.	-	.	.	S	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF011	.	-	E	.	-	M	-	.	-	I	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>YBF37	.	-	.	V	-	M	-	.	-	.	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	A	.	.	.	.	-	A	-	I
>BCF111	.	-	E	V	-	I	-	.	-	I	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF006	Y	-	E	.	-	M	-	.	-	I	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF101	.	-	E	V	-	I	-	T	-	.	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF008	.	-	E	V	-	I	-	.	-	.	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>YBF39	.	-	E	V	-	M	-	T	-	.	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	IV
>YBF17	.	-	E	V	-	M	-	A	-	.	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>RBF168	.	-	.	.	-	.	-	T	-	I	.	.	-	F	L	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	V	-	A	-	.
>BCF005	.	-	E	.	-	M	-	.	-	I	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	I
>BCF009	.	-	E	V	-	I	-	V	-	.	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF109	.	-	E	V	-	I	-	V	-	.	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF003	.	-	E	V	-	IM	-	.	-	.	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF013	.	-	E	V	-	I	-	.	-	.	.	I	-	F	.	-	T	.	.	-	.	.	.	.	H	.	.	-	A	-	.
>YBF26	.	-	E	V	-	I	-	.	-	I	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF177	.	-	E	V	-	I	-	V	-	.	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>RBF206	.	-	E	V	-	M	-	.	-	I	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF010	.	-	E	.	-	M	-	.	-	I	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF120	.	-	E	V	-	I	-	V	-	.	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF057	.	-	E	V	-	M	-	.	-	I	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>YBF35	.	-	E	V	-	M	-	.	-	I	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF112	.	-	E	V	-	I	-	.	-	.	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF001	Y	-	E	V	-	I	-	.	-	.	.	I	-	F	.	-	T	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF100	Y	-	E	V	-	.	-	.	-	IV	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>RBF130	.	-	E	V	-	I	-	V	-	.	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF002	.	-	E	V	-	I	-	V	-	.	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>YBF18	.	-	E	V	-	M	-	V	-	.	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	EK	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>YBF16	.	-	E	.	-	M	-	.	-	I	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF108	.	-	E	V	-	I	-	T	-	.	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>MVP5180	Y	-	E	.	-	M	-	.	-	I	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>YBF32	.	-	E	V	-	I	-	.	-	I	.	I	-	F	.	-	.	.	S	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF178	.	-	E	V	-	I	-	A	-	.	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>RBF125	Y	-	E	.	-	M	-	.	-	I	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>YBF30	.	-	.	V	-	.	-	.	-	I	.	.	-	.	L	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	I	-	.	-	.
>RBF189	.	-	.	.	-	M	-	.	-	.	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>BCF183	.	-	E	V	-	I	-	.	-	I	.	I	-	F	.	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	A	-	.
>N.FR.2011	-	.	V	-	.	-	.	-	.	.	I	-	.	L	-	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	M	-	.	-	.	.

	p111	p112	p113	-	p119	-	p123	p124	p125	p126	p127	-	p133	p134	p135	p136	p137	-	p140	p141	-	p150	-	p152	p153	-	p160	-
>B.HXB2-BRU	K	T	I	-	S	-	G	A	T	V	R	-	A	G	I	K	Q	-	G	I	-	V	-	E	S	-	K	-
>O.ANT70	K	V	I	-	P	-	S	T	T	M	K	-	A	N	I	Q	H	-	G	I	-	V	-	E	A	-	S	-
>YBF38	.	V	.	-	PT	-	S	.	.	M	K	-	T	N	.	R	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF113	.	V	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	T	N	.	.	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF011	.	I	.	-	P	-	S	.	A	M	K	-	T	.	.	Q	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>YBF37	.	V	L	-	T	-	S	.	.	M	K	-	T	N	.	Q	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF111	.	V	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	T	N	.	.	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF006	.	I	.	-	P	-	S	.	A	M	K	-	T	.	.	Q	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF101	.	V	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	T	N	.	.	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF008	.	I	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	T	N	.	R	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>YBF39	.	I	.	-	P	-	S	.	A	M	K	-	T	N	.	Q	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>YBF17	.	V	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	.	N	.	.	.	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>RBF168	.	V	.	-	P	-	S	.	A	.	K	-	L	N	.	T	H	-	.	.	-	.	-	.	.	-	.	-
>BCF005	.	I	L	-	P	-	S	.	A	M	K	-	T	N	.	Q	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF009	.	I	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	T	N	.	T	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF109	.	V	.	-	P	-	S	.	A	M	K	-	T	N	.	Q	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF003	.	V	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	.	N	.	Q	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF013	.	V	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	T	N	.	Q	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	A	-
>YBF26	.	V	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	T	N	.	R	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF177	.	I	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	T	N	.	T	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>RBF206	.	I	.	-	P	-	S	T	A	M	K	-	T	.	.	T	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF010	.	V	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	T	.	.	Q	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF120	.	V	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	T	N	.	Q	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF057	.	V	.	-	P	-	S	.	A	M	K	-	T	.	.	Q	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>YBF35	.	I	.	-	P	-	S	.	A	M	K	-	T	.	.	.	.	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF112	.	V	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	.	N	.	Q	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF001	.	V	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	.	N	.	Q	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF100	.	V	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	T	N	.	.	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>RBF130	.	V	.	-	T	-	S	.	.	M	K	-	T	N	.	.	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF002	.	V	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	T	N	.	Q	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>YBF18	.	V	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	.	N	.	Q	.	-	EG	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>YBF16	.	I	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	T	.	.	Q	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF108	.	V	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	T	N	.	.	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>MVP5180	.	V	.	-	P	-	S	.	A	M	K	-	T	.	.	Q	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>YBF32	.	V	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	T	N	.	.	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF178	.	I	.	-	P	-	S	.	.	M	K	-	T	N	.	.	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>RBF125	.	V	.	-	P	-	S	AT	A	M	K	-	T	.	.	Q	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>YBF30	.	V	.	-	.	-	S	.	.	.	K	-	.	N	.	.	.	-	.	.	-	A	-	.	.	-	.	-
>RBF189	.	I	.	-	.	-	S	.	.	M	K	-	.	N	.	Q	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>BCF183	.	IV	.	-	P	-	S	.	S	M	K	-	T	N	.	.	H	-	.	.	-	.	-	.	A	-	S	-
>N.FR.2011	V	.	-	P	-	S	.	.	K	-	.	N	.	.	.	-	.	.	-	A	-	.	.	-	.	-	.	.

	p163	p164	p165	-	p173	-	p182	-	p191	-	p194	p195	p196	-	p200	p201	p202	p203	p204	p205	p206	p207	p208	p209	p210	p211
>B.HXB2-BRU	G	Q	V	-	K	-	I	-	I	-	Y	S	A	-	I	V	D	I	I	A	T	D	I	Q	T	K
>O.ANT70	Q	Q	V	-	R	-	V	-	I	-	Y	T	A	-	I	I	D	I	L	A	S	Q	I	Q	T	T
>YBF38	Q	.	.	-	R	-	V	-	M	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>BCF113	Q	.	.	-	R	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>BCF011	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	L	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>YBF37	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	L	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>BCF111	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>BCF006	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	L	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>BCF101	Q	.	.	-	R	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>BCF008	Q	.	.	-	R	-	V	-	.	-	.	T	P	-	.	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>YBF39	Q	.	.	-	R	-	V	-	.	-	.	T	.	-	L	I	.	T	L	.	S	Q	.	.	.	T
>YBF17	Q	.	.	-	R	-	.	-	.	-	.	T	.	-	L	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>RBF168	L	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	M	.	.	Q	.	.	.	T
>BCF005	Q	.	.	-	R	-	V	-	.	-	.	T	.	-	L	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>BCF009	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>BCF109	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	H	.	.	.	T
>BCF003	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>BCF013	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	H	.	.	.	T
>YBF26	E	.	.	-	R	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>BCF177	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>RBF206	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	C	T	.	-	L	I	.	M	L	.	S	Q	.	.	.	T
>BCF010	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	L	I	.	.	L	.	S	Q	L	.	.	T
>BCF120	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	H	.	.	.	T
>BCF057	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	L	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	I	T
>YBF35	Q	.	.	-	.	-	.	-	.	-	.	T	.	-	L	L	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>BCF112	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	H	.	.	.	T
>BCF001	Q	.	.	-	R	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	H	.	.	.	T
>BCF100	Q	.	.	-	R	-	V	-	M	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>RBF130	Q	.	.	-	R	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>BCF002	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	H	.	.	.	T
>YBF18	Q	.	.	-	R	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	.	Q	.	.	.	T
>YBF16	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	L	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>BCF108	Q	.	.	-	R	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>MVP5180	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	L	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>YBF32	Q	.	.	-	R	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>BCF178	Q	.	.	-	R	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>RBF125	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	L	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>YBF30	.	.	I	-	.	-	.	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
>RBF189	Q	.	.	-	R	-	V	-	.	-	.	T	.	-	L	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>BCF183	Q	.	.	-	.	-	V	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	L	.	S	Q	.	.	.	T
>N.FR.2011	I	-	.	-	.	-	.	-	.	T	.	-	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	K	-

	p212	-	p215	-	p218	p219	p220	p221	p222	p223	p224	-	p232	p233	p234	-	p240	-	p252	p253	p254	p255	-	p258	-	p263
>B.HXB2-BRU	E	-	K	-	T	K	I	Q	N	F	R	-	N	P	L	-	K	-	Q	D	N	S	-	K	-	R
>O.ANT70	E	-	K	-	L	K	?	H	K	F	R	-	D	P	I	-	Q	-	Q	D	K	G	-	K	-	R
>YBF38	.	-	.	-	F	.	.	.	K	.	Q	-	D	.	I	-	Q	-	LQ	.	K	G	-	KN	-	.
>BCF113	.	-	.	-	F	.	.	.	K	.	Q	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF011	.	-	.	-	L	.	.	.	.	.	.	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>YBF37	.	-	.	-	L	.	.	.	K	.	Q	-	D	.	V	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF111	.	-	.	-	F	.	.	.	K	.	Q	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF006	.	-	.	-	L	.	.	.	.	.	Q	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF101	.	-	.	-	F	.	.	.	K	.	Q	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF008	.	-	.	-	F	.	.	.	K	.	Q	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>YBF39	.	-	.	-	L	.	.	.	K	.	.	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>YBF17	.	-	.	-	L	.	.	.	.	.	.	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>RBF168	.	-	.	-	L	.	.	.	.	.	.	-	D	.	I	-	T	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF005	.	-	.	-	L	.	.	.	.	.	.	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF009	.	-	.	-	F	.	.	.	K	.	Q	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF109	.	-	.	-	F	.	.	.	.	.	.	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF003	.	-	.	-	L	.	.	.	.	.	.	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF013	.	-	.	-	L	.	.	.	.	.	.	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>YBF26	.	-	.	-	F	.	.	.	K	.	Q	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF177	.	-	.	-	F	.	.	.	K	.	Q	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>RBF206	.	-	.	-	L	.	.	.	K	.	.	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF010	.	-	.	-	L	.	.	.	K	.	.	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF120	.	-	.	-	L	.	.	.	.	.	.	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF057	.	-	.	-	F	.	.	.	.	.	QR	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>YBF35	.	-	.	-	L	.	.	.	.	.	.	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF112	.	-	.	-	L	Q	.	.	.	.	.	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF001	.	-	.	-	F	.	.	.	.	.	Q	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF100	.	-	.	-	F	.	.	.	K	.	Q	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>RBF130	.	-	.	-	F	.	.	.	K	.	Q	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF002	.	-	.	-	L	.	.	.	.	.	Q	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>YBF18	.	-	.	-	L	.	.	.	.	.	.	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>YBF16	.	-	.	-	L	.	.	.	.	.	.	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF108	.	-	.	-	F	.	.	.	K	.	Q	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>MVP5180	.	-	.	-	L	.	.	N	.	.	.	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>YBF32	.	-	.	-	F	.	.	.	K	.	Q	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF178	.	-	.	-	F	.	.	.	K	.	Q	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>RBF125	.	-	.	-	F	.	.	.	.	.	Q	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>YBF30	N	-	T	-	L	.	V	.	.	.	.	-	D	.	I	-	.	-	.	.	.	G	-	.	-	.
>RBF189	.	-	.	-	L	.	.	.	K	.	.	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>BCF183	.	-	.	-	F	.	.	.	K	.	Q	-	D	.	I	-	Q	-	.	.	K	G	-	.	-	.
>N.FR.2011	T	-	L	.	V	.	.	.	.	-	D	.	I	-	.	-	.	.	.	G	-	.	-	.		

Annexe 4: Article original

"HIV-1 non-group M phenotypic susceptibility to integrase strand transfer inhibitors"

Accessible en ligne : doi : 10.1093/jac/dkx190

Annexe 5: Correspondance

"HIV-1 group O resistance pathway with raltegravir is similar to HIV-1 group M"

Accessible en ligne : doi: 10.1097/QAD.0000000000000703

Annexe 6: Article original

"HIV-1 group O infection in France: clinical features and immunovirological response to antiretrovirals"

HIV-1 group O infection in France: clinical features and immunovirological response to antiretrovirals

Name of all authors:
UNAL Guillemette[1,2], ALESSANDRI-GRADT Elodie[1] , LEOZ Marie[1], PAVIE Juliette[3], LEFEVRE Clément[1], PANJO Henri[2], CHARPENTIER Charlotte[4], DESCAMPS Diane[4], BARIN Francis[5], SIMON François[6], MEYER Laurence[2,7], PLANTIER Jean-Christophe[1].

Affiliation of all authors:

1 – Normandie Univ, UNIROUEN, GRAM EA2656, CHU de Rouen, Laboratoire de Virologie, associé au Centre National de Référence du VIH, F 76000, Rouen, France

2 – Faculté de Médecine Paris Sud, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre, France; CESP INSERM U1018, Centre de recherche en Epidémiologie et Santé des Populations, le Kremlin Bicêtre, France

3- APHP, Hôpital Georges Pompidou, Faculté de Médecine, Paris Descartes, Paris, France

4- APHP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Laboratoire de Virologie, INSERM, IAME, UMR 1137, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

5- Laboratoire de virologie associé au CNR du VIH, Inserm U966, CHU de Tours, Tours, France,

6- University Hospital Saint Louis, Faculté de Médecin Paris Diderot, Paris, France

7- APHP, Hôpital de Bicêtre, le Kremlin-Bicêtre, France

Running title: Characteristics of HIV-1/O infection

Keywords:
HIV-1 group O, HIV genetic diversity, ARV therapy, immunovirological response, clinical features

Complete contact and information for both the corresponding and alternate corresponding authors:
Corresponding authors: Jean-Christophe PLANTIER and Laurence MEYER
jc.plantier@chu-rouen.fr - laurence.meyer@inserm.fr

Summary: Our study shows that HIV-1/O infection could have a milder natural evolution relative to HIV-1/M, and that its current therapeutic management (excluding use of NNRTI-based regimens), is highly efficient despite the genetic divergence of group O variants.

Abstract

Objectives: To obtain reliable data on the clinical features of HIV-1/O infection, and on the immunological and virological responses to cART, based on a large series of 101 patients.

Methods: Piecewise linear models were used to estimate CD4 cell count before and after cART initiation. Kaplan-Meier survival curves were used to estimate time to reach clinical stage CDC C before ART, and to analyze the time to achieve a plasma viral load (pVL) <40 cp/mL following cART initiation. Immuno-virological response was also assessed at the most recent visit in patients on active follow-up.

Results: Data on natural course of the infection showed a 16.6% cumulative probability of reaching stage C within 5 years following HIV diagnosis, and a mean decrease of CD4 count of -30.5 cells/mm3/year. cART initiation in ART-naive patients led to a mean gain of +147 CD4/mm3 after 12 months, and to a median pVL of <40 cp/mL after 3.8 months for 89.3%. Initiation with a non-recommended NNRTI- versus a PI/r-based regimen resulted in a much smaller gain of around 100 CD4/mm^3 after one year. Patients still on follow-up since 2007 had a median CD4 of 498/mm3 and 87% had a pVL<40cp/mL at the most recent follow-up visit.

Conclusion: This work provides unique data on HIV-1/O infection, in favor of a milder natural evolution relative to HIV-1/M, and of a highly efficient current management, based on HIV-1/M guidelines, despite the genetic divergence. Studies of comparable HIV-1/M and HIV-1/O populations are now needed to confirm these results.

Introduction

Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) is subdivided into four genetically distinct groups: M (HIV-1/M, for Major), O (HIV-1/O, for outlier), N, and P. HIV-1/O, discovered in Belgium in 1990 in a Cameroonian couple [1], is endemic in west-central Africa, especially Cameroon, with an estimated prevalence between 0.6% and 1% of all HIV infections [2-4]. HIV-1/O infections have also been detected elsewhere in Africa, Europe, and the US [5]. In France, the first HIV-1/O virus was isolated from a woman who died of AIDS in 1992, who had no known links with Africa [6]. Several cases were further diagnosed, mostly in Cameroonian patients or patients living in France, but with connections to Cameroon [7, 8]**.** Owing to continuous virological survey of HIV genetic diversity, the French National Reference Center (NRC) of HIV reported 134 cumulative cases of HIV-1/O mono-infection in 2017 (NRC data, [9]).

HIV-1/O strains are genetically and antigenically distinct from HIV-1/M [10]. The impact of this divergence on serological screening [7, 8, 11, 12] and virological monitoring is well known, and has led to the development of appropriately adapted tools [13-15]. This high genetic divergence raises other questions, in particular on the clinical features and natural evolution of the infection. While occurrence of clinical AIDS has been reported in HIV-1/O patients [7, 16-18], case reports described follow-up of only one or two patients [18-21], with observations limited to showing a decrease in $CD4^+$ T cell (CD4) levels. Analyses of HIV-1/O sequences from antiretroviral (ARV)-naive patients also showed a high level of natural polymorphism in ARV targets, with phenotypic consequences, such as natural resistance to Non-Nucleoside RT Inhibitors (NNRTI) [22, 23],

and prediction of genotypic resistance for some protease inhibitors [24]**.** However, the impact on *in vivo* virological and immunological responses to ART is not well-known [24-30]. This lack of data on bio-clinical outcomes has led to empiric therapeutic management, similar to that of HIV-1/M infection, without knowing if it is well adapted.

The aim of this study, based on a large series of 101 HIV-1/O infected patients living in France, was to obtain unique and reliable data on the clinical features of this population, and on the immunological and virological responses to cART.

Patients and Methods

ANRS EP50 ORIVAO

The ANRS EP50 ORIVAO study was performed between April 2012 and May 2014 in 48 French clinical centers. Inclusion criteria were: all HIV-1/O positive patients (irrespective of the year of diagnosis) followed in France. Data on routine clinical care, available in the clinical file, were collected and included plasma viral load (pVL), CD4, ART history, and clinical AIDS events.

The study was approved by the North-West III Ethics committee.

HIV-1/O diagnosis and monitoring

HIV-1/O diagnosis was established by *env* serotyping that is an ELISA using synthetic peptides as antigens (supplementary methods), followed by molecular confirmation and phylogenetic characterization, using HIV-1/O-specific (RT-) PCRs (supplementary methods).

Plasma viral loads (pVL) were monitored using non-group-specific commercial kits - LCx or RealTime HIV-1 (Abbott Molecular, Rungis, France), Cobas TaqMan HIV-1 Version 2.0, (Roche, Meylan, France) - or HIV-1/O-specific qRT-PCR developed by NRC, targeting either the LTR or integrase regions (supplementary methods).

Statistical analysis

Patient characteristics were described by continuous variables expressed as medians and interquartile ranges (IQRs), and qualitative variables expressed as frequencies and percentages. Immunological and virological characteristics at diagnosis were defined as the first CD4 cell count and pVL obtained within the first year after HIV diagnosis, and before any ART initiation.

Three different calendar periods taking into account evolution of ARV classes were considered: (1) 1996 to 2000 (before widespread use of PI/r), (2) 2000 to 2006 (widespread use of PI/r), and (3) 2007 to 2014 (availability of the new class of Integrase Inhibitors and new PI/r: Darunavir).

The natural evolution of HIV-1/O infection was explored by monitoring progression to clinical stage CDC C and decrease in CD4 counts before treatment initiation. The time to reach clinical stage CDC C before ART,

among patients diagnosed at stage A or B, was analyzed by using Kaplan-Meier survival curves. This method was used, since only two patients were lost to follow-up (LTFU) and no death was observed before the occurrence of the outcome. Decreases in CD4 between diagnosis and treatment initiation (or before LTFU) were modeled among patients with at least one CD4 value while still untreated. These decreases were studied using a piecewise linear mixed-effects model to account for the correlation between values in a given subject. CD4 decreases were modeled during the first 64 months following HIV diagnosis, as this corresponds to the third quartile of the distribution of times between HIV diagnosis and the last available CD4 measurement while still untreated.

Immunological and virological responses to cART (defined as a treatment regimen with at least three ARV drugs) were analyzed using two approaches: (i) a longitudinal approach, and (ii) a cross-sectional approach (Figure 1).

In the longitudinal approach, responses to cART were analyzed in ARV-naive patients starting from cART initiation. CD4 counts and pVL values obtained between 2 months before and 7 days after cART initiation were considered as baseline values. cART was considered to have ended if it was interrupted for more than one month, or in case of a switch to mono- or dual-therapy. Immunological response to cART was analyzed for patients with at least one CD4 value. All values available from the initiation to the end of cART were considered. The gain of CD4 was modeled using a piecewise linear mixed-effects models, with two slopes and both fixed and random effects for the intercept and the slopes. The best model was chosen using Akaike information criteria. CD4 cell count kinetics were analyzed using a square root scale to obtain a normal distribution for the description of the evolution of CD4 counts. Virological response was analyzed for patients with at least one pVL value within the first year of cART, aside from the initiation pVL. Kaplan-Meier survival curves were used to analyze the time to achieve a first pVL below 200 cp/mL; this threshold was chosen to take into account the limit of quantification of some older assays (supplementary methods). The analysis was repeated in the subset of patients monitored by a more recent assay with a threshold of 40 cp/mL. Kaplan Meier survival methods were used since no mortality or lost to follow-up events occurred before the occurrence of the outcome.

Owing to the natural *in vitro* resistance of HIV-1/O to NNRTI we focused on responses to NNRTI-based regimens taken as first-line cART and compared them to the responses to first-line PI/r-based regimens. NNRTI-based and PI/r-based immunological responses were compared by introducing a variable “treatment” in the model, and testing interaction terms between treatments and slopes. For this analysis, patient follow-up data were censored at the end of first-line ARV treatment, i.e. at the end of the NNRTI- or PI/r-based regimen. Virological response could not be compared between the two groups owing to the insufficient number of pVL measurements for patients initiating the NNRTI-based regimens.

In the cross-sectional approach, immunological and virological responses were determined for all patients still being followed during the most recent calendar period (2007 to 2014), regardless of the previous ART regimens they received. Two groups were described to account for the impact of having received several regimens before 2007: patients with treatment initiated either (i) before 2007 or (ii) in 2007 or thereafter. Immunological and virological responses were assessed at the most recent available visit.

Analyses were performed using STATA software (release 13; Stata Corp, College Station, Texas).

Results

Clinical features of the HIV-1/O patients

Between April 2012 and May 2014, 101 patients identified in 48 clinical centers were enrolled in the study (Table 1; supplementary results).

The median CD4 count at HIV diagnosis was 250 CD4/mm^3 (Table 1), and 40% patients had less than 200 CD4/mm^3; the median pVL value at HIV diagnosis was 4.0 log cp/mL. At diagnosis, 89.1% patients were stage A or B and 10.9% were stage C . Among the stage A or B patients, ART was initiated in 5 at diagnosis and in 82 within a median of 0.7 (IQR: 0.2; 5.0) years after HIV diagnosis; three were LTFU before initiating ART, within a median of 2.1 (2.1; 8.0) years following diagnosis. Among the 85 stage A or B patients without treatment initiation at diagnosis, 8 reached stage C before ART initiation and one before being lost to follow-up, due to the development of opportunistic infections. The cumulative probability of reaching stage C was 9.0% (95%CI: 3.7; 21.0) and 16.6% (7.7; 33.7), 1 and 5 years after HIV diagnosis, respectively.

We analyzed the natural evolution of CD4 counts for the 66 patients who had at least one CD4 measurement while still untreated (median of 2 (IQR: 1; 4) measurements before treatment initiation, measured over a median period of 26.9 (5.1; 63.6) months following diagnosis). The estimated average decrease of CD4 counts was -30.5 (95%CI: -40.3; -18.7) cells/mm^3/year.

Immunological and virological responses to cART

We focused on the 80 naive patients with cART initiation; Table 1; Figure 1). cART was initiated after a median of 0.51 years after HIV diagnosis (Table 2), and the median year of cART initiation was 2004 (IQR: 2002; 2009). At cART initiation, the median CD4 count was 201 CD4/mm^3, and median pVL 4.1 log cp/mL (Table 2). The regimens initiated were preferentially 2NRTI+1PI/r (51.3%), followed by 2NRTI+1NNRTI (18.8%); initiation with an NNRTI-based regimen was related to later diagnosis of HIV-1/O status (supplementary results).

We analyzed the immunological response to cART of the 74 patients who had at least one available CD4 measurement since cART initiation (median of 12 CD4 (5; 22) measurements per patient, during a median follow-up of 44 (17; 90) months). The modeled CD4 dynamics during cART is shown in Figure 2. The best model was obtained using two slopes (0-4 months and > 4 months), showing a mean CD4 cell count increase of 1.02 (95%CI: 0.86; 1.17) √CD4/month between 0 and 4 months and 0.05 (0.03; 0.07) √CD4/month after 4

months of treatment. For example, the model predicted that a patient who started cART at a mean of 200 CD4/mm^3 would reach a mean of 347 (324; 370) and 370 (344; 396) CD4/mm^3 after 12 and 24 months of cART, respectively.

Owing to the natural *in vitro* resistance of HIV-1/O to NNRTI, we specifically analyzed the immunological response of the 14 patients who received a first-line NNRTI-based regimen and compared their response to that of the 37 patients who received a first-line PI/r-based regimen. The modeled CD4 dynamics are shown in Figure 3. The first increase tended to be smaller for patients on an NNRTI-based regimen than patients on a PI/r-based regimen, although the difference was of borderline significance (p=0.09). After these first 4 months, the slope for the PI/r group continued to increase significantly (p<0.01), whereas there was no further gain of CD4 within the NNRTI group (p=0.6) (Table 3). The model predicted that after 12 months of cART, a patient starting cART at 200 CD4/mm^3 would reach a mean of 377 (343; 414) CD4/mm^3 for the PI/r-based regimen versus 279 (214; 354) CD4/mm^3 for the NNRTI-based regimen (p=0.02).

We analyzed the virological response for the 49 patients who had at least one pVL available within the first year of cART, except at initiation. Forty-five (91.8%) patients reached a pVL<200cp/mL; the median time taken to reach a pVL<200 cp/mL after cART initiation was 3.1 (IQR: 1.4; 4.9) months. The cumulative probability of having a viral load <200cp/mL after 6 and 12 months of cART was 0.81 (95%CI: 0.69; 0.91) and 0.85 (0.74; 0.94), respectively (Figure 4). In the 28 monitored patients with a virological threshold of 40cp/mL, 25 (89.3%) reached a pVL<40cp/mL within a median of 3.8 (IQR: 2.0; 5.5) months following cART initiation. The cumulative probability of having a pVL<40cp/mL after 6 and 12 months of cART was 0.78 (95%CI: 0.65; 0.94) and 0.96 (0.81; 0.99), respectively. There was a trend towards a faster virological response in patients who started cART in 2007 or thereafter, (supplementary results).

Current management of HIV-1/O patients

Between 2007 and 2014, 84% (85) of the 101 enrolled patients were still on active follow-up and were all receiving cART. At the most recent follow-up visit, the median CD4 count was 498 (IQR: 381; 612) CD4/mm^3; 48% of the patients (41/85) had CD4 counts above 500 CD4/mm^3. Among the 77 patients with treatment initiation more than 6 months before, 87% had a pVL<40cp/mL, which rose to 90.5% among the 21 patients with an ongoing regimen that included INSTI.

Among these 85 patients, cART was initiated in 57 before 2007: 37% with 2NRTI+1PI/r, 32% with 2NRTI+1PI, 18% with 2NRTI+1NNRTI, and 14% with 3NRTI. At cART initiation, they had a median of 213 CD4/mm^3 and the median pVL was 4.3 log cp/mL (Table 4). Their most recent visit occurred after a median 12.8 (10.3; 16.7) years of treatment, a period during which they received a median of eight (5; 12) different ART regimens. The most recently received treatment was a PI/r-or INSTI-based regimen (40.3% and 36.8%, respectively; Table 4). The most recent CD4 measurement was a median of 498/mm^3; 85.2% of the patients had a pVL<40cp/mL.

In 28 patients, cART was initiated in 2007 or thereafter, 78.6%, 17.9% and 3.6% (n=1) with a PI/r-based, an NNRTI-based, and a PI-based regime, respectively. At treatment initiation, they had a median of 256 CD4/mm^3 and a pVL of 4.1 log cp/mL. At the most recent follow-up visit, 78.6% were receiving a PI/r-based and 14.3% an INSTI-based regimen. The most recent CD4 count was a median of 506/mm^3 and among the 23 patients with cART initiation more than 6 months before, 91.3% had a pVL <40cp/mL.

Discussion

The HIV genetic diversity surveillance system, implemented at the end of the 90s in France, resulted in the identification of many HIV-1/O cases outside the endemic area in Cameroon. This allowed us to follow the largest series of HIV-1/O patients to date, and thus to better characterize this particular population and evaluate its immunovirological response to cART.

We observed that 80% of the 101 patients originated from Cameroon or another sub-Saharan African country. This characteristic can be explained by strong and historical links between France and Cameroon, and suggests absence of a current secondary epidemic in France.

The only available data concerning the natural evolution of HIV-1/O infection, resulted from four cases, which only described CD4 progression [19],[18],[21]. Here, we quantified the spontaneous decrease of CD4 and clinical progression. Among the 101 patients, 89% were diagnosed at stage A or B, with an estimated 16.6% probability of becoming stage C 5 years after diagnosis (95% CI: 7.7; 33.7). This estimate is close to that based on the natural history of the virus in HIV-1/M subjects [31, 32], determined in populations with known seroconversion dates. However, a formal comparison is difficult, due to the low number of AIDS defining events in our population and to unknown seroconversion dates. We also estimated that the rate of CD4 decrease before ART initiation was -30.5 cell/mm^3/year. This decrease was less pronounced than for HIV-1/M (from -49 to -63 cells/mm^3/year) [33], but more than for HIV-2 (-11 cells/mm3/year), a major variant known to be less pathogenic than HIV-1 [34]. Our data suggest that the spontaneous evolution of HIV-1/O infections may be between that of HIV-1/M and HIV-2. This could be linked to a median pVL of 4.0 log cp/mL at HIV-1/O diagnosis, between 2.6 log cp/mL for HIV-2 and 4.4 log cp/mL for HIV-1/M patients [34]. This apparently lower value relative to HIV-1/M requires confirmation in clinical studies with comparable group O and group M populations, and exploration by complementary *in vitro* analyses focusing on group O fitness, since it was previously reported as lower than for group M and HIV-2 [35].

This work also provided the opportunity to evaluate immunological and virological responses to cART in the specific context of care standards in high-income countries. Previous cases have been reported, but with early generation ART [26, 29, 30] or recent drugs in the context of salvage therapies [25, 27, 28]. Here, we show that cART initiation led to a large mean gain of 147 CD4/mm^3 after 1 year and an overall mean of 200 CD4/mm^3. A virological response below 40cp/mL was achieved for almost 90% of patients, after a median of

3.8 months following cART initiation, and even earlier (3.1 months) in patients with cART initiation in 2007 or thereafter, *i.e.* with the most recent cART regimens (supplementary results). Fifty percent of patients followed between 2007 and 2014 had more than 500 CD4/mm^3 and 87% had a pVL<40 cp/mL at their last visit (reaching more than 90% in the most recently treated patients). Our data are in accordance with current observations in the overall HIV population followed in France, with 56.7% of patients with more than 500 CD4/mm^3 and 88.5% with a pVL<50 cp/mL in the ANRS-VESPA2 study [36], and in patients born outside France in the FHDH cohort, including 80% of patients from Sub-Saharan Africa, with 47% with more than 500 CD4/mm^3 and 84% with a pVL<50 cp/mL [37]. These data demonstrate that current management of HIV-1/O infection based on to HIV-1/M guidelines is highly efficient despite genetic divergence.

However, we found an unexpectedly high frequency (18%) of cART initiation with an NNRTI regimen, although this therapeutic class is not recommended, due to natural resistance of HIV-1/O [22, 23]. This was clearly linked to the delayed knowledge of HIV-1/O status at cART initiation, as previously observed for HIV-2, the other major variant that is naturally resistant to NNRTI [38]. Initiation with an NNRTI-based regimen resulted in a smaller gain of CD4, than initiation with a PI/r-based regimen one year after initiation, with a difference of around 100 CD4/mm^3. This is likely related to virological failure although the insufficient number of pVL measurements for these patients prevented us from demonstrating it. A similar evolution of CD4 increase was observed in HIV-2 patients receiving NNRTI, with a sharp halt in the CD4 increase after 2 months of treatment [38]. These results highlight the importance of identifying the variant before cART initiation.

In conclusion, this work allowed us to obtain unique and reliable data on HIV-1/O patients, their clinical features, and therapeutic management, in France. These results also underline that *ad hoc* studies between M and O populations with similar clinical and demographic characteristics are needed to definitively compare HIV-1/M and HIV-1/O natural and under cART courses. Finally, although most of our study population was from sub-Saharan Africa, our results are not necessarily representative of the situation for the population living in Cameroon, where medical care and treatment are different to those available in France. Furthermore, our Cameroonian population living in France may be a selected population due to the well-known healthy migrant effect [39]. A local observatory is therefore needed to evaluate the current situation in the endemic area, in particular due to the frequent use of NNRTI-based first-line regimens, without systematic identification of HIV-1/O.

Fundings: This work was supported by the Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les hépatites virales (ANRS), Sidaction, and Rouen University Hospital.

Potential conflicts of interest (all authors): none

Acknowledgments

We thank the technical team of the Virology Laboratory of Rouen, Anne Persoz and Rémonie Seng from the CESP Inserm U1018, Kremlin-Bicetre, and the patients, clinical and virology units for participating in the ANRS EP50 ORIVAO study. We are also grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for her help in editing the manuscript.

Members of the ANRS EP50 ORIVAO study:

J.Chennebault, P.Fialaire, H.Le Guillou-Guillemette, S.Rehaiem (CHU d'Angers), B.Chanzy, G.Clavere, J.Gaillat (CH d'Annecy Genevois), L.Courdavault, P.Genet, J.Gerbe (Hôpital Victor Dupouy d'Argenteuil), C.Benoit, S.Honore Bouakline, A.Waldner (CH d'Auxerre), D.Bettinger, C.Chirouze, (CHU de Besançon), N.Bernard, S.Reigadas (CHU de Bordeaux), X.Dupont, JL.Gaillard, E.GauLT, E.Reimann (Hôpital Ambroise Paré de Boulogne Billancourt), G.Otterbein, L.Thomas, P.Vaghefi (CH Sainte Camille de Bry-sur-Marne), M.Benoit, N.Buthiot, A.Goux (CH de Chalon sur Saône), V.Chambrin, C.Deback, R.Fior, M.Raho Moussa, (Hôpital Antoine Béclère de Clamart), O.Antoniotti, D.Coban, L.Cormerais, C.Henquell, C.Jacomet, O.Lesens, (CHU de Clermont-Ferrand), N.Chanoine, A.Villmant, JL.Van Autreve (Hôpital Beaujon de Clichy), M.Bloch, H.Ichou, V.Manceron, E.Mortier, A.Zeng (Hôpital Louis Mourier de Colombes), M.Bouvier-Alias, S.Dominguez, AS.Lascaux-Cametez, JD.Lelievre, Y.Levy, G.Melica-Gregoire, JM. Pawlotsky, (Hôpital Henri Mondor de Créteil), P.Pothier, A.Waldner (CHU de Dijon), L. Inchiappa, A.Verhaeghe (CH de Dunkerque), B.Olivier, JP.Pathe, (Hôpital d'Evreux), H.Berthe, D.Mathez (Hôpital Raymond-Poincaré de Garches), V.Favret, D.Troisvallets, E.Vandemeulebroucke (CH de Gonesse), J.Ceccaldi, Z.El Harif (CH de Libourne), L.Bocket (CHRU Lille), P.Barbut, F.Chaix, C.Lambert, T.Lambolez, J.Miatezila, O.Son (Hôpital de Longjumeau), P.Brunet, C.Chappe, C.Dhiver, V.Lecomte, L.Meddeb, I.Poizot-Martin, C.Tamalet, J.Valadier, (GH de Marseille), G.Beck-Wirth, M.Benomar, JM.Delarbre, JM.Peter (CH de Mulhouse), S.Bevilacqua, V.Venard (CHRU de Nancy), V.Daneluzzi, N.Idri, B.Montoya (CASH de Nanterre), V.Ferre, E.Garnier, H.Hue, L.Larmet, P.Point, F.Raffi, V.Reliqiet, A.Rodallec, S.Secher (CHU de Nantes), P.Amoyel, E.Botton, M.Janowski, Y.Le Cocguic (Hôpital Américain de Paris de Neuilly sur seine), P.Deleplanque, JM.Descamps, M.Lapine, S.Sunder (CH de Niort), M.Chansombat, C.Charpentier, F.Damond, B.Diallo, X.Duval, Z.Julia, R.Landman, S.Legac, C.Rioux, P.Yeni (CHU Bichat Claude Bernard de Paris), A.Krivine, P.Blanche (Hôpital Cochin de Paris), A.Cros, P.Gazalet, J.Ghosn, A.Krivine, A.Sobel (Hôpital Hôtel Dieu de Paris), B.Bercot, M.Diemer, M.Parrinello, (Hôpital Lariboisière de Paris), C.Bey Boumezrag, L.Bodard, S.Gibert, FX.Huche, L.Raffenne, M.Strebler (Institut Mutualiste Montsouris de Paris), C.Blanc, E.Bourzam, B.Hansel, C.Lupin, M.Wirden (Hôpital de la Pitié Salpetrière de Paris), E.Bourzam, L.Collias, J.Effa, C.Jung, J.Pavie, H.Pere, A.Si Mohamed (Hôpital Européen Georges Pompidou de Paris), C.Delaugerre, L.Gerard, B.Loze, S.Maylin, R.Nabias, D.Ponscarme, (Hôpital Saint Louis de Paris), J.Deleuze, F.Rozenberg (Hôpital Saint Vincent de Paul de Paris), B.Bachour, F.Bani-Sadr, J.Chas, M.Hamidi, L.Kherallah, S.Le Nagat, C.Le Pendeven, F.Moreau, JC.Nicolas, V.Schneider (Hôpital Tenon de Paris), MD.Tabone, G.Vaudre (Hôpital Trousseau de Paris), G.Giraudeau, G.Le Moal, D.Plainchamp (CHU de Poitiers), G.Blondin, I.Dorval, JC.Duthe, P.Perfezou, (CH de Cornouaille de Quimper), JL.Berger, V.Brodard, I.Kmiec, C.Rouger, C.Strady, (CHU de Reims), JM.Chappelin, A.Maillard, M.Ratajczak (CHU de Rennes), Y.Debab, F.De Oliveira, A.Depatureaux, I.Gueit, V.Lemee, D.Theron, (CHU de Rouen), I.Pasdeloup, P.Camps (CH Saintonge de Saintes), C.Bigaillon, C.Ficko, C.Imbert, C.Rapp (Hôpital d'Instruction des Armées Bégin de Saint Mandé), C.Grand, C.Michau, (CH de Saint Nazaire), D.Bornarel, P.Devillier, E.Farfour, C.Majerholc, D.Vignon, D.Zucman (Hôpital Foch de Suresnes), M.El Addouli, MF.Danjoux, J.Journe, Y.Leveneur, (CH de Bigorre de Tarbes), B.Marchou, F.Nicot, F.Prevoteau Du Clary, (CHU de Toulouse), S.Bonne (CH de Tourcoing)

References

1. De Leys R, Vanderborght B, Vanden Haesevelde M, et al. Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. J Virol 1990; 64(3): 1207-16.

2. Ayouba A, Mauclere P, Martin PM, et al. HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998. Emerg Infect Dis 2001; 7(3): 466-7.

3. Vessiere A, Rousset D, Kfutwah A, et al. Diagnosis and monitoring of HIV-1 group O-infected patients in Cameroun. J Acquir Immune Defic Syndr 2010; 53(1): 107-10.

4. Villabona-Arenas CJ, Domyeum J, Mouacha F, et al. HIV-1 group O infection in Cameroon from 2006 to 2013: Prevalence, genetic diversity, evolution and public health challenges. Infect Genet Evol 2015; 36: 210-6.

5. Mourez T, Simon F, Plantier JC. Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. Clin Microbiol Rev 2013; 26(3): 448-61.

6. Agut H, Candotti D, Rabanel B, et al. Isolation of atypical HIV-1-related retrovirus from AIDS patient. Lancet 1992; 340(8820): 681-2.

7. Loussert-Ajaka I, Ly TD, Chaix ML, et al. HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients. Lancet 1994; 343(8910): 1393-4.

8. Henquell C, Jacomet C, Antoniotti O, et al. Difficulties in diagnosing group o human immunodeficiency virus type 1 acute primary infection. Journal of clinical microbiology 2008; 46(7): 2453-6.

9. Barin F, Cazein F, Lot F, et al. Prevalence of HIV-2 and HIV-1 group O infections among new HIV diagnoses in France: 2003-2006. AIDS 2007; 21(17): 2351-3.

10. Leoz M, Feyertag F, Kfutwah A, et al. The Two-Phase Emergence of Non Pandemic HIV-1 Group O in Cameroon. PLoS Pathog 2015; 11(8): e1005029.

11. Simon F, Ly TD, Baillou-Beaufils A, et al. Sensitivity of screening kits for anti-HIV-1 subtype O antibodies. AIDS 1994; 8(11): 1628-9.

12. Plantier JC, Djemai M, Lemee V, et al. Census and analysis of persistent false-negative results in serological diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 group O infections. Journal of clinical microbiology 2009; 47(9): 2906-11.

13. Gueudin M, Leoz M, Lemee V, et al. A new real-time quantitative PCR for diagnosis and monitoring of HIV-1 group O infection. Journal of clinical microbiology 2012; 50(3): 831-6.

14. Swanson P, de Mendoza C, Joshi Y, et al. Impact of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genetic diversity on performance of four commercial viral load assays: LCx HIV RNA Quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5, VERSANT HIV-1 RNA 3.0, and NucliSens HIV-1 QT. J Clin Microbiol 2005; 43(8): 3860-8.

15. Plantier JC, Gueudin M, Damond F, Braun J, Mauclere P, Simon F. Plasma RNA quantification and HIV-1 divergent strains. J Acquir Immune Defic Syndr 2003; 33(1): 1-7.

16. Gurtler LG, Hauser PH, Eberle J, et al. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. J Virol 1994; 68(3): 1581-5.

17. Roques P, Robertson DL, Souquiere S, et al. Phylogenetic analysis of 49 newly derived HIV-1 group O strains: high viral diversity but no group M-like subtype structure. Virology 2002; 302(2): 259-73.

18. Quinones-Mateu ME, Albright JL, Mas A, Soriano V, Arts EJ. Analysis of pol gene heterogeneity, viral quasispecies, and drug resistance in individuals infected with group O strains of human immunodeficiency virus type 1. Journal of virology 1998; 72(11): 9002-15.

19. Nkengasong JN, Fransen K, Willems B, et al. Virologic, immunologic, and clinical follow-up of a couple infected by the human immunodeficiency virus type one, group O. J Med Virol 1997; 51(3): 202-9.

20. Janssens W, Nkengasong J, Heyndrickx L, et al. Intrapatient variability of HIV type 1 group O ANT70 during a 10-year follow-up. AIDS research and human retroviruses 1999; 15(15): 1325-32.

21. Buckheit RW, 3rd, Sexauer SB, Sedaghat AR, et al. Long-term control of viral replication in a Group O, human immunodeficiency virus type 1-infected individual. AIDS research and human retroviruses 2014; 30(6): 511-3.

22. Tuaillon E, Gueudin M, Lemee V, et al. Phenotypic susceptibility to nonnucleoside inhibitors of virion-associated reverse transcriptase from different HIV types and groups. J Acquir Immune Defic Syndr 2004; 37(5): 1543-9.
23. Descamps D, Collin G, Letourneur F, et al. Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 group O isolates to antiretroviral agents: in vitro phenotypic and genotypic analyses. Journal of virology 1997; 71(11): 8893-8.
24. Depatureaux A, Charpentier C, Leoz M, et al. Impact of HIV-1 group O genetic diversity on genotypic resistance interpretation by algorithms designed for HIV-1 group M. J Acquir Immune Defic Syndr 2011; 56(2): 139-45.
25. Depatureaux A, Leoz M, Le Moal G, et al. Raltegravir-based regimens are effective in HIV-1 group O-infected patients. J Acquir Immune Defic Syndr 2012; 61(1): e1-3.
26. Rodes B, de Mendoza C, Rodgers M, et al. Treatment response and drug resistance in patients infected with HIV type 1 group O viruses. AIDS Res Hum Retroviruses 2005; 21(7): 602-7.
27. Aghokeng AF, Kouanfack C, Peeters M, Mpoudi-Ngole E, Delaporte E. Successful integrase inhibitor-based highly active antiretroviral therapy for a multidrug-class-resistant HIV type 1 group O-infected patient in Cameroon. AIDS Res Hum Retroviruses 2013; 29(1): 1-3.
28. Briz V, Garrido C, Poveda E, et al. Raltegravir and etravirine are active against HIV type 1 group O. AIDS Res Hum Retroviruses 2009; 25(2): 225-7.
29. Poveda E, Barreiro P, Rodes B, Soriano V. Enfuvirtide is active against HIV type 1 group O. AIDS research and human retroviruses 2005; 21(6): 583-5.
30. de Baar MP, Janssens W, de Ronde A, et al. Natural residues versus antiretroviral drug-selected mutations in HIV type 1 group O reverse transcriptase and protease related to virological drug failure in vivo. AIDS research and human retroviruses 2000; 16(14): 1385-94.
31. Carre N, Deveau C, Belanger F, et al. Effect of age and exposure group on the onset of AIDS in heterosexual and homosexual HIV-infected patients. SEROCO Study Group. AIDS 1994; 8(6): 797-802.
32. Time from HIV-1 seroconversion to AIDS and death before widespread use of highly-active antiretroviral therapy: a collaborative re-analysis. Collaborative Group on AIDS Incubation and HIV Survival including the CASCADE EU Concerted Action. Concerted Action on SeroConversion to AIDS and Death in Europe. Lancet 2000; 355(9210): 1131-7.
33. Lewden C, Thiebaut R, Boufassa F, et al. Comparison of early CD4 T-cell count in HIV-1 seroconverters in Cote d'Ivoire and France: the ANRS PRIMO-CI and SEROCO cohorts. Journal of acquired immune deficiency syndromes 2010; 53(2): 260-5.
34. Drylewicz J, Matheron S, Lazaro E, et al. Comparison of viro-immunological marker changes between HIV-1 and HIV-2-infected patients in France. AIDS 2008; 22(4): 457-68.
35. Arien KK, Abraha A, Quinones-Mateu ME, Kestens L, Vanham G, Arts EJ. The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates. Journal of virology 2005; 79(14): 8979-90.
36. Dray-Spira R WdAK, Aubrière C, Marcellin F,, Spire B LFelgV. État de santé de la population vivant avec le VIH en France métropolitaine en 2011 et caractéristiques des personnes récemment diagnostiquées. Premiers résultats de l'enquête ANRS-Vespa2. Bull Epidémiol Hebd 2013; 26-27: 285-92.
37. Mary-Krause M, Grabar S, Lievre L, et al. Cohort Profile: French hospital database on HIV (FHDH-ANRS CO4). International journal of epidemiology 2014; 43(5): 1425-36.
38. Drylewicz J, Eholie S, Maiga M, et al. First-year lymphocyte T CD4+ response to antiretroviral therapy according to the HIV type in the IeDEA West Africa collaboration. AIDS 2010; 24(7): 1043-50.
39. Jarrin I, Pantazis N, Gill MJ, et al. Uptake of combination antiretroviral therapy and HIV disease progression according to geographical origin in seroconverters in Europe, Canada, and Australia. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 2012; 54(1): 111-8.

Figure Legendary:

Figure 1: Flow chart of the selection of HIV-1/O patients to study the response to cART in the longitudinal approach from cART initiation (left) and the cross-sectional approach from 2007 (right). cART was defined as a treatment regimen with at least three ARV drugs. Non-naive patients at cART initiation were those who previously received mono or dual ART.

Figure 2: Predicted evolution of √CD4 counts from the piecewise linear mixed-effects model (solid line) and √CD4 observed during cART (solid circles). N=74 patients, with at least one CD4 cell count at initiation or during cART. CD4 counts were modeled on a square root scale, with two slopes, 0- 4 months and after 4 months of cART.

Figure 3: Predicted evolution of CD4 counts over the first two years of cART according to the cART regimen, from a piecewise linear mixed-effects model. N=37 patients in the PI/r (solid line and crosses) group and N=14 in the NNRTI group (broken line and triangles). CD4 counts were modeled on a square root scale, with two slopes, one before 4 months and one after 4 months of cART.

Figure 4: Kaplan-Meier function time to achieve a first viral load value below 200 cp/mL (N=49) from cART initiation in HIV-1/O patients. The number of patients still at risk at various time-points following cART initiation is depicted under the graph.

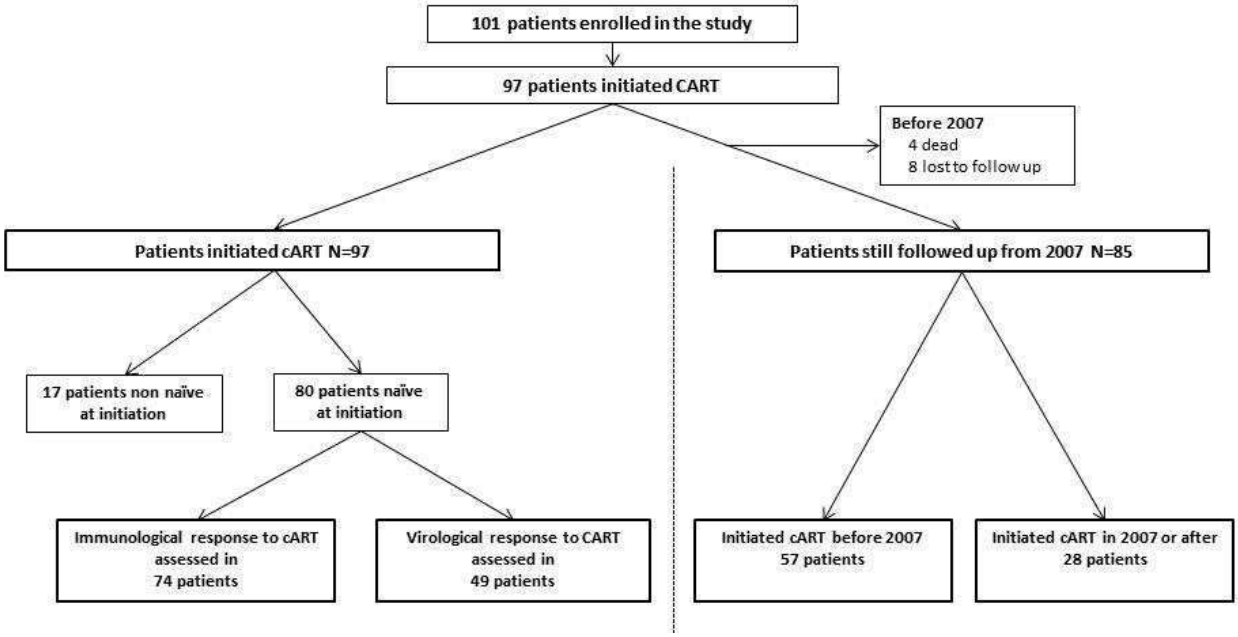


Figure 1: Flow chart of the selection of HIV-1/O patients to study the response to cART in the longitudinal approach from cART initiation (left) and the cross-sectional approach from 2007 (right)

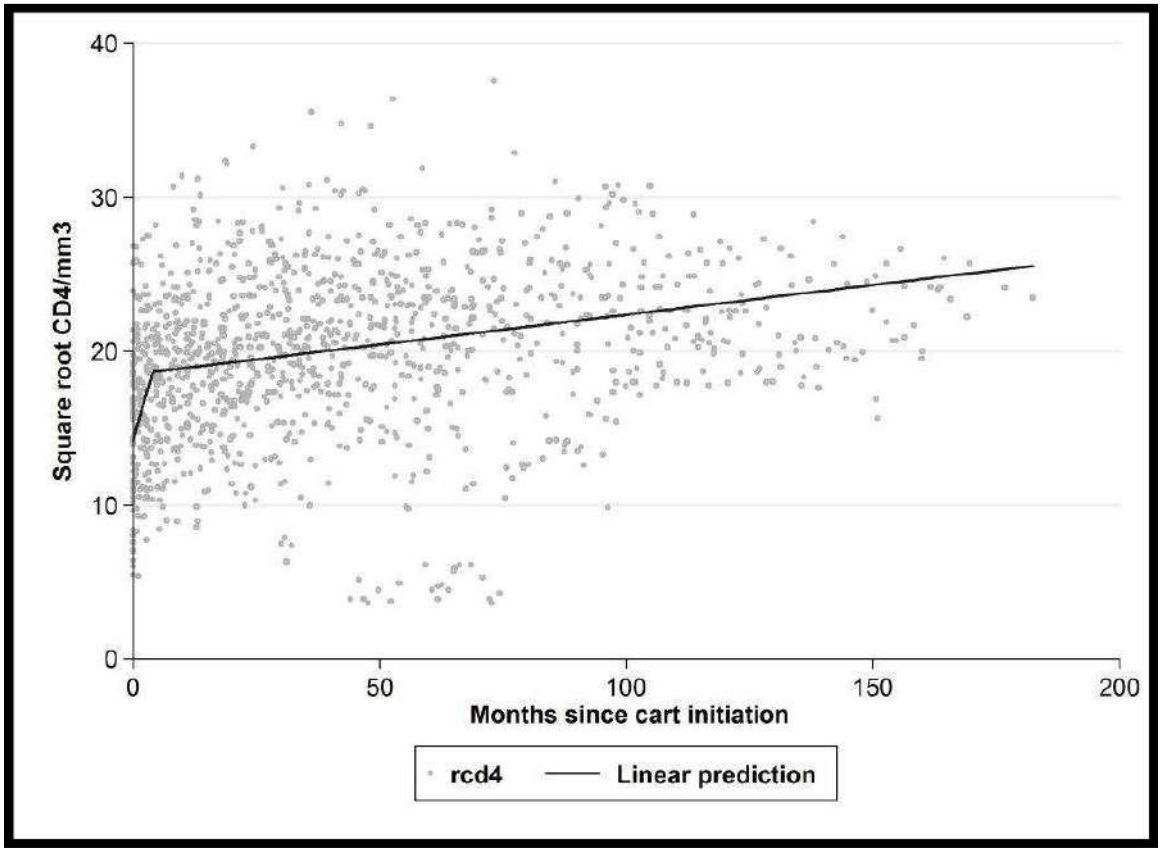


Figure 2: Predicted evolution of √CD4 counts from the piecewise linear mixed-effects model (solid line) and √CD4 observed during cART (solid circles).

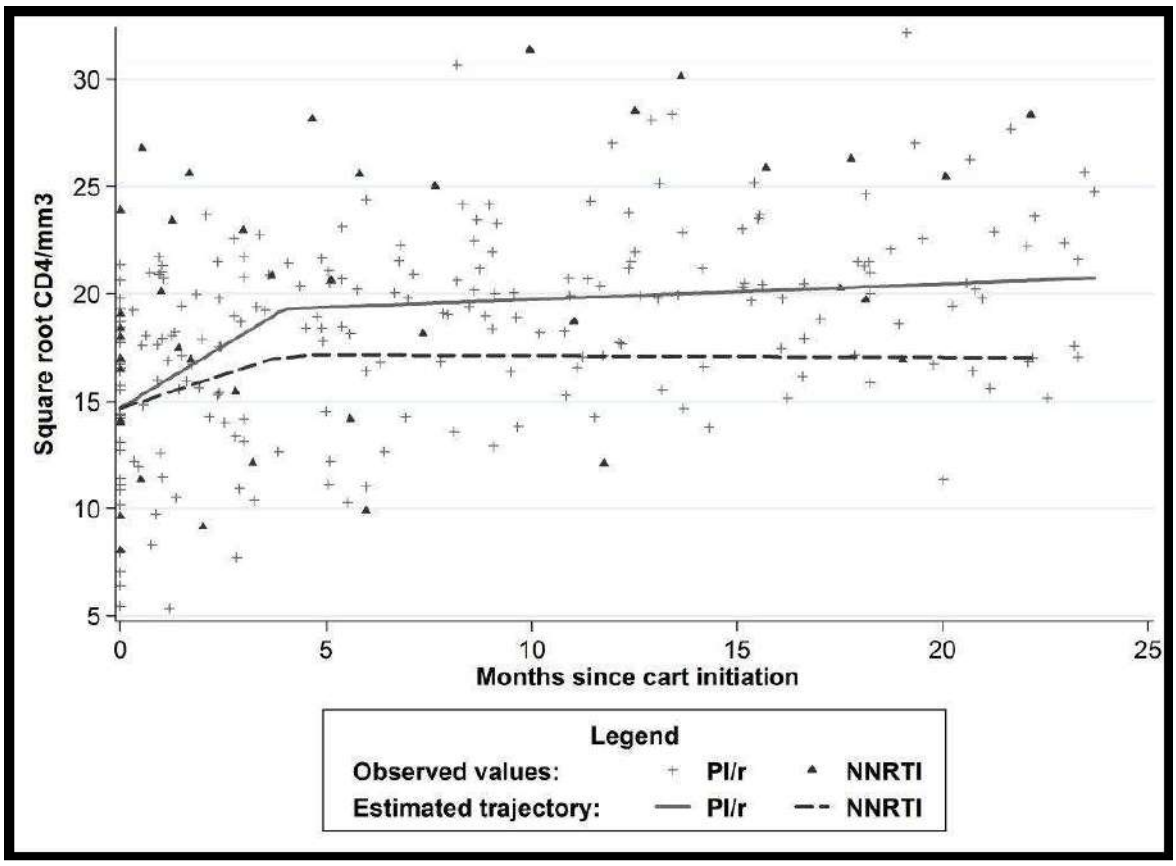


Figure 3: Predicted evolution of CD4 counts over the first two years of cART according to the cART regimen, from a piecewise linear mixed-effects model

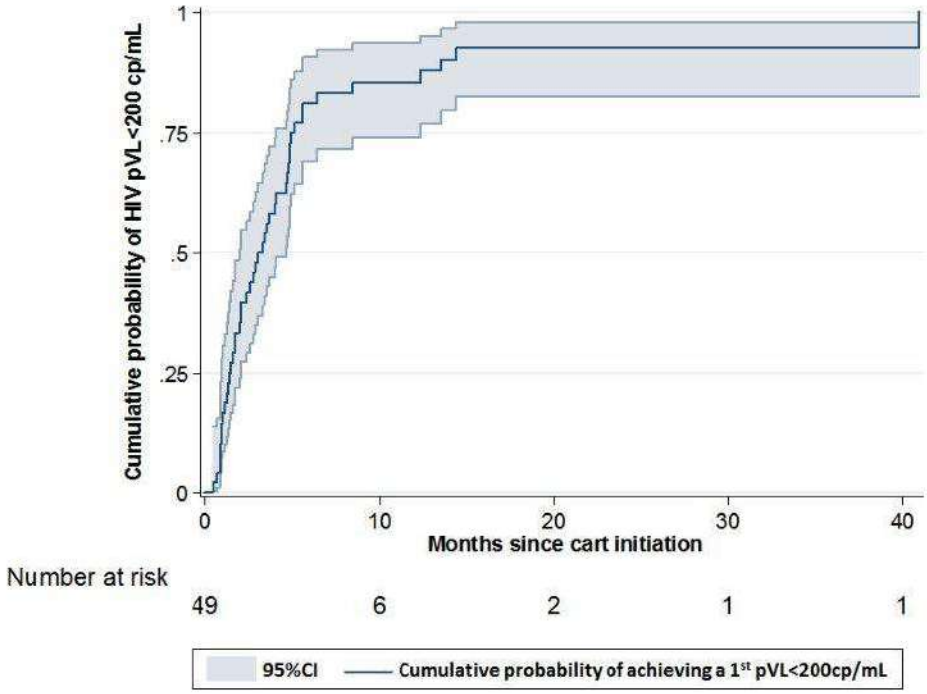


Figure 4: Kaplan-Meier function time to achieve a first viral load value below 200 cp/mL (N=49) from cART initiation in HIV-1/O patients

Table 1: Characteristics of the HIV-1/O population

		Patients enrolled in the study N=101	ARV naive patients at cART initiation N=80
Age at HIV diagnosis, *years*	Median (IQR)	36.5 (27.4; 43.0)	38.7 (31.8; 48.3)
Sex, *% (n)*	Women	65.4% (66)	66.3% (53)
Transmission group, %	Sexual (Heterosexual)	82.2% (83)	85.0% (68)
	Blood	11.9% (12)	10.0% (8)
	Mother to child	3.0% (3)	1.3% (1)
	Unknown	3.0% (3)	3.8% (3)
Place of birth, %(n)	**N**	**99**	**78**
	Cameroon	71.7% (71)	69.2% (54)
	France	19.2% (19)	21.8% (17)
	Congo (RDC)	2.0% (2)	2.6% (2)
	Senegal	2.0% (2)	2.6% (2)
	Gabon	1.0% (1)	1.3% (1)
	Guinea	1.0% (1)	1.3% (1)
	Liberia	1.0% (1)	1.3% (1)
Median year of HIV diagnosis	Median (IQR)	2001 (1997; 2004)	2002 (1999 – 2006)
Time between HIV diagnosis and HIV-1/O diagnosis, *months*	**N**	**76**	**59**
	Median (IQR)	21.3 (2.2; 77.8)	21 (2; 65)
Time between arrival in France and HIV-1/O diagnosis, *months*	**N/N born abroad**	**63/80**	**43/61**
	Median (IQR)	46.8 (5.0; 130.6)	33.8 (4.5; 92.0)
CD4 cell counts at HIV diagnosis*, */mm3*	**N**	**65**	**56**
	Median (IQR)	250 (150; 404)	247.5 (143.5; 407)
Plasma viral load at HIV diagnosis *, *log cp/mL*	**N**	**39**	**37**
	Median (IQR)	4.0 (3.6; 4.7)	4.0 (3.7; 4.7)
CDC stage at diagnosis, *%(n)*	C**	10.9% (11)	12.5% (10)

* within one year following HIV diagnosis ** Clinical events: esophageal candida infection (N=2), mycobacterium avium complex infection (N=1), CMV infection (N=1), pneumocystis carinii (N=1), CMV retinitis infection (N=2), pulmonary bacilliform tuberculosis (N=1), cerebral toxoplasmosis (N=1), salmonella septicemia (N=1), cachexia syndrome due to HIV (N=1).

Table 2: Immunological and virological characteristics at cART initiation (N= 80).

Time between HIV diagnosis and treatment initiation, *years*	Median (IQR)	0.51 (0.14; 5.0)
Year of cART initiation, *%(n)*	[1996-1999]	12.5% (10)
	[2000-2006]	52.5% (42)
	[2007-2014]	35.0% (28)
CD4 at initiation, */mm^3*	**N**	**52**
	Median (IQR)	201 (114 ; 302)
pVL at initiation, *log cp/mL*	**N**	**26**
	Median (IQR)	4.1 (3.6; 4.6)
cART regimen at initiation, %(n)	2NRTI+1PI/r	51.3% (41)
	2NRTI+1NNRTI	18.8% (15)
	2NRTI+1PI	16.3% (13)
	3NRTI	12.5% (10)
	3NRTI+1PI/r+1PI	1.3% (1)
Duration of cART, *years*	**N**	**79**
	Median (IQR)	4.1 (1.5 ; 7.9)

Table 3: Predicted slopes of the immunological response to cART from a linear mixed-effects model in HIV-1/O naive patients, according to the first-line regimen, NNRTI-based vs PI/r-based.

	NNRTI-based regimen (N=14)	**1PI/r-based regimen (N=37)**	**p ****
Intercept, *vCD4 (95% CI)*	14.6 (12.0; 17.1)	14.6 (13.2; 16.2)	0.96
Slope 1 (0 – 4 months), *vCD4/month (95%CI)*	0.69 (0.17 ; 1.20) p*=0.009	1.19 (0.95; 1.42) p*<0.001	0.09
Slope 2 (>4 months), *vCD4/month (95%CI)*	-0.02 (-0.10; 0.05) p*=0.56	0.07 (0.04; 0.10) p*<0.001	0.03

* p value of the slope compared to zero ; **p value of the comparison of the 2 groups ; CI: Confidence Interval

Table 4: characteristics of the 85 HIV-1/O patients followed between 2007 and 2014.

		Treatment initiation before 2007 N=57	Treatment initiation in 2007 and after N=28
Sex , *%(n)*	Women	71.9% (41)	60.7% (17)
Current age, *years*	Median (IQR)	47.9 (43.7; 54.8)	49.2 (39.3; 57.9)
Treatment at the most recent visit , *% (n)*	2NRTI+1PI/r	40.3% (23)	78.6% (22)
	2NRTI+1INSTI	14.3% (8)	6.9% (2)
	2NRTI +1PI/r+1INSTI	16.0% (9)	0 (0)
	3NRTI	7.1% (4)	0 (0)
	2NRTI + 1NNRTI	7.1% (4)	0 (0)
	2NRTI + 1NNRTI + 1PI/r+ INSTI	3.6% (2)	0 (0)
	1NRTI+1NNRTI+1PI/r	1.8% (1)	0 (0)
	1NRTI +1PI/r	1.8% (1)	3.4% (1)
	1NRTI + 1PI/r+1INSTI	1.8% (1)	0 (0)
	2NRTI + 1NNRTI + 1PI/r	1.8% (1)	0 (0)
	2NRTI + 1PI	1.8% (1)	3.4% (1)
	3NRTI +1PI/r	1.8% (1)	0 (0)
	3NRTI + 1NNRTI + 1PI/r+1INSTI	1.8% (1)	0 (0)
	1PI/r+1INSTI	0 (0)	3.4% (1)
	2NRTI + 1PI+1INSTI	0 (0)	3.4% (1)
	Immunological characteristics		
CD4 cell counts at cART initiation, */mm3* N=58	**N**	**38**	**20**
	Median (IQR)	213 (119; 372)	256 (186; 340)
Most recent CD4 cell count, */mm^3* N=85	**N**	**57**	**28**
	Median (IQR)	498 (381; 612)	506 (354; 620)
Time between cART initiation and the most recent CD4 cell count*, years* N=85	Median (IQR)	11.8 (9.2; 15.2)	3.3 (0.98; 5.6)
	Virological characteristics (pVL threshold=40 cp/mL)		
pVL at cART initiation, *log$_{10}$ cp/mL* N=27	**N**	**12**	**15**
	Median (IQR)	4.3 (3.7; 4.7)	4.1 (3.5; 4.8)
Most recent pVL value for patients with cART initiation > 6 months, *% (n)* N=77	**N**	**54**	**23**
	≤40 cp/mL	85.2% (46)	91.3% (21)
Time between cART initiation and the most recent VL measurement, *years* N=77	**N**	**54**	**23**
	Median [IQR]	12.2 (10.2; 15.4)	4.0 (2.6; 5.8)

Supplementary methods

HIV-1/O diagnosis and monitoring

HIV-1/O screening was performed using an *env* serotyping assay, consisting of a home-made indirect Elisa using synthetic peptides that map the immuno-dominant region of gp41 and the V3 loop of gp120, representative of the different HIV types and groups. It allows differentiation between HIV-1 and HIV-2 and between the four HIV-1 groups (M to P). It was performed on plasma or serum, as previously described [39]. Molecular confirmation and characterization was based on amplification and sequencing of the *gag, pol*, and *env* genes, as previously described [3, 17]. Sequences were then subjected to phylogenetic analyses. A neighbor-joining tree inferred from 98 HIV-1/O *pol* sequences, encompassing the full protease and partial reverse transcriptase coding regions (987 nucleotides), was performed as previously described [40]. The reliability of the tree topologies was estimated by bootstrap analysis with 1000 pseudo-replicate data sets.

Monitoring was performed using viral load techniques with quantification thresholds of 178 cp/mL (2.3 log) and 50 cp/mL (1.7 log), depending on the sample volume for LCx [41], 40 cp/mL (1.6 log) for RealTime [42], 20 cp/mL (1.2 log) for Cobas Taqman [42], and 200 cp/mL (2.3 log) and 40 cp/mL (1.6 log) for the LTR and integrase NRC techniques respectively [13, 43]. Because of the high genetic diversity of HIV-1/O can lead to mis-quantification, each patient monitoring was validated by comparing the values obtained with commercial kits with those obtained with the NRC method; the follow-up was then performed using the method giving the highest value.

Supplementary results

HIV-1/O phylogenetic characteristics

Most patients originated from Cameroon (71.7%) or other African countries (6.9%). Phylogenetic analysis showed that most patients were infected by strains belonging to subgroup H (N = 76, 75.6%) (Fig S1). This result is consistent with the molecular epidemiology results obtained in Cameroon, the country to which most patients were connected. Epidemiological data and analyses of the strains characterized in French patients revealed that 47% (9/19) had strong links with Cameroon, either because they had a Cameroonian partner or because they traveled to the country. The analysis also revealed phylogenetic relationships between strains, with 11 clusters identified, corresponding to 26 patients (mostly with two patients per cluster); the association of these results with the residence data (town where the patients lived or were diagnosed), favor an epidemiological connection.

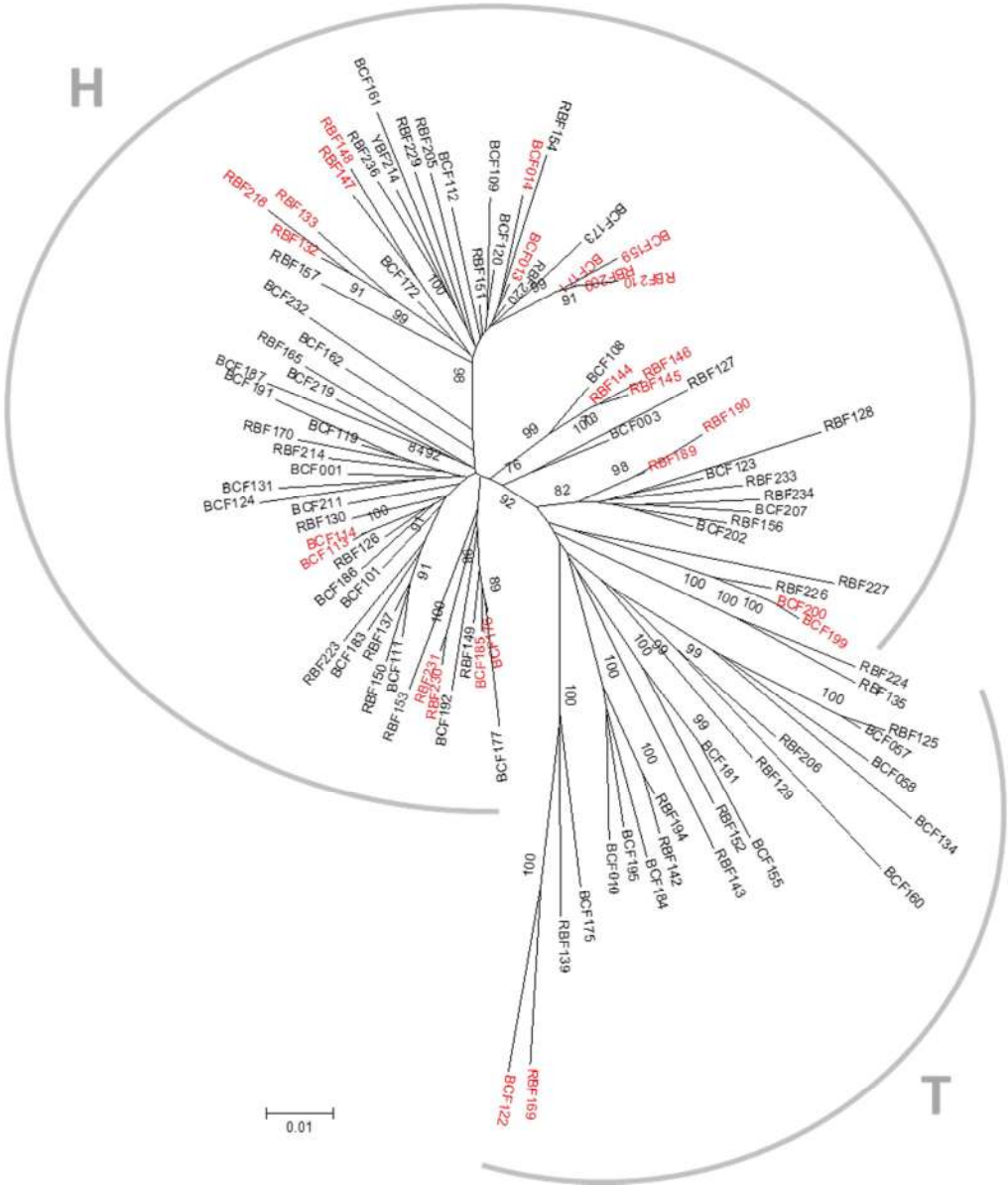


Figure S1. Neighbor-Joining Tree inferred from 98 HIV-1/O *pol* sequences, encompassing the full protease and partial reverse transcriptase coding regions (987 nucleotides). Bootstrap values are shown when > 70. Phylogenetically linked strains sampled from patients of the same geographic regions are shown in red. The H and T subgroups are indicated.

HIV-1/O diagnosis according to calendar period

The median years of HIV diagnosis and HIV-1/O specific diagnosis were 2001 and 2004, respectively (Table 1). The oldest diagnosis was January 1989 for HIV and January 1997 for HIV-1/O. The time between HIV and HIV-1/O diagnosis was available for 76 patients; the median time of diagnosis of HIV-1/O was 21.3 months after HIV diagnosis. This delay was high for the 31 patients (40.8 %) diagnosed as HIV positive before 2000, with a median of (IQR) 65.5 months (20.7; 122.9), whereas it was 7.3 months (1.2; 23.3) for the 33 patients (43.4 %) diagnosed between 2000 and 2006, and only 2.75 months (0.7; 26.9) for the 12 patients (15.8%) diagnosed in 2007 or thereafter.

Initiation with an NNRTI-based regimen and time of HIV-1/O diagnosis

The eight patients who initiated an NNRTI-based regimen between 2000 and 2006 were diagnosed with HIV-1/O at a median of 3.7 (range: -2.8; +11.4) years following cART initiation, whereas the 22 patients who initiated a non-NNRTI-based regimen during the same period were diagnosed with HIV-1/O at a median of - 0.11 (range: -5.1; +1.6) years before cART initiation. Similarly, since/after 2007, the time between HIV-1/O diagnosis and cART initiation was 0 (range: - 15.8; +31.0) months for the five patients who initiated an NNRTI-based regimen *vs.* - 15.2 (range: -85.7; 22.7) months for the 16 patients who initiated PI/r-based cART.

Virological response according to calendar period

The virological response was analyzed for the two most recent periods. For 49 patients, a pVL was available within the first year of cART, aside from that at initiation. Among them, 51% (25/49) initiated cART between 2000 and 2006, 44% with 2NRTI+1PI/r, 28% with 3NRTI, 16% with 2NRTI+1NNRTI, and 12% with 2NRTI+1PI. Of the 24 patients who initiated cART in 2007 or thereafter, 83% started with 2NRTI+1PI/r and 17 % with 2NRTI+1NNRTI.

The median time to reach a pVL < 200 cp/mL after cART initiation was 3.67 (2.63; 4.8) months for patients who initiated cART between 2000 and 2006, and 2.0 (1.1; 4.1) months for those who initiated cART after 2006. The cumulative probability (95%CI) of having a pVL < 200 cp/mL for the period 2000-2006, were 0.71 (0.52; 0.87) and 0.75 (0.57; 0.89) after 6 and 12 months of cART, respectively, whereas they were respectively 0.92 (0.77; 0.98) and 0.96 (0.82; 0.99) after 2006.

For patients monitored at the threshold of 40 cp/mL, the median time to undetectability was 4.7 (3.7; 5.1) for the period from 2000 to 2006 (N = 6 patients) and 3.1 months (1.3; 5.5) in 2007 or thereafter (N=22). In 2007 or thereafter, the cumulative probability (95%CI) of having a pVL < 40 cp/mL after 6 and 12 months of cART were 0.78 (0.58; 0. 93) and 0.94 (0.78; 0.99), respectivel

Annexe 7: Article en révision

“HIV-1 group P: towards a dead-end infection ?”

HIV-1 group P infection: towards a dead-end infection?

Elodie ALESSANDRI-GRADT[1], Fabienne DE OLIVEIRA[1], Marie LEOZ[1], Véronique LEMEE[1], David L ROBERTSON[2,3], Felix FEYERTAG[2,4], Paul-Alain NGOUPO[5], François CORDONNIER[6], Philippe MAUCLERE[5,7], François SIMON[8], Jean-Christophe PLANTIER[1]

[1]Normandie Univ, UNIROUEN, EA2656, GRAM, CHU de Rouen, Laboratoire de Virologie associé au CNR du VIH, F-76000 Rouen, France

[2]Evolution & Genomic Sciences, School of Biological Sciences, University of Manchester, Oxford Road, Manchester, United Kingdom

[3]MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research, Garscube Campus, Glasgow, United Kingdom

[4]Department of Biology, University of Nevada, Reno, Nevada, United States of America

[5]Laboratoire de Virologie, Centre Pasteur du Cameroun, Yaoundé, Cameroun

[6]Service de maladies infectieuses, Hôpital Louis Mourier, F-92700 Colombes, France

[7]Ravinala Conseil, F-75012 Paris, France

[8]Departement de microbiologie, Hôpital Saint Louis, Faculté de médecine Paris Diderot, F-75000 Paris, France

Corresponding author: JC Plantier

jc.plantier@chu-rouen.fr

Institut de Biologie Clinique, hôpital C. Nicolle, CHU Rouen
1 rue de Germont, 76031 Rouen cedex, France
Tél +33 2 32 88 14 62
Fax +33 2 32 88 04 30

Running head: new insights on HIV-1/P

Total number of words: 3322

ABSTRACT (251 words)

Objectives: HIV/1 group P (HIV-1/P) is the last HIV/1 group discovered and to date, comprises only two strains. To obtain new insights into this divergent group, we screened for new infections by developing specific tools, and analysed phenotypic and genotypic properties of the prototypic strain RBF168. In addition, the follow-up of the unique patient monitored so far, has raised the knowledge of the natural history of this infection and its therapeutic management.

Design/Methods: We developed an HIV-1/P specific sero-molecular strategy and screened over 29,498 specimen samples. Infectivity and evolution of the gag-30 position, considered as marker of adaptation to human, were explored by successive passages of RBF168 strain onto human PBMCs. Natural history and immuno-virological responses to combined antiretroviral therapy (cART) were analysed based on CD4 counts and plasmatic viral load evolution.

Results: No new infection was detected. Infectivity of RBF168 was found lower, relative to other main HIV groups and the conservative methionine found in the gag-30 position revealed a lack of adaptation to human. The follow-up of the patient during the five-year ART-free period, showed a relative stability of CD4 cell count with a mean of 326 mm^{-3}. Initiation of cART led to rapid RNA undetectability with a significant increase of CD4, reaching 687 mm^{-3} after 8 years.

Conclusions: Our results showed that HIV-1/P strains remain extremely rare and could be less adapted and pathogenic than other HIV strains. These data lead to the hypothesis that HIV-1/P infection could evolve towards, or even already correspond to, a dead-end infection.

Key words: HIV genetic diversity ; group P ; adaptation ; immuno-virological response to cART

INTRODUCTION (3322 words)

Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) is characterized by a high genetic diversity, which is classified into 4 groups: group M is responsible for the current pandemic; group O is endemic in Cameroon essentially; group N represents less than 20 infections; and for group P, the last group identified, only two infections have been characterized to date [1, 2]. Each group results from a separate cross species transmission event of simian immunodeficiency virus (SIV) to humans. Simian reservoirs of HIV-1 group M (HIV-1/M) and HIV-1 group N (HIV-1/N) are chimpanzees (SIVcpz) [3, 4], whereas HIV-1 group O (HIV-1/O) and HIV-1 group P (HIV-1/P) precursors have been found in gorillas (SIVgor) [5, 6].

The prototypic strain of group P, RBF168, was reported in 2009, in a 62 year old Cameroonian woman living in France [6]. The second strain, U14788, was identified in a retrospective serological screening on seropositive specimens collected in the major cities of Cameroon (Yaoundé and Douala) [7]; the low frequency of group P infection, around 0.06% in that study, suggests a rare circulation of this variant in Cameroon [7].

This scarcity, relative to pandemic group M or endemic group O may be linked to a relatively recent emergence in humans. Previous phylogenetic analyses estimate the time of the most recent common ancestor (tMRCA) of HIV-1/P between the 1950s and 1990s [8], which is more recent than the main HIV-1 groups O and M [9, 10]; but availability of only two HIV-1/P sequences does not allow reliable dating. Another hypothesis is that HIV-1/P has distinct virological properties from the other groups, especially HIV-1/M, leading to a limited spread. It has been shown that methionine or leucine is found at the gag-30 position in SIVcpz/SIVgor whereas it has been replaced by lysine or arginine in the inferred HIV-1 ancestral sequences of group M, N and O strains. These residue replacements are considered as a host-specific adaptation marker [11, 12]. The RBF168 strain harbours methionine, supporting a shared property with simian strains, whereas the second strain, U14788, harbours Lysine [7]. Another difference is the ability of counteracting restriction factors like Tetherin. Vpu, Nef and Env proteins from group P failed to counteract human specific Tetherin, while Vpu from group M could, as well as Nef from group O to a lesser extent [8, 13, 14].

Concerning *in vivo* features, only limited data from patient RBF168 have been reported to date[6], and the second case of HIV-1/P was linked to an anonymous collection without published biological or clinical data [7]. Data on immunological and virological response to combined antiretroviral-treatment (cART) were not available either, while these variants are phylogenetically close to HIV-1/O, known to harbour natural polymorphism impacting therapeutic management [15].

In order to obtain new insights into HIV-1/P, we screened for new infections by developing tools for its specific identification, and analysed phenotypic and genotypic properties of the prototypic strain RBF168. In addition, the thirteen year-long follow-up of the unique HIV-1/P positive patient monitored so far, has allowed us to obtain unique data on the natural history, and on the immunological and virological responses to cART of patient RBF168.

METHODS

Screening for HIV-1 group P infections

- Specific tools for HIV-1/P detection

We adapted a serological immunoassay, initially designed to discriminate between HIV-1 groups M, N and O, HIV-2 and major SIV lineages, by including a group P specific antigen [16]. This assay is based on the reactivity of antibodies against synthetic oligopeptides representative of gp41 for cross-detection of HIV/SIV lineages, and of the V3 loop of gp120 for their specific identification. Due to the specificity of the V3 antigens compared to those of gp41, only a V3 peptide was considered [16]. To select this HIV-1/P specific antigen, four synthetic oligopeptides were tested: two peptides derived from SIVgor (CP2139 5'-NNTRGQIQIGPMTIYNSENIVGNTRKAF-3', CP684 5'- NNTRGQIQVGPLTIYNSENIIGNTRKAF-3') [12] owing their phylogenetic link to RBF168, and two peptides derived from the prototype strain of HIV-1/P (RBF168 5'-NNTRGQVQIGPMTWYNMKFYTGDIRKAY-3', RBF168-C 5'-NNTRGQVQIGPMTWYNMKFYTGDIRKAYC-3'). The clinical sensitivity of these peptides was tested with RBF168 plasma samples collected in February 2005, November 2006 and in February 2009. Their specificity was determined on 23 HIV-seronegative samples, and on 17 HIV-1/M, 11 HIV-1/O clinical samples; the peptide chosen was then validated on 32 additional HIV-1 clinical samples (19 HIV-1/M and 13 HIV-1/O). The operating conditions of the assay were as previously described [16]; interpretation was as follows: "negative" if optical density (OD; 492 nm) was <0.100; "equivocal" if $0.100 \leq OD < 0.500$ and "reactive" if $OD \geq 0.500$.

We then developed a specific nested RT-PCR for molecular confirmation of group P strains (supplementary methods). Primers were defined to amplify an *env* fragment of 1110 pb in the gp120 region. The analytical sensitivity of this RT-PCR was performed using 5 dilutions of supernatants of the RBF168 strain, quantified with the HIV-1 Real*Time* quantification assay (Abbott, Des Plaines, IL), and ranging from 3.5 Log cp/ml to 1.6 Log cp/ml. The specificity was evaluated on 34 clinical samples, representative of HIV-1 genetic diversity (HIV-1/M, n=20; HIV-1/O, n=12, HIV-1/MO recombinant form, n=1 and dual HIV-1/M+O infection, n=1).

- Samples

We screened for new HIV-1/P infections among 29,498 samples, including simian samples due to close link of HIV-1/P with SIVgor.

1,083 samples were from collections corresponding to:

- 609 serum or plasma samples received by our laboratory in the framework of our activities related to the French National Reference Center of HIV, for exploration of atypical reactivities at diagnosis time or during the patient's follow-up.
- 405 serum or plasma samples from collections of HIV infection from Central Africa (Cameroon and Central African Republic), constituted in the 90's.
- 69 simian samples from great apes (Gorilla n=3, Chimpanzees n=12), monkeys (Cercocebus n=2, Cercopithecus n=2, Chlorocebus n=5, Macaca n=12, Mandrillus n=4, Papio n=3) and 26 non-human primate samples without assigned identification.

All samples with reactivity (OD) $\geq$ 0.500 were first subjected to the group P specific RT-PCR. Samples not amplified with the specific RT-PCR were subjected to a nested-RT-PCR (Lentivirus PCR), adapted from [17] that amplified a 650 pb fragment of *pol* of HIVs and SIVs (supplementary methods).

Additional screening was performed on 28,415 prospective samples, diagnosed as HIV positive between March 2013 and June 2015 by the Centre Pasteur of Cameroun (CPC), as previously described [18].

Evolutionary analyses

In order to better estimate the tMRCA of HIV-1/P, we performed evolutionary analysis using the sequence alignments from Wertheim and Worobey [19], that included 138 group M, 5 group N, 19 group O and 25 SIVcpz. Other sequences were added: three SIVgor sequences (FJ424863, FJ424866, FJ424871), the two HIV-1/P sequences previously analysed [8] (GQ328744 from RBF168 plasma collected in November 2006 ; HQ179987 from U14788) and three additional RBF168 sequences obtained from plasma collected in February 2009, material issued from co-culture of contemporary PBMC (February 2009), as well as plasma collected in February 2005. We present analysis of *env* only, as this region is refractory for recombination at least between more divergent variants [20, 21] and so is more reliable for molecular clock analysis. An uncorrelated lognormal relaxed molecular clock method was run, using the BEAST software [22], with an HKY+Γ4 substitution model with SRD06, and a Bayesian skyline plot used as a coalescent tree prior. This was run for 50 million iterations, and the maximum clade credibility tree using mean branch lengths was determined, and then analysed using Tracer. Rate estimates were determined by summing the rates of all branches leading to the 3 RBF sequences, and determining a best linear fit.

Phenotypic and genotypic characterization of the prototypic strain RBF168

Six serial passages were performed on the RBF168 strain, first isolated from a plasma sample collected in February 2009, using PHA-stimulated human PBMCs as previously described [6]. Each culture was monitored based on supernatant reverse transcriptase (RT) activity (Lenti RT activity, Cavidi, Upsala, Sweden) during 28 days. When the RT peak activity was reached, supernatant volume equivalent to 500 pg/mL RT activity was inoculated on fresh human PBMC according to the same culture conditions, and so on for the 6 passages. At this time, the infectivity of the strains was determined by calculating the TCID50 (tissue culture infective dose 50%) in a seven day-long assay according to the method of Spearman-Karber [23]. Infectivity of 7 primary isolates representative of HIV genetic diversity (HIV-1/M, n=4; HIV-1/O, n=2; HIV-2, n=1) was also determined in the same conditions for comparison.

To determine the residue evolution at gag-30 position during the 6 successive passages, we amplified a 493 pb fragment of *gag* gene using an in-house RT-PCR (supplementary methods). Natural genetic polymorphism of the cART targets (protease (PR), reverse transcriptase (RT), integrase (IN), and gp41 was also determined on viral RNA from plasma collected before treatment initiation (February 2005, November 2006 and February 2009) (supplementary methods). The amino acid sequences of the four regions were compared to those of the second P strain U14788 (HQ179987) and were subjected to resistance interpretation using the last version (v.26) of the ANRS resistance algorithm (http://www.hivfrenchresistance.org/).

Follow-up of patient RBF168

Follow-up of patient RBF168 was available from March 2004 to March 2017; monitoring of CD4 cell count was performed by Beckman Coulter flow cytometer systems (Beckman, Brea, California) and of plasma viral load (pVL) by the Real*Time* HIV-1 Viral Load assay (Abbott, Des Plaines, IL), which is validated for quantifying this strain [6, 24].

RESULTS

Survey of HIV-1/P spread

All 4 candidate peptides were highly reactive (OD above 1.250) with the 3 plasma samples from RBF168 (Table2), and none of them were reactive with HIV-seronegative samples. HIV-1/non-P sample testing led to exclusion of peptides CP2139, RBF168 and RBF168-C owing to numerous cross-reactivities (specificity at 53, 61 and 57% respectively), particularly with HIV-1/O samples (Table 2). Considering all samples, CP684 showed the best profile with only four (14%) cross-reactive samples. This antigen was tested on 20 HIV-1/M and 12 HIV-1/O additional clinical

samples; only 1 HIV-1/O sample was cross-reactive (OD at 0.263), leading to 8.3 % global cross-reactivity.

Concerning the group P specific RT-PCR, the lowest dilution giving a positive signal (6 of 10 replicates) was 2 Log cp/mL; none of the 34 HIV-1 non-P samples were amplified, leading to 100% specificity.

Using the peptide CP684, 992 of the 1083 (91.6%) samples from the collections were found negative (mean and median OD at 0.031 and 0.029 respectively), including all the simian samples. Seventy-three (6.7%) gave equivocal results (0.1=<OD<0.5), with mean and median OD values at 0.176 and 0.146 respectively. Eighteen samples corresponding to 14 patients (1.6%) were reactive with OD >=0.5 (mean and median at 1.250 and 1.189 respectively), 6 samples being highly reactive from 1.518 to 2.438. Group P specific RT-PCR performed on samples of these 14 patients gave negative results; the non-specific Lentivirus RT-PCR identified HIV-1/M variants (CRF02_AG, n=4 and CRF11-like, n=1), HIV-1/O (n=6), and one dual HIV-1/M+O (data not shown); two samples were not amplified.

Finally, no group P strain was found among the 28,415 HIV positive samples diagnosed by the CPC, which were reactive to HIV-1/M (99%), HIV-1/O or HIV-1/M+O (0.9%), HIV-2 (0.08%) infections, and HIV-1/N (1 case).

Emergence of HIV-1/P

New sequences obtained from sequential samples of RBF168 were used to estimate HIV-1/P emergence with more accuracy. Molecular clock analysis of the *env* gene estimated that the tMRCA for group P was about 1960 with an error of 1939 – 1983 (Table 3). The estimated tMRCA for HIV-1 groups M, N, and O were consistent with previous results [19]: 1888 (1851 – 1933) for group M, 1962 (1945 – 1980) for group N, and 1897 (1859 – 1942) for group O.

Natural characteristics of the prototypic strain RBF168

The phenotypic analysis was based on the highest production of the primary isolate reached at day 17 (13,227 pg RT/ml). Infectivity testing of the six successive amplifications showed an extremely low median at 261 TCID50/mL [149; 447], relative to the strains belonging to the other type or groups, especially HIV-1/M with a mean TCID50/mL at 250,625 (n=7), while HIV-2 and HIV-1/O showed TCID50/mL at 1,171 (n=1) and 22,627 (n=2) respectively. Genotypic characterization of

the gag-30 position in each of the six successive amplifications revealed no evolution with conservation of a methionine.

Concerning the cART targets, natural polymorphism was similar between the 3 sequences obtained from plasma samples collected in 2005, 2006 and 2009. According to the ANRS resistance algorithm, the highest number of mutations was detected in the PR with 11 resistance associated mutations (table 4), conferring natural genotypic resistance to atazanavir, tipranavir and possible resistance to saquinavir. Two atypical mutations (K20C and L63K) at resistance position *i.e.* with unknown impact were also observed. The presence of T69S, A98G, K103R and the atypical mutation V179E in RT, had no impact on resistance to Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTI) and Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTI). The IN harbored no resistance mutation; but the L44M mutation found in the transmembrane gp41 gene led to genotypic resistance to enfuvirtide. The HIV-1/P strain U14788 genotypic profile of PR was slightly similar leading to the same interpretation as for RBF168 (Table 4). We found two supplementary atypical mutations in the RT, but without genotypic impact; we observed T97A mutation in the IN, leading to natural genotypic resistance to elvitegravir. Finally, L44M substitution in gp41 was also found in U14788.

Natural and under cART course of the infection

Patient RBF168 was diagnosed HIV-positive in March 2004 with 350 CD4 mm^{-3} and did not receive cART until December 2008, according to the French guidelines at that time. During this period, the mean pVL was at 4.7 Log cp/mL and the mean CD4 count at 326 mm^{-3}, ranging from 260 CD4 mm^{-3} (June 2004) to 430 CD4 mm^{-3} (December 2005) (Figure 1a).

In February 2009, cART was initiated with tenofovir+emtricitabine+lopinavir/ritonavir according to the resistance genotyping at baseline, but switched after 2 months to abacavir+lamivudine+lopinavir/ritonavir, due to tenofovir adverse effects. This allowed a quick decrease to achieve a pVL of 2.43 Log cp/mL at M2 and undetectability (<1.6 Log cp/mL) one month later (Figure 1b). This success was maintained with the same regimen until the last monitoring in March 2017 (Figure 1b). During cART, the mean and median of CD4 cell count were at 648 mm^{-3} and 683 mm^{-3} respectively, with a zenith value (858 mm^{-3}) reached in August 2015, and the last point of survey at 687 mm^{-3} in March 2017.

DISCUSSION

Prior to this study, only two HIV-1/P sequences and scarce data were available; thus, new data are needed to improve our knowledge of this group and to assess its potential for transmission and pathogenicity. In this work, we confirmed the rarity of this group, and we determined the main phenotypic and genotypic characteristics of the prototypic strain RBF168, and the course of this infection before and during cART.

As previously done for other HIV/SIV variants [16, 18, 25], we designed a sero-molecular strategy for group P detection, using specific peptide and RT-PCR. If specificity was easily evaluated, validation of clinical sensitivity was only possible on RBF168 samples, since the other P sample was not available [7]. Using the CP684 selected antigen, around 8% of samples from the evaluation panel as well as from the collections were reactive. All but two were characterised as groups M and O, indicating these samples were only cross-reactive. For the two non-amplified samples (even with the non-specific RT-PCR), the lack of data on plasma viral load values prevented us from hypothesizing that RNA degradation was due to the long-term conservation of the material or presence of a highly divergent strain. Our data, similar to those of previous works using a combination of peptides from SIVgor and HIV-1/P [2, 7], indicate that reactivity towards these specific peptides, even high, is not enough to conclude to group P infection. Finally, despite a wide panel of simian samples or samples with HIV atypical reactivities (profiles similar to that of RBF168 at diagnosis), we failed to detect a new HIV-1/P strain. The same is true in older central Africa collections and in the thousands of HIV positive samples, diagnosed currently in Cameroon. Altogether, these data and the recent study of Rodgers *et al.* [2] confirm that HIV-1 group P infection is extremely rare, suggesting that this variant expanded in a limited manner after initial emergence in the human population and that subsequently numbers have declined. This is in favour of an HIV-1 lineage that is becoming extinct in the human population.

Reasons for this limited spread are likely multifactorial. The molecular dating analysis of the envelope gene indicates the identified HIV-1/P infections share a common ancestor dating back to the 1960s. Thus, compared to the other HIV-1 groups, it would appear that HIV-1/P was introduced into the human population more recently than strains M and O, and possibly around the same time period as group HIV-1/N. Another factor could be specific viral properties, as weak counteracting of human cell restricting factors already demonstrated for tetherin [8]. Isolation of the prototype strain gave us the opportunity to analyse its infectivity. The comparison of TCID50 showed that the serial isolates of RBF168 were consistently and reproducibly less infective on human PMBC, compared to those of other HIV primary isolates, in particular relative to HIV-1/O, the closest

phylogenetic group. RBF168 infectivity was even lower than that of HIV-2, the lowest pathogenic HIV known so far. When searching for the adaptation marker in gag-30 position, performing successive passages of RBF168 on human PBMC, we failed to identify a switch from methionine to arginine (harbored by the second P strain, U14788), or lysine (found in other HIV-1 variants). However, this evolution probably requires further passages. Altogether, these data suggest that RBF168 could not be completely adapted to human hosts. This contrasts with the high replication level observed in the patient (mean pVL at 4.7 Log cp/mL), similar to the situation encountered in non-pathogenic SIV infections harbouring a high level of replication in their symptom-free hosts [26]. In this context, it is crucial to screen for other viral determinants of adaptation, unless there is an individual human immunologic or cellular propensity to tolerate this particular infection.

The follow-up of this single patient also provided the opportunity to obtain data on the natural evolution of this rare infection, and on its immunovirological response to cART. The follow-up of the patient, who remained symptom-free during the first five-year ART-free period, showed a relative stability of the CD4 cell count with a mean of 326 mm^{-3}. Antiretroviral therapy was initiated in 2009 owing to the evolution of the French ART guidelines rather to a continuous decline in CD4 count. The regimen was then chosen according to the natural polymorphism of cART targets, which had a singular genetic pattern relative to the closest phylogenetic HIV-1/O group. Indeed, despite some polymorphisms common in the Protease [15], we were able to observe important differences like the absence in the two HIV-1/P strains of the mutation Y181C found in 65% of HIV-1/O [10], a lower level of polymorphism in the Integrase [27], and the HIV-1/P-specific resistance signature L44M in gp41 (also found in SIVgor, data not shown), instead of the N42D-signature for HIV-1/O [28]. This specific polymorphism did not prevent the excellent immunovirological response during a long-term follow-up with a significant increase of CD4 of 600 between nadir and zenith.

In conclusion, this work has provided new insights into the last described divergent group. We have shown that HIV-1/P strains are extremely rare, which is consistent with a more recent emergence in humans, with lower infectivity, absence of human adaptation marker in gag-30 position, and weak counteracting of human cell restricting factors [8]. Associated with data on the natural course of the RBF168 infection, this suggests that HIV-1/P could be less adapted and less pathogenic than the other HIV-1 strains, accounting for its lack of success in the human population. These observations, together with the long-term virological response to cART and excellent immunological restoration, lead to the hypothesis that HIV-1/P infection could evolve towards or even already correspond to a dead-end infection, a hypothesis to be confirmed by further epidemiological and virological studies.

ACKNOWLEDGEMENTS: EAG and JCP conceived and managed the study. EAG, FDO, ML, VL, PAN performed the experiments. DLR and FF performed computational analyses. PM and FS provided samples collections, FC managed the patient and collected biological and clinical data. EAG, DLR and JCP wrote the paper. All the authors were involved at all stages of manuscript development.

We thank Houria Ichou, Claire Gervais, Sylvie Leporcher, Sebastien Delannoy, Fanny Lermechain, the Department of infectious diseases at Louis Mourier Hospital and the team of the laboratory of virology for their technical support. We are also grateful to Nikki Sabourin-Gibbs, Rouen University Hospital, for her help in editing the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST AND SOURCE OF FUNDING: This work was supported by *Santé Publique France* and Rouen University Hospital. FF was supported by a BBSRC studentship to DLR.

REFERENCES

1. Mourez T, Simon F, Plantier JC. **Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1**. *Clin Microbiol Rev* 2013; **26(3)**:448-461.
2. Rodgers MA, Vallari AS, Harris B, Yamaguchi J, Holzmayer V, Forberg K, et al. **Identification of rare HIV-1 Group N, HBV AE, and HTLV-3 strains in rural South Cameroon**. *Virology* 2017; **504**:141-151.
3. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, et al. **Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1**. *Science* 2006; **313(5786)**:523-526.
4. Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Neel C, Lafay B, Keele BF, et al. **Genetic diversity and phylogeographic clustering of SIVcpzPtt in wild chimpanzees in Cameroon**. *Virology* 2007; **368(1)**:155-171.
5. D'Arc M, Ayouba A, Esteban A, Learn GH, Boue V, Liegeois F, et al. **Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112(11)**:E1343-1352.
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(8)**:871-872.
7. Vallari A, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, Makamche F, et al. **Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon**. *J Virol* 2011; **85(3)**:1403-1407.
8. Sauter D, Hue S, Petit SJ, Plantier JC, Towers GJ, Kirchhoff F, et al. **HIV-1 Group P is unable to antagonize human tetherin by Vpu, Env or Nef**. *Retrovirology* 2011; **8**:103.
9. Faria NR, Rambaut A, Suchard MA, Baele G, Bedford T, Ward MJ, et al. **HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations**. *Science* 2014; **346(6205)**:56-61.
10. Leoz M, Feyertag F, Kfutwah A, Mauclere P, Lachenal G, Damond F, et al. **The Two-Phase Emergence of Non Pandemic HIV-1 Group O in Cameroon**. *PLoS Pathog* 2015; **11(8)**:e1005029.
11. Wain LV, Bailes E, Bibollet-Ruche F, Decker JM, Keele BF, Van Heuverswyn F, et al. **Adaptation of HIV-1 to its human host**. *Mol Biol Evol* 2007; **24(8)**:1853-1860.
12. Takehisa J, Kraus MH, Ayouba A, Bailes E, Van Heuverswyn F, Decker JM, et al. **Origin and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas**. *J Virol* 2009; **83(4)**:1635-1648.
13. Yang SJ, Lopez LA, Exline CM, Haworth KG, Cannon PM. **Lack of adaptation to human tetherin in HIV-1 group O and P**. *Retrovirology* 2011; **8**:78.
14. Kluge SF, Mack K, Iyer SS, Pujol FM, Heigele A, Learn GH, et al. **Nef proteins of epidemic HIV-1 group O strains antagonize human tetherin**. *Cell Host Microbe* 2014; **16(5)**:639-650.
15. Depatureaux A, Charpentier C, Leoz M, Unal G, Damond F, Kfutwah A, et al. **Impact of HIV-1 group O genetic diversity on genotypic resistance interpretation by algorithms designed for HIV-1 group M**. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011; **56(2)**:139-145.

16. Simon F, Souquiere S, Damond F, Kfutwah A, Makuwa M, Leroy E, et al. **Synthetic peptide strategy for the detection of and discrimination among highly divergent primate lentiviruses**. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; **17(10)**:937-952.
17. Filippone C, de Oliveira F, Betsem E, Schaeffer L, Fontanet A, Lemee V, et al. **Simian Immunodeficiency Virus seroreactivity in inhabitants from rural Cameroon frequently in contact with non-human primates**. *Virology* 2017; **503**:76-82.
18. Kfutwah A, Lemee V, Ngono HV, De Oliveira F, Njouom R, Plantier JC. **Field evaluation of the Abbott ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo immunoassay**. *J Clin Virol* 2013; **58 Suppl 1**:e70-75.
19. Wertheim JO, Worobey M. **Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2**. *PLoS Comput Biol* 2009; **5(5)**:e1000377.
20. Archer J, Pinney JW, Fan J, Simon-Loriere E, Arts EJ, Negroni M, et al. **Identifying the important HIV-1 recombination breakpoints**. *PLoS Comput Biol* 2008; **4(9)**:e1000178.
21. Simon-Loriere E, Galetto R, Hamoudi M, Archer J, Lefeuvre P, Martin DP, et al. **Molecular mechanisms of recombination restriction in the envelope gene of the human immunodeficiency virus**. *PLoS Pathog* 2009; **5(5)**:e1000418.
22. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. **Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7**. *Mol Biol Evol* 2012; **29(8)**:1969-1973.
23. Japour AJ, Mayers DL, Johnson VA, Kuritzkes DR, Beckett LA, Arduino JM, et al. **Standardized peripheral blood mononuclear cell culture assay for determination of drug susceptibilities of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates. The RV-43 Study Group, the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee Resistance Working Group**. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37(5)**:1095-1101.
24. Mourez T, Delaugerre C, Vray M, Lemee V, Simon F, Plantier JC. **Comparison of the bioMerieux NucliSENS EasyQ HIV-1 v2.0-HIV-1 RNA quantification assay versus Abbott RealTime HIV-1 and Roche Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 on current epidemic HIV-1 variants**. *J Clin Virol* 2015; **71**:76-81.
25. De Oliveira F, Mourez T, Vessiere A, Ngoupo PA, Alessandri-Gradt E, Simon F, et al. **Multiple HIV-1/M + HIV-1/O dual infections and new HIV-1/MO inter-group recombinant forms detected in Cameroon**. *Retrovirology* 2017; **14(1)**:1.
26. Klatt NR, Silvestri G, Hirsch V. **Nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections**. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; **2(1)**:a007153.
27. Leoz M, Depatureaux A, Vessiere A, Roquebert B, Damond F, Rousset D, et al. **Integrase polymorphism and HIV-1 group O diversity**. *AIDS* 2008; **22(10)**:1239-1243.
28. Depatureaux A, Charpentier C, Collin G, Leoz M, Descamps D, Vessiere A, et al. **Baseline genotypic and phenotypic susceptibilities of HIV-1 group O to enfuvirtide**. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54(9)**:4016-4019.
29. Plantier JC, Dachraoui R, Lemee V, Gueudin M, Borsa-Lebas F, Caron F, et al. **HIV-1 resistance genotyping on dried serum spots**. *AIDS* 2005; **19(4)**:391-397.

Table 1. Primers used for the different RT-PCRs

	PCR step	Primer code	Sequence in amino acid (5'-3')	Fragment size (pb)
HIV-1/P RT-PCR	External PCR	**EnvG 6024 U18**	GAAGCGACGAAGACCTGC	2075
		EnvG 8098 L20	CAWCCCCACAGTCCKAGGAG	
	Nested PCR	**EnvG 6927 U23**	ATACAGTATTGTGCACCAGCAGG	1110
		EnvG 8038 L20	GCTCGGAGCTGTCTTATGCC	
Lentivirus PCR	External PCR	**NDR1 U**	TRGAYACAGGRGCWGAYGA	2653
		POLO RB L	ACTGCHCCTTCHCCTTTCCA	
	Nested PCR	**POL F1 mod U**	CCAGCHCAYAAAGGIATAGGWGG	648
		POL R2 L	CCCAATCCCCCCTTTTCTTTTAAAATT	
Gag PCR		**OM LTR152 U**	CTCAATAAAGCTTGCCTTGA	493
		LTRO1 L	TGTCTTGAGAGCTGGYTCTA	
Genotypic resistance PCR	External XL-RT-PCR	**LTR152 U**	GCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA	8673
		nefO L	GAGTAAATTAACCCWTCCAGTCC	
	Nested PCR-PR/RT	**Gagcam U2**	GCATGGGTAAAGGCAGTA	3170
		HIV1pol3 L	TCTACTTGTCCATGCATGGCTTCTCCTTTTA	
	Nested PCR-INT	**RTOXL1 U**	CTCCAYCCAGACAARTGGAC	1720
		IntOXL1 L	CCYTCACCTTTCCACAGGAG	
	Nested PCR-GP41	**gap4 U**	GCACTCTTCTATAGAACAGACC	1884
		gap5 L	GTTAGGAGGTCCTTGATCCC	

U : Upper, L : Lower

Table 2. Sensitivity and specificity of the four V3 peptide-candidates

Samples	V3 peptides			
	CP2139	**CP684**	**RBF168**	**RBF168-C**
RBF168 (n=3)				
Feb 2005	1.431	1.304	1.504	1.382
Nov 2006	1.323	1.257	1.345	1.305
Feb 2009	1.375	1.298	1.455	1.373
HIV-1/M (n=17)	0.380 (7)* [0.118 ; 0.826]†	0.155 (2)* [0.113 ; 0.196]‡	0.166 (2)* [0.124 ; 0.208]‡	0.220 (3)* [0.149 ; 0.354]†
HIV-1/O (n=11)	0.612 (6)* [0.108 ; 1.306]†	0.642 (2)* [0.152 ; 1.131]‡	0.703 (9)* [0.176 ; 1.366]†	0.807 (9)* [0.321 ; 1.274]†

*mean value and (number of reactive samples)

†range of values of reactive samples

‡values of reactive samples

Table 3. Estimated MRCA dates for the HIV-1 groups M, N, O and P for *env*, including Wertheim and Worobey's results [19] for comparison.

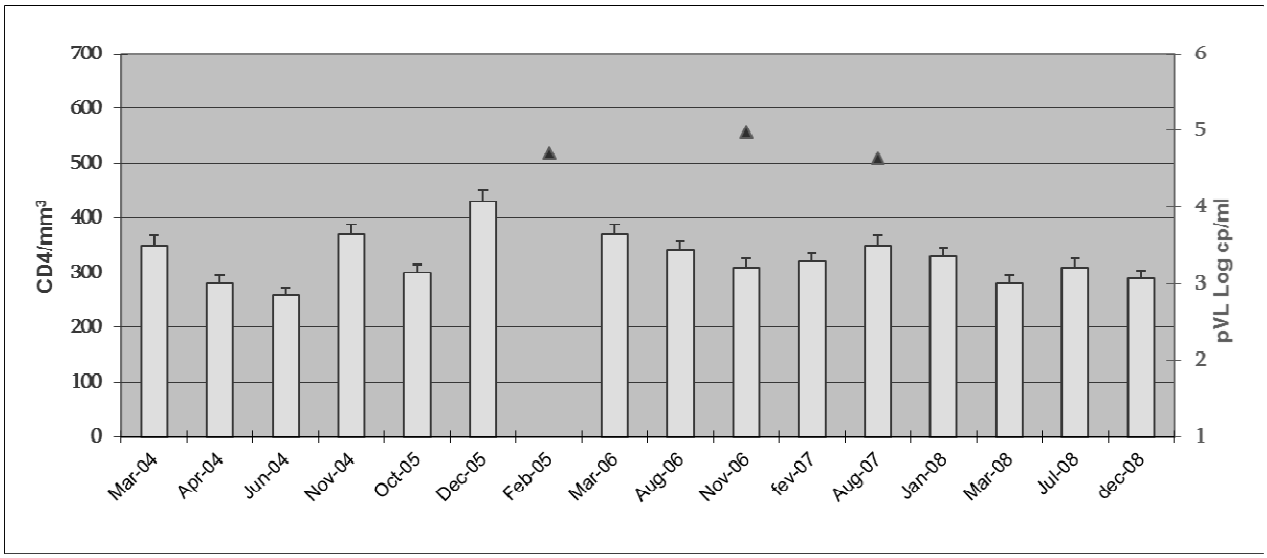
	Summary Statistic	HIV-1 M	HIV-1 N	HIV-1 O	HIV-1 P
Env	mean	120.7048	46.5984	111.8556	48.1107
	stderr of mean	11.6719	4.0249	11.1664	4.5175
	median	121.9359	46.7228	112.9318	47.8504
	geometric mean	118.439	45.6561	109.3941	46.7302
	95% HPD lower	75.1984	28.0671	67.2309	25.9956
	95% HPD upper	157.6911	64.0227	150.4756	69.9374
	auto-correlation time (ACT)	1.18E+07	8.69E+06	1.06E+07	7.15E+06
	effective sample size (ESS)	3.8113	5.1773	4.2475	6.2943
	Year	1888.2952	1962.4016	1897.1444	1960.8893
	95% HPD Lower Year	1933.8016	1980.9329	1941.7691	1983.0044
	95% HPD upper Year	1851.3089	1944.9773	1858.5244	1939.0626
	Wertheim/Worobey	1894 (1857-1927)	1963 (1948-1977)	1905 (1866-1938)	—

Table 4. Natural polymorphism of RBF168 and U14788 strains in the Protease, Reverse Transcriptase, Integrase and gp41.

Region	Type of mutation	Mutations at resistance positions*		
		Specific to RBF168	Shared by the two strains	Specific to U14788
PR	RAM	I15V	L10V, V11I, L33V, M36L, Q58E, D60E, I62V, H69R, A71V, L89I	
	Atypical mutation		K20C, L63K,	
RT	RAM		T69S, A98G, K103R	
	Atypical mutation		V179E, L210Y	K101Q, E138D
IN	RAM			T97A
gp41	RAM		L44M	

RAM: Resistance Associated Mutations, PR: Protease, RT: Reverse Transcription, IN: Integrase
Atypical mutation: Mutation not described as associated with resistance but present at resistance position
*Mutations found at positions associated with resistance according to the ANRS HIV-1 genotypic drug resistance interpretation algorithm 2016 v26.

a)



b)

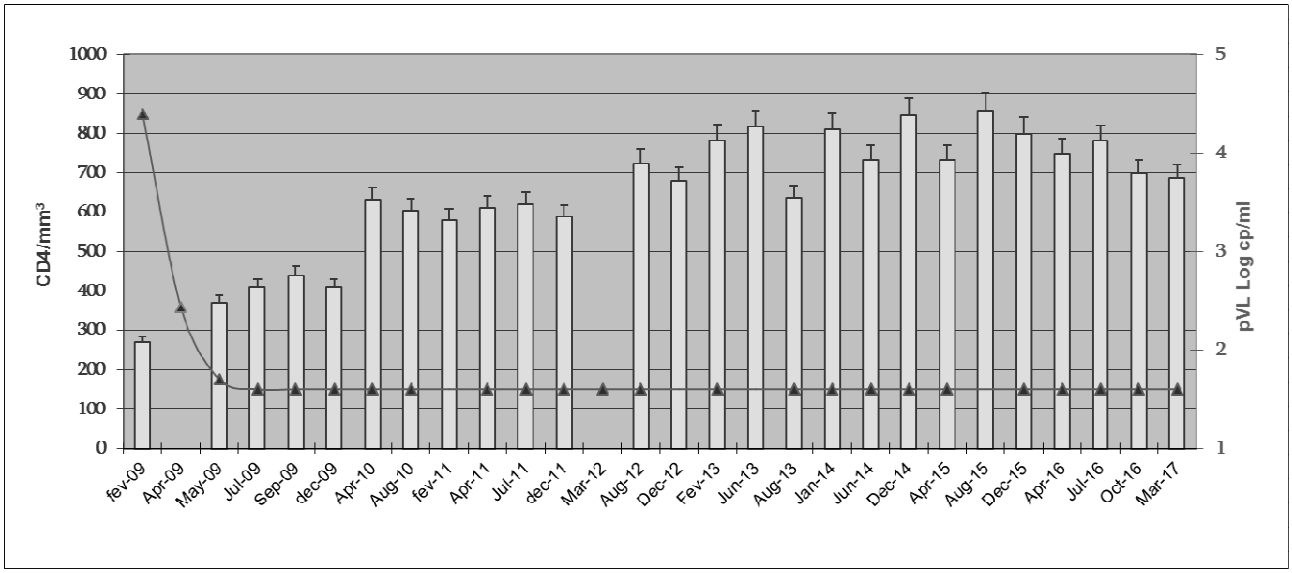


Figure 1. a.b.

Legends

Figure 1. Biological monitoring of patient RBF168. CD4 positive cell count (bar chart) and plasmatic viral load (pVL ▲) are represented before (a) and after (b) treatment initiation. Undetectability is mentioned at 1.6 log cp/ml corresponding to the quantification threshold of the Real*Time* HIV-1 Viral Load assay (Abbott, Des Plaines, IL).

Supplementary methods

HIV-1 group P specific RT-PCR

The specific nested RT-PCR for molecular confirmation of group P strains was performed as follows. RNA extraction was performed with QIAmp viral RNA Minikit (Qiagen, Hilden, Germany) from 140 µl of plasma. Briefly, 10 µl of the extract was used in a RT-PCR reaction with the SuperScript™III One-Step RT-PCR System using Platinum® Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), 20 pmol of each external PCR primer (Table1) and 1.5 mM MgSO4. Amplification was performed on a Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9700 (Applied, Carlsbad, USA) as follows: 50°C for 30 min, 94°C for 2 min and 35 cycles of 94°C for 30s, 55°C for 30s, 68°C for 2 min 30s. The final extension step was 10 min long at 72°C. Nested PCR reaction was performed using 2 µl of amplicons with the HotStar Taq Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), 20 pmol of each nested PCR primer (Table1) and 1.5 mM MgCl2 through: 95°C for 15 min, 30 cycles at 94°C for 30s, 55°C for 30s and 72°C for 1 min 30s and the same temperature for a 10 min final extension step. PCR products were visualized by 1% agarose gel electrophoresis.

Lentivirus PCR

The nested-RT-PCR amplifying a 650 pb fragment of *pol* of HIVs and SIVs, was adapted from [17] as follows. The conditions in the nested PCR step were: 50°C for 30 min, 94°C for 2 min, 10 cycles of 94°C for 15s, 45°C for 30s, 68°C for 3 min then 25 cycles with a 5s increase of elongation time per cycle. PCR products were visualized by 1% agarose gel electrophoresis. Purification was performed using Nucleospin Extract II (Macherey Nagel, Hoerdt, France). Sequencing and phylogenetic analyses were performed as previously described [25, 29].

Amplification of the region encompassing gag-30 position

Characterization of the gag-30 residue was performed with an in-house RT-PCR amplifying a 493 pb fragment of *gag* gene. Briefly, RNA extraction from diluted viral supernatant was performed with QIAmp viral RNA Minikit (Qiagen, Hilden, Germany). The PCR reaction was performed with Superscript III one step RT-PCR using Platinum® Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), 20 pmol of each primer (Table1) and 1.5 mM $MgSO_4$. Cycling conditions were applied on a Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9700 as follows: 50°C for 30 min, 94°C for 2 min and 35 cycles of 94°C for 30s, 55°C for 30s, 68°C for 1 min. The final extension step was 10 min long at 72°C. PCR final products were purified and sequenced as mentioned above.

Amplification of cART targets

Amplification of the Protease, Reverse Transcriptase, Integrase and gp41 was performed as follows. RNA extraction was performed with QIAmp viral RNA Minikit (Qiagen, Hilden, Germany) from 140 µl of plasma. Ten µl of the extract was used in a RT-PCR reaction with the SuperScript™III One-Step RT-PCR System using Platinum® Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), 20 pmol of each primer (table 1) and 2.8mM $MgSO_4$. Amplification was performed on a Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9700 as follows: 50°C for 90 min, 93°C for 2 min and 10 cycles of 93°C for 15s, 50°C for 30s, 68°C for 10 min, followed by 28 cycles at 93°C for 15s, 50°C for 30s and 68°C for 10 min with a 20s increment at each cycle, followed by a 7 min final extension step at 68°C. Nested PCR reaction was performed using 2 µl of amplicons with the HotStar Taq Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), 20 pmol of each primer (table 1) and 1.5 mM $MgCl_2$ through: 95°C for 15 min, 30 cycles at 94°C for 30s, 55°C for 30s and 72°C for 1 min and the same temperature for the 10 min final extension step. PCR products were visualized by 1% agarose gel electrophoresis. Purification and sequencing were performed as described above.