



**HAL**  
open science

# Impact de la variabilité génétique dans la région Long Terminal Repeat et le gène de l'intégrase sur la réplication du VIH-2

Quentin Le Hingrat

► **To cite this version:**

Quentin Le Hingrat. Impact de la variabilité génétique dans la région Long Terminal Repeat et le gène de l'intégrase sur la réplication du VIH-2. Virologie. Université Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019UNIP7152 . tel-03131375

**HAL Id: tel-03131375**

**<https://theses.hal.science/tel-03131375v1>**

Submitted on 4 Feb 2021

**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.

# Université de Paris

**Ecole doctorale BioSorbonne Paris Cité 562**

***INSERM – Unité Mixte de Recherche 1137***

***IAME - Infections, Antimicrobials, Modelling, Evolution***

## **Impact de la variabilité génétique dans la région Long Terminal Repeat et le gène de l'intégrase sur la réplication du VIH-2**

Par Quentin LE HINGRAT

Thèse de doctorat de Virologie

Dirigée par Charlotte CHARPENTIER

Présentée et soutenue publiquement le 23 septembre 2019

Devant un jury composé de :

Pierre-Emmanuel CECCALDI, Professeur, Université de Paris, Président

Vincent CALVEZ, Professeur, Université Paris 6, Rapporteur

Sidonie LAMBERT, Maître de conférences, Université Paris 6, Rapporteur

Véronique AVETTAND-FENOEL, Maître de conférences, Université de Paris,  
Examineur

Diane DESCAMPS, Professeur, Université de Paris, Examineur

Jean-Christophe PLANTIER, Professeur, Université de Rouen, Examineur

Charlotte CHARPENTIER, Maître de conférences, Université de Paris, Directrice de  
thèse



Except where otherwise noted, this is work licensed under  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

**Titre :** Impact de la variabilité génétique dans la région Long Terminal Repeat et le gène de l'intégrase sur la réplication du VIH-2

**Résumé :** Le VIH-2 est souvent considéré comme un modèle d'infection rétrovirale atténuée, du fait de sa faible réplication virale, des faibles taux de transmission et de la progression plus lente vers le stade SIDA des patients infectés. Les mécanismes causaux de cette moindre physiopathologie sont encore mal connus. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la diversité du VIH-2, notamment dans deux régions génomiques : l'intégrase et la région Long Terminal Repeat (LTR).

Nous avons tout d'abord amélioré la technique classique d'isolement de souches virales afin de disposer de davantage de souches de VIH-2, en purifiant les échantillons de patients avec des billes anti-CD44. Ensuite, nous avons utilisé ces souches pour étudier la sensibilité aux inhibiteurs de transfert de brin de l'intégrase, ou INSTI. Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence un nouveau mécanisme de résistance aux INSTI chez le VIH-2, l'insertion de 5 acides aminés après le codon 231 du gène de l'intégrase. Cette insertion est responsable d'une résistance importante au raltegravir (RAL), à l'elvitegravir (EVG), au cabotegravir (CAB), ainsi qu'une résistance modérée au dolutegravir (DTG). La sensibilité au bictegravir (BIC) était conservée pour certains isolats porteurs de cette insertion. Une insertion de deux acides aminés a aussi été observée transitoirement chez un patient. Nous avons confirmé ces observations phénotypiques en construisant des virus porteurs de ces insertions par mutagénèse dirigée. L'insertion, qu'elle soit de 2 ou de 5 acides aminés, n'était pas responsable d'une perte de capacité répliquative, à l'exception du mutant avec l'insertion GIRGK. En revanche, la structure prédite de l'intégrase est fortement modifiée, avec notamment la perte d'un des deux feuillet bêta composant le tonneau bêta du domaine C-terminal. La sensibilité phénotypique des mutants a été déterminée, pour les insertions de 5 acides aminés, les résultats étaient similaires à ceux obtenus avec les isolats cliniques. Nous avons aussi pu déterminer la sensibilité du mutant avec l'insertion GK, qui était sensible au BIC et au DTG, mais déjà pleinement résistant à RAL et au CAB. Dans la dernière partie de notre travail, nous avons étudié la variabilité dans la région LTR des provirus de 66 patients naïfs d'antirétroviraux, inclus dans la cohorte ANRS CO5 VIH-2. La variabilité génétique était plus importante dans les séquences du groupe B, du fait notamment de nombreuses insertions et délétions dans la sous-région « régulatrice » comprenant l'ensemble des sites de fixation de facteurs de transcription cellulaire. Ces virus du groupe B présentaient une délétion de quelques nucléotides dans la région contenant les sites de fixation PuB1 et pets, causant une perte de ce dernier site de fixation. De plus, 4 provirus du groupe B présentaient une délétion du premier site de fixation du facteur de transcription ubiquitaire Sp1. Cette variabilité entraînait des conséquences sur l'activité transcriptionnelle de ces LTR. Les LTR du groupe A et du groupe B présentaient la même activité transcriptionnelle basale mais, dans les cellules Jurkat, après activation cellulaire, l'activité transcriptionnelle des LTR du groupe B et d'un LTR de groupe A dans lequel la zone contenant la délétion de pets a été insérée était 10 fois plus faible que celle du LTR de groupe A. La délétion du premier site de fixation de Sp1 diminuait l'activité transcriptionnelle basale dans les cellules Jurkat et la réponse à la transactivation par la protéine virale Tat dans les cellules HEK293T. De plus, nous avons observé que les patients infectés par les virus du groupe B présentaient des réservoirs viraux de plus petite taille.

Au cours de ce travail, nous avons identifié un nouveau mécanisme de résistance aux INSTI, semblant modifier la structure de la protéine et dont l'impact sur l'activité enzymatique de l'intégrase reste à déterminer. Nous avons également mis en évidence pour la première fois des différences dans les activités transcriptionnelles entre les deux groupes épidémiques du VIH-2, après activation cellulaire, et observé des différences dans la taille du réservoir viral des patients selon le groupe de leur virus.

**Mots clefs :** VIH-2, Variabilité, Réservoir, Long Terminal Repeat, LTR, Transcription, Résistance, Intégrase, Insertion, INSTI, Antirétroviraux

**Title:** Impact of genetic variability within Long Terminal Repeat region and integrase gene on HIV-2 replication

**Abstract:** HIV-2 is often considered as an attenuated model of HIV-1 infection. Indeed, HIV-2 is characterized by its lower viral replication, reduced transmission rates and a slower progression towards AIDS of infected-patients. Mechanisms implied in HIV-2 reduced pathogenicity are not entirely understood. In our work, we have focused on HIV-2 diversity, especially in two genomic regions: the integrase and the Long Terminal Repeat (LTR) region.

We have improved the culture method, by purifying clinical samples using anti-CD44 paramagnetic beads. This allowed us to increase the number of viral strains in our collection. Then, we used those strains to study phenotypic susceptibility to integrase strand transfer inhibitors (INSTI). During this study, we identified a new molecular mechanism of resistance to INSTI, a 5 amino-acids insertion after codon 231 of HIV-2 integrase. This insertion was responsible for a high level of resistance to raltegravir (RAL), elvitegravir (EVG), cabotegravir (CAB), and a slight increase in the resistance to dolutegravir (DTG). Certain isolates harboring this insertion remained susceptible to bictegravir (BIC). A 2 amino-acids insertion was also transiently observed in one patient. We have confirmed those phenotypic data by constructing HIV-2 mutants by site-directed mutagenesis. Whether the insertion was composed of 2 or 5 amino-acids, replicative capacity was similar to the wild-type virus, except for the mutant with a GIRGK insertion. However, the predicted structure of mutated HIV-2 integrases was modified, notably in the C-terminal domain, due to the loss of one of the two beta sheets composing the beta barrel. Phenotypic susceptibility of mutants was determined and results for HIV-2 mutants with a 5 amino-acids insertion were similar to those obtained with clinical isolates. We also determined the susceptibility of the mutant with a GK insertion. It was susceptible to BIC and DTG, but already resistant to RAL and CAB. In the last part of our work, we have characterized genetic variability within LTR region in 66 antiretroviral-naïve patients, included in the French ANRS CO5 HIV-2 cohort. Genetic variability was higher among group B sequences, due to a high number of insertions and deletions in the « regulatory » sub-region that encompasses all transcription factor binding sites. All group B viruses presented a short deletion in the region encompassing PuB1 and pTet binding sites, causing the loss of the pTet binding site. Furthermore, 4 group B viruses had also a deletion of the first binding site of Sp1 transcription factor. This variability impacted LTR transcriptional activity. Group A and B LTRs presented a similar basal transcriptional activity but, in Jurkat cells, after cellular activation, transcriptional activities of group B LTR and a group A LTR in which the deletion of pTet binding site has been introduced were 10-fold lower than the transcriptional activity of an intact group A LTR. The deletion of the first Sp1 binding site reduced the basal transcriptional activity in Jurkat cells and the response to transactivation by the viral protein Tat in HEK293T. We also observed that viral reservoirs were smaller in patients infected by HIV-2 group B viruses.

In this work, we have identified a new mechanism of resistance to INSTI that seems to modify the integrase structure. Its impact on the enzymatic activity of HIV-2 integrase remains to be determined. We have also evidenced, for the first time, differences in transcriptional activities between HIV-2 groups, after cellular activation, and observed changes in the size of viral reservoirs in HIV-2-infected patients according to the viral group.

**Keywords:** HIV-2, Variabilité, Reservoir, Long Terminal Repeat, LTR, Transcription, Resistance, Integrase, Insertion, INSTI, Antiretroviral

## Remerciements

Au Docteur Charlotte Charpentier, pour m'avoir encadré depuis mon master 2, pour tes enseignements, tes conseils et ta bonne humeur. Merci également pour les nombreuses relectures de manuscrits, ce fut un plaisir de réaliser cette thèse sous ta direction !

Au Professeur Pierre-Emmanuel Ceccaldi, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury, ainsi que pour vos enseignements de qualité suivis durant mon master 2 qui m'ont conforté dans mon souhait de travailler en virologie,

Au Docteur Sidonie Lambert et au Professeur Vincent Calvez, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail, merci infiniment,

Au Docteur Véronique Avettand-Fènoël et au Professeur Jean-Christophe Plantier, pour avoir accepté de participer à ce jury, je vous en suis très reconnaissant,

Au Professeur Diane Descamps pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, m'avoir permis de m'initier à la recherche puis de prolonger mon expérience en réalisant ma thèse et mon assistantat dans ton service, j'y ai découvert un laboratoire formidable, à l'image de sa chef,

A Gilles Collin, pour m'avoir aidé depuis mon master 2, m'avoir initié aux techniques de biologie moléculaire, de culture et de phénotypes de résistance, et pour nos longues discussions durant nos expériences dans le P3,

A l'ensemble des biologistes, techniciens, internes et post-doctorants du laboratoire (Alexandre, Alice, Benoit, Florence, Houria, Juliette, Justine, Lucile, Marine, Mélanie, Nadhira, Samuel, Valentine, Vincent), pour votre précieuse aide durant toutes ces années,

Aux membres de IAME, notamment Erick, Françoise, Harry, Houda, Mélanie, Tiphanie,

A mes collègues cliniciens et pharmacologues, Antoine, Gilles, Jade, Minh, Roland, Sophie, Véronique, Yazdan, pour les projets enthousiasmants et les discussions stimulantes,

A mes amis, Alaric, Anne-Sophie, Aude J, Aude P, Bahia, Benjamin, Bruno, Camille, Clémence, Clément, Emma, Fabrice, Jennifer, Jean-Sébastien, Jonathan, Laurent, Ludovic L, Ludovic S, Marie, Max, Modez, Morgane, Nicolas, Olivier, Patrick, Pierre, Simon, Vincent C, Vincent G,

A mes grands-parents et à toute ma famille, ainsi qu'à ma belle-famille,

A mes parents, Christine et Yves, et à Damien, mon frère,

A Lilas, ma chérie,

# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>7</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>11</b>
<b>1. DECOUVERTE DES VIH.....</b>	<b>11</b>
<b>2. EPIDEMIOLOGIE DES VIH .....</b>	<b>15</b>
<b>3. STRUCTURE ET ORGANISATION GENOMIQUE DES VIH.....</b>	<b>16</b>
<b>4. ORIGINES ET VARIABILITE DES VIH.....</b>	<b>18</b>
<b>5. CONSEQUENCES DE LA VARIABILITE GENETIQUE DES VIH .....</b>	<b>23</b>
<b>6. CYCLE DU VIH .....</b>	<b>25</b>
6.1. ENTREE DANS LES CELLULES CIBLES .....	26
6.2. DECAPSIDATION ET RETROTRANSCRIPTION.....	28
6.3. COMPLEXE DE PRE-INTEGRATION ET INTEGRATION .....	32
6.4. REACTIVATION DES PROVIRUS ET TRANSCRIPTION .....	34
6.5. TRADUCTION DES ARN MESSAGERS ET ASSEMBLAGE DES PARTICULES VIRALES.....	38
6.6. MATURATION ET BOURGEONNEMENT .....	38
<b>7. TRAITEMENTS ANTIRETROVIRAUX.....</b>	<b>39</b>
7.1. OBJECTIFS .....	39
7.2. TRAITEMENTS DISPONIBLES.....	39
7.3. NOUVELLES CLASSES D'ANTIRETROVIRAUX EN DEVELOPPEMENT .....	45
7.4. AUTRES PISTES THERAPEUTIQUES .....	46
7.5. PRINCIPES DU TRAITEMENT DU VIH-2 EN 2019 .....	47
<b>8. RESERVOIRS DU VIH .....</b>	<b>49</b>
8.1. RESERVOIRS LATENTS .....	50
8.2. RESERVOIRS EXTRACELLULAIRES .....	50
8.3. SANCTUAIRES .....	51
8.4. QUANTIFICATION DES RESERVOIRS .....	51
<b>9. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION PAR LE VIH-2.....</b>	<b>58</b>
9.1. HISTOIRE NATURELLE DE L'INFECTION PAR LE VIH-2.....	58
9.2. FACTEURS POUVANT EXPLIQUER LA MOINDRE PATHOGENICITE DU VIH-2 .....	62
<b>10. REGIONS LTR ET INTEGRASE DES VIH-2 .....</b>	<b>65</b>
10.1. INTEGRASE DU VIH-2.....	65
10.2. INHIBITEURS DE L'INTEGRASE.....	68
10.3. RESISTANCES DU VIH-2 AUX INHIBITEURS DE TRANSFERT DE BRIN DE L'INTEGRASE .....	70
10.4. REGION LONG TERMINAL REPEAT .....	72
10.5. FONCTIONS DE LA REGION LONG TERMINAL REPEAT .....	73
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>75</b>

<b>RESULTATS .....</b>	<b>77</b>
1. PREMIER ARTICLE .....	77
2. DEUXIEME ARTICLE .....	84
3. TROISIEME ARTICLE.....	99
4. QUATRIEME ARTICLE .....	118
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>159</b>
<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>166</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>170</b>
<b>ANNEXE 1 : FICHE DE LA COHORTE ANRS CO5 VIH-2 .....</b>	<b>190</b>
<b>ANNEXE 2 : ALGORITHME ANRS D'INTERPRETATION DES GENOTYPES DE RESISTANCE DU VIH-2 ..</b>	<b>194</b>
<b>ANNEXE 3 : RAPPORT DE CAS D'UNE PRIMO-INFECTION PAR LE VIH-2 .....</b>	<b>198</b>

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ANRS</b>	Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales
<b>APOBEC</b>	« Apolipoprotein B mRNA-Editing Catalytic peptide » ou famille de cytidine déaminases capables d'édition de l'ARN et de l'ADN
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARV</b>	Antirétroviraux
<b>AZT</b>	Zidovudine
<b>BIC</b>	Bictegravir
<b>C/EBP</b>	« CCAAT/Enhancer Binding Protein », ou famille de protéines amplificatrices se liant au motif CCAAT
<b>CAB</b>	Cabotegravir
<b>CCR5</b>	Chemokine CC motif Receptor 5
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentration d'antirétroviral inhibant 50% de la réplication virale
<b>CMV</b>	Cytomégalovirus
<b>CRF</b>	Formes Recombinantes Circulantes
<b>CSMP</b>	Cellules Sanguines Mononucléées Périphériques, ou « Peripheral Blood Mononuclear Cells » (PBMC)
<b>CV</b>	Charge Virale
<b>CXCR4</b>	Chemokine CXC motif Receptor 4
<b>DTG</b>	Dolutegravir
<b>EIQ</b>	Ecart Inter-Quartile
<b>Elf-1</b>	« E74-like factor 1 », facteur de transcription appartenant à la famille ETS
<b>ETS</b>	« E26-transformation specific », famille de facteurs de transcription
<b>EVG</b>	Elvitegravir
<b>FT</b>	Facteurs de Transcription
<b>HTLV</b>	« Human T Lymphotropic Virus »
<b>INNTI</b>	Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse
<b>INSTI</b>	« Integrase strand transfer inhibitors », ou inhibiteurs de l'activité de transfert de brin de l'intégrase
<b>INTI</b>	Inhibiteurs Nucléos(t)idiques de la Transcriptase Inverse

<b>IP</b>	Inhibiteurs de Protéase
<b>IRF</b>	« Interferon Regulatory Protein », ou protéine régulatrice de l'interféron
<b>LTR</b>	« Long Terminal Repeat », ou séquence terminale longue répétée
<b>Luc</b>	Gène codant l'enzyme luciférase de <i>Photinus pyralis</i>
<b>NFκB</b>	« Nuclear Factor Kappa B », ou facteur nucléaire kappa B
<b>PBS</b>	« Primer Binding Site »
<b>PCR</b>	« Polymerase Chain Reaction » ou Réaction de Polymérase en Chaîne
<b>pEHO-Luc</b>	Plasmide du gène <i>luc</i> sous l'expression du LTR de la souche de référence du groupe B du VIH-2, « EHO »
<b>peri-κB</b>	Site proximal du site de fixation de NFκB
<b>pets</b>	« peri-Elf1 transcription site » ou site proximal du site de fixation d'Elf-1
<b>pLTR-Luc</b>	Plasmide du gène <i>luc</i> sous l'expression d'un LTR du VIH-2
<b>PHA</b>	Phytohémagglutinine
<b>PMA</b>	Phorbol myristate
<b>PPT</b>	« Polypurine tract »
<b>pROD9</b>	Plasmide contenant le génome entier de la souche de référence du groupe A du VIH-2, « ROD »
<b>pRec-Luc</b>	Plasmide du gène <i>luc</i> sous l'expression du LTR du VIH-2 recombinant A/B dans le LTR
<b>pROD-Luc</b>	Plasmide du gène <i>luc</i> sous l'expression du LTR de la souche de référence du groupe A du VIH-2, « ROD »
<b>PuB</b>	« Purine Box », ou boîte riche en purines
<b>pΔSp1-Luc</b>	Plasmide du gène <i>luc</i> sous l'expression du LTR de la souche de référence du groupe B du VIH-2, « EHO », délété du premier site de fixation de Sp1
<b>Sp1</b>	« Specificity protein 1 »
<b>TAMs</b>	« Thymidine Associated Mutations » ou mutations associées aux analogues de thymidine
<b>TAR</b>	« Tat-Activated Region », ou région activée par Tat
<b>Ta</b>	Température d'amplification
<b>Tm</b>	Température de demi-dénaturation
<b>RAL</b>	Raltegravir
<b>RT-PCR</b>	« Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction »
<b>VIH</b>	Virus de l'Immunodéficience Humaine
<b>VIS</b>	Virus de l'Immunodéficience Simienne

# Table des illustrations

FIGURE 1 : VISUALISATION PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DU VIH-2 ET DU VIH-1. ....	13
FIGURE 2 : REPARTITION MONDIALE DES INFECTIONS PAR LE VIH-2 .....	16
FIGURE 3 : STRUCTURES DU VIH-1 ET DU VIH-2. ....	17
FIGURE 4 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES GENOMES DU VIH-1 ET DU VIH-2. ....	18
FIGURE 5 : VARIABILITE AU SEIN DES VIH. ....	19
FIGURE 6 : PHYLOGENIE DES VIH. ....	20
FIGURE 7 : DIVERSITE DES VIH-2. ....	21
FIGURE 8 : ORGANISATION GENOMIQUE DES DEUX FORMES RECOMBINANTES DECRIES DU VIH-2. ....	23
FIGURE 9 : RETROTRANSCRIPTION DES VIH .....	30
FIGURE 10 : DESCRIPTION DU CONTEXTE NUCLEOTIDIQUE D'EDITION PAR APOBEC3G/F. ....	31
FIGURE 11 : CYCLE DU VIH-2 ET ROLE DES FACTEURS DE RESTRICTION ANTIRETROVIRAUX. ....	34
FIGURE 12 : SCHEMA DE LA TRANSACTIVATION DU VIH-2. ....	36
FIGURE 13 : SITES D'ACTION DES MOLECULES ANTIRETROVIRALES .....	43
FIGURE 14 : DIFFERENTS TYPES D'ADN VIRAL DU VIH. ....	53
FIGURE 15 : REPARTITION DES PROVIRUS DU VIH-1 .....	56
FIGURE 16 : COMPARAISON DES TECHNIQUES DE QUANTIFICATION DU RESERVOIR LATENT DU VIH-1. ....	57
FIGURE 17 : ALIGNEMENT DES INTEGRASES DE DIFFERENTS RETROVIRUS. ....	66
FIGURE 18: DESCRIPTION DE L'INTEGRASE DU VIH-2 ET DES PRINCIPALES MUTATIONS DE RESISTANCE AUX INHIBITEURS D'INTEGRASE .....	67
FIGURE 19 : STRUCTURES DES INTEGRASES DU PFV ET DU VIH-2. ....	68
FIGURE 20 : STRUCTURES DES DIFFERENTS INSTI .....	69
FIGURE 21 : PRINCIPALES VOIES DE RESISTANCE DU VIH-2 AUX INHIBITEURS D'INTEGRASE. ....	71
FIGURE 22 : SCHEMA DE LA REGION LTR DU VIH-2. ....	73
FIGURE 23 : RATIONNEL DERRIERE LE DOUBLEMENT DE DOSE D'UN INHIBITEUR D'INTEGRASE OU LA CO-ADMINISTRATION D'ATAZANAVIR .....	100
FIGURE 24 : CARTE DU PLASMIDE PROD9 .....	102
FIGURE 25 : CONSTRUCTION DES MUTANTS VIH-2 .....	102
FIGURE 26 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN PHENOTYPE DE RESISTANCE DU VIH PAR LA METHODE DE L'ANRS. ....	106
FIGURE 27 : REPARTITION DES PROFILS DE MUTATIONS AUX INHIBITEURS D'INTEGRASE CHEZ LES PATIENTS INFECTES PAR LE VIH-2. ....	108
FIGURE 28 : CAPACITE REPLICATIVE DES VIH-2 PORTEURS DE MUTATIONS 231INS. ....	111
FIGURE 29 : CHARGE VIRALE VIH-2 PLASMATIQUE DES PATIENTS SELON LA PRESENCE OU NON DE LA MUTATION Q91R DANS L'INTEGRASE .....	112
FIGURE 30 : STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES PREDITES DES INTEGRASES DU VIH-2 .....	115
TABLEAU 1 : CLASSIFICATION CDC 1993 DES STADES DE L'INFECTION PAR LE VIH .....	14
TABLEAU 2 : LISTE DES MOLECULES ANTIRETROVIRALES ACTUELLEMENT COMMERCIALISEES OU DISPONIBLES DANS LE CADRE D'ESSAIS CLINIQUES OU D'ATU. ....	44
TABLEAU 3 : DIFFERENCES CLINIQUES, IMMUNOLOGIQUES ET VIROLOGIQUES ENTRE LES INFECTIONS PAR LE VIH-1 ET PAR LE VIH-2. ....	61
TABLEAU 4 : LISTE DES AMORCES UTILISEES POUR LA MUTAGENESE DIRIGEE .....	103
TABLEAU 5 : PROFILS DE RESISTANCE DES 57 PATIENTS INFECTES PAR LE VIH-2, PORTEURS DE MUTATIONS DE RESISTANCE DANS LE GENE DE L'INTEGRASE. ....	109
TABLEAU 6 : CI <sub>50</sub> DES VIRUS MUTANTS CONSTRUIES PAR MUTAGENESE DIRIGEE .....	113

## Abréviation des acides aminés

Alanine	Ala, A
Cystéine	Cys, C
Acide aspartique	Asp, D
Acide glutamique	Glu, E
Phénylalanine	Phe, F
Glycine	Gly, G
Histidine	His, H
Isoleucine	Ile, I
Lysine	Lys, K
Leucine	Leu, L
Méthionine	Met, M
Asparagine	Asn, N
Proline	Pro, P
Glutamine	Gln, Q
Arginine	Arg, R
Sérine	Ser, S
Thréonine	Thr, T
Valine	Val, V
Tryptophane	Trp, W
Tyrosine	Tyr, Y

# Introduction

---

## 1. Découverte des VIH

En juin 1981, le CDC (Centers for Disease Control and Prevention) rapporta la survenue de pneumonies à *Pneumocystis jirovecii* (anciennement appelée *P. carinii*) chez cinq jeunes hommes, homosexuels, en Californie. Ces patients présentaient également des maladies à cytomégalovirus (CMV) et/ou des candidoses oro-pharyngées (Gottlieb et al., 1981a). Des études immunologiques menées sur leurs lymphocytes retrouvaient des réponses prolifératives très diminuées en réponse à des agents mitogènes (Gottlieb et al., 1981a).

Suspectant une origine infectieuse à cette immunodépression, les responsables du CDC ont donc décidé de colliger les données sur les patients recevant un traitement pour une pneumocystose, celui-ci étant uniquement disponible auprès du CDC.

Grâce à cette surveillance accrue et à des alertes épidémiologiques régulières, le CDC décrit l'existence de pneumonies à *P. jirovecii*, mais également d'autres infections opportunistes et des sarcomes de Kaposi, chez des centaines d'individus à travers les Etats-Unis d'Amérique (Centers for Disease Control (CDC), 1982). Parmi ces patients, il était observé une sur-représentation des homosexuels mais également des haïtiens, des hémophiles et des héroïnomanes. Cette pathologie liée à une immunosuppression et à des lymphadénopathies est alors nommée Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis (SIDA).

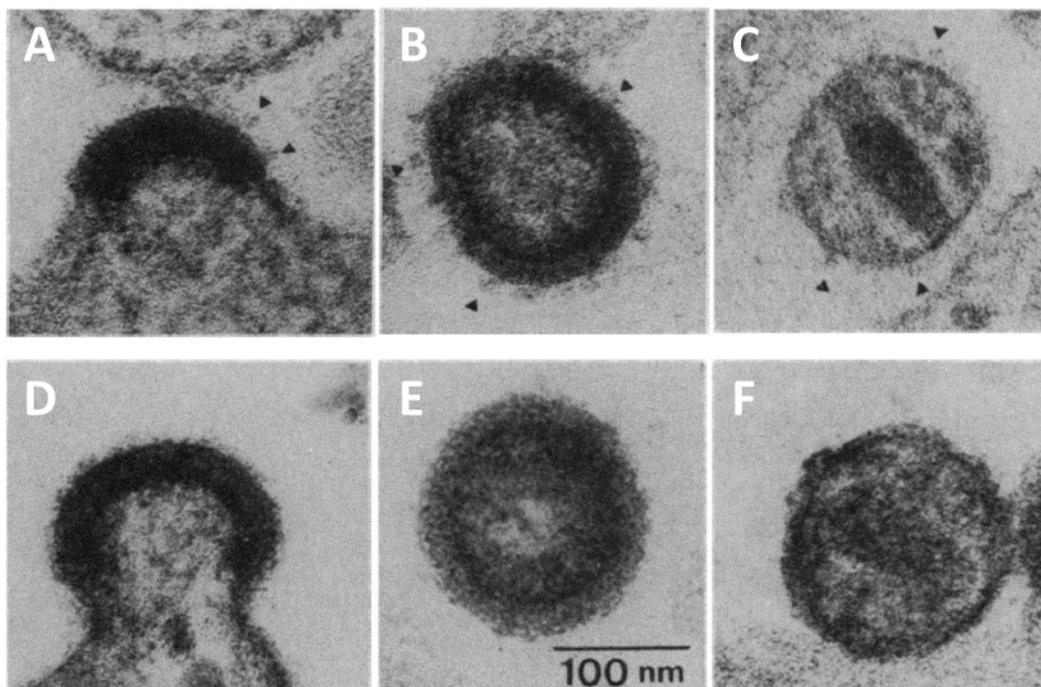
D'intenses travaux de recherche, impliquant une collaboration étroite de médecins hospitaliers, d'épidémiologistes et de chercheurs ont permis d'identifier deux rétrovirus comme agents étiologiques du SIDA. Tout d'abord, le virus de l'ImmunoDéficiency Humaine de type 1 (VIH-1), isolé en 1983 à l'Institut Pasteur, à partir des lymphocytes d'un ganglion lymphatique cervical d'un patient (Barré-Sinoussi et al., 1983). Différents éléments du virus isolé étaient en faveur d'un rétrovirus : 1) l'activité reverse transcriptase détectée dans les cultures (détectable au 15<sup>e</sup> jour de culture, se maintenant pendant 15 à 20 jours puis diminuant), 2) la densité de ce virus en gradient de sucrose (1.16) et 3) la spécificité de la polymérase virale pour les ribonucléotides (Barré-Sinoussi et al., 1983).

Ce virus était proche des rétrovirus connus à l'époque (les « Human T Lymphotropic Virus », ou HTLV, de type I et II) mais produisait une protéine virale spécifique, alors appelée p25, qui n'était pas reconnue par l'anticorps anti-p24 d'HTLV-I. Ce virus fut d'abord nommé LAV (« LymphAdenopathy Virus ») et HTLV-III, avant que le nom de VIH-1 ne lui fut définitivement attribué. En parallèle, ce virus fut mis en évidence par microscopie électronique, et il fut remarqué que la structure était proche de celle attendue pour un rétrovirus.

Deux ans plus tard, le VIH de type 2 (VIH-2) était décrit par une autre équipe française, là aussi à l'issue d'une collaboration impliquant cliniciens, chercheurs et biologistes (Clavel et al., 1986a). Observant que certains patients originaires d'Afrique de l'Ouest présentaient des symptômes cliniques compatibles avec un stade SIDA mais que leurs tests sérologiques vis-à-vis du VIH-1 étaient toujours négatifs, ils suspectèrent l'existence d'un deuxième rétrovirus responsable de SIDA.

Ils isolèrent ce virus à partir de co-cultures des lymphocytes du sang périphérique de deux patients (l'un originaire de Guinée-Bissau, l'autre du Cap-Vert, tous deux avec des taux de lymphocytes T CD4+ inférieurs à 100/mm<sup>3</sup>) avec des lymphocytes de donneurs sains, activés préalablement par phytohémagglutinine (PHA). Là aussi, une activité transcriptase inverse était détectée dans le surnageant au 10<sup>e</sup> jour de culture, qui culminait au 15<sup>e</sup> jour puis diminuait rapidement. Le virus put également être visualisé sur les cultures par microscopie électronique (Figure 1).

Le virus isolé différait bien du VIH-1, comme démontré par la faible réactivité du sérum anti-VIH-1 avec les extraits lysés de cultures de ce nouveau virus (positivité vis-à-vis d'une protéine de 26KDa mais pas vis-à-vis des protéines d'enveloppe gp140 et gp41). Cette divergence entre VIH-1 et VIH-2 fut confirmée par la faible hybridation obtenue entre l'ARN viral du VIH-2 et des sondes ADN dérivées du VIH-1. En revanche, il était observé une plus grande similarité avec un virus simien récemment isolé, le Virus de l'Immunodéficience Simienne du macaque (SIVmac) (Henrickson et al., 1983; Osborn et al., 1984).



**FIGURE 1 : VISUALISATION PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DU VIH-2 ET DU VIH-1.**

*Différentes images de microscopie électronique du VIH-2 (A, B et C) et du VIH-1 (D, E et F). Ces images représentent les virus en cours de bourgeonnement (A et D), les virions immatures (B et E) et le virus mature (C et F). (Figure reproduite depuis Clavel et al., 1986b)*

Rapidement, le récepteur principal du virus a été identifié, il s'agit du « Cell Density 4 antigen » ou CD4 (Dagleish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984). Comme les premières études ont rapporté que le nombre absolu de lymphocytes T CD4+ était effondré chez les patients au stade SIDA et que la décroissance de ces lymphocytes T CD4+ était corrélée à l'apparition des maladies opportunistes, la mesure du taux de ces lymphocytes T CD4+ a ensuite été utilisée comme marqueur de l'évolution des patients (Gottlieb et al., 1981b).

En 1993, le CDC proposa une classification permettant de définir l'avancement de l'infection, en utilisant des critères immunologiques (nombre absolu de lymphocytes T CD4+ par mm<sup>3</sup> et pourcentage de lymphocytes T CD4+ parmi les lymphocytes totaux) et cliniques (manifestations cliniques observées) (Tableau 1). Pour le taux de lymphocytes T CD4+, c'est le nadir de CD4 qui doit être utilisé. En 2000, l'OMS a publié une classification qui se base uniquement sur des critères cliniques et peut donc être utilisée même en l'absence de typage lymphocytaire.

<b>Nombre de lymphocytes T CD4+ par mm<sup>3</sup> (% des lymphocytes totaux)</b>	<b>A : Infection asymptomatique ou primo-infection ou polyadénopathies</b>	<b>B : Infection symptomatique, sans critères A ou C</b>	<b>C : Stade SIDA</b>
<b>&gt;500 (&gt;28%)</b>	A1	B1	C1
<b>200 à 499 (14-28%)</b>	A2	B2	C2
<b>&lt; 200 (14%)</b>	A3	B3	C3

**TABLEAU 1 : CLASSIFICATION CDC 1993 DES STADES DE L'INFECTION PAR LE VIH**

*Manifestations cliniques appartenant à la catégorie B :* angiomatose bacillaire ; candidose oropharyngée ; candidose vaginale, persistante, fréquente ou répondant mal au traitement ; dysplasie du col utérin, carcinome in situ ; syndrome constitutionnel : fièvre > 38,5°C ou diarrhée depuis plus d'un mois ; leucoplasie chevelue de la langue ; zona récurrent ou envahissant plus d'un dermatome ; purpura thrombocytopénique idiopathique ; listériose ; neuropathie périphérique.

*Manifestations cliniques appartenant à la catégorie C :* Candidose bronchique, trachéale ou extrapulmonaire ; Candidose œsophagienne ; Cancer invasif du col ; Coccidioïdomycose disséminée ou extrapulmonaire ; Cryptococcose extrapulmonaire ; Cryptosporidiose intestinale évoluant depuis plus d'un mois ; Infection à CMV (autre que foie, rate et/ou ganglions) ; Rétinite à CMV ; Encéphalopathie due au VIH ; Infection herpétique : ulcères chroniques depuis plus d'un mois ou infection bronchique, pulmonaire ou œsophagienne ; Histoplasmose disséminée ou extrapulmonaire ; Isosporidiose intestinale depuis plus d'un mois, Sarcome de Kaposi ; Lymphome de Burkitt ; Lymphome immunoblastique ; Lymphome cérébral primaire ; Infection à Mycobacterium tuberculosis quelle que soit la localisation (pulmonaire ou extrapulmonaire) ; Infection à mycobactérie identifiée ou non, disséminée ou extrapulmonaire ; Pneumonie à Pneumocystis carinii ; Pneumopathie bactérienne récurrent ; Leuco-Encéphalopathie Multifocale Progressive (LEMP) ; Septicémie à Salmonelle mineure récurrente ; Syndrome cachectique dû au VIH (perte de plus de 10% du poids corporel associée à une diarrhée chronique inexplicable ou à une asthénie chronique ou une fièvre prolongée inexplicable) ; Toxoplasmose cérébrale.

L'isolement du VIH-1 puis du VIH-2 a permis de développer des techniques sérologiques pour dépister l'infection par le VIH (Parekh et al., 2018). Les premiers tests sérologiques, dits de « 1<sup>ère</sup> génération », étaient basés sur la réactivité des IgG des patients avec les antigènes viraux obtenus à partir de virus lysés, obtenus par culture. La spécificité de ces tests était moyenne et les faux-positifs fréquents. Les tests de « 2<sup>e</sup> génération » incorporèrent donc des antigènes viraux recombinants ou synthétiques des régions immunodominantes du VIH-1 et du VIH-2 afin d'augmenter la spécificité de la sérologie et de diminuer le nombre de faux-positifs.

Les tests ELISA dits de « 3<sup>e</sup> génération » permettaient de détecter à la fois les IgG et les IgM dirigés contre l'Ag p24, l'Ag gp160 du VIH-1 de groupe M, l'Ag gp36 du VIH-2, ainsi que

ceux dirigés contre un peptide synthétique du VIH-1 de groupe O. La détection des IgM dans ces tests de « 3<sup>e</sup> génération » a permis de raccourcir la fenêtre sérologique.

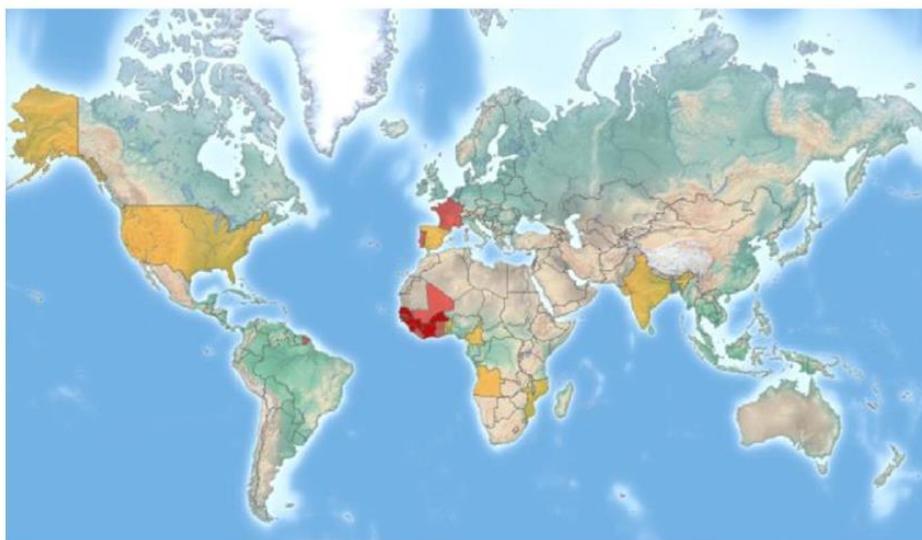
Les tests ELISA actuellement utilisés en France sont dits de « 4<sup>e</sup> génération » et ils doivent répondre aux critères techniques fixés par l'arrêté publié le 28 mai 2010 au Journal Officiel de la République Française. Ces tests de « 4<sup>e</sup> génération » détectent l'antigène p24, en plus des anticorps dirigés contre le VIH-1 et/ou le VIH-2 afin de diminuer encore davantage la durée de la fenêtre sérologique. Depuis le développement des dépistages de l'infection par le VIH, il est obligatoire de confirmer tout résultat positif par une 2<sup>e</sup> technique (Western blot ou immunoblot) et de répéter la sérologie sur un 2<sup>e</sup> prélèvement.

En plus de ces tests sérologiques désormais sensibles et spécifiques, des tests rapides d'orientation diagnostique (TROD) de l'infection par le VIH ont été développées depuis le milieu des années 1990. Ces tests permettent d'obtenir un résultat en quelques minutes et sont réalisables en dehors des laboratoires de biologie médicale en France, afin de dépister des personnes en marge du circuit de soin. En France, 15 à 20% des personnes infectées par le VIH ignorent leur statut sérologique, justifiant le déploiement de ces TROD pour diagnostiquer ces personnes.

## 2. Epidémiologie des VIH

Actuellement, 36,9 millions de personnes seraient infectées par le VIH à travers le monde et le nombre de décès annuels de maladies liées au SIDA est estimé à 940 000 (UNAIDS, 2018). En 2017, 1,8 millions de personnes ont été infectées par le VIH. Cette pandémie est majoritairement due au VIH-1, responsable de plus de 99% des infections par le VIH. Entre 1 et 2 millions de personnes dans le monde seraient infectées par le VIH-2 (Visseaux et al., 2016a). L'épidémie de VIH-2 est principalement cantonnée aux pays d'Afrique de l'Ouest (Guinée-Bissau, Sénégal, Côte d'Ivoire, Mali, Gambie, etc.) et n'a que très modérément diffusée dans les autres régions du monde, en dehors des pays ayant des liens économiques et/ou historiques avec ces pays africains (Portugal, France, Inde) (Faria et al., 2012; Lemey et al., 2003) (Figure 2).

En France, le VIH-2 représente 2% des nouveaux diagnostics d'infection par le VIH (Morlat, 2013). Les co-infections VIH-1/VIH-2 sont plus rares, de l'ordre de 0,1% des infections par le VIH diagnostiquées en France (Cazein et al.).



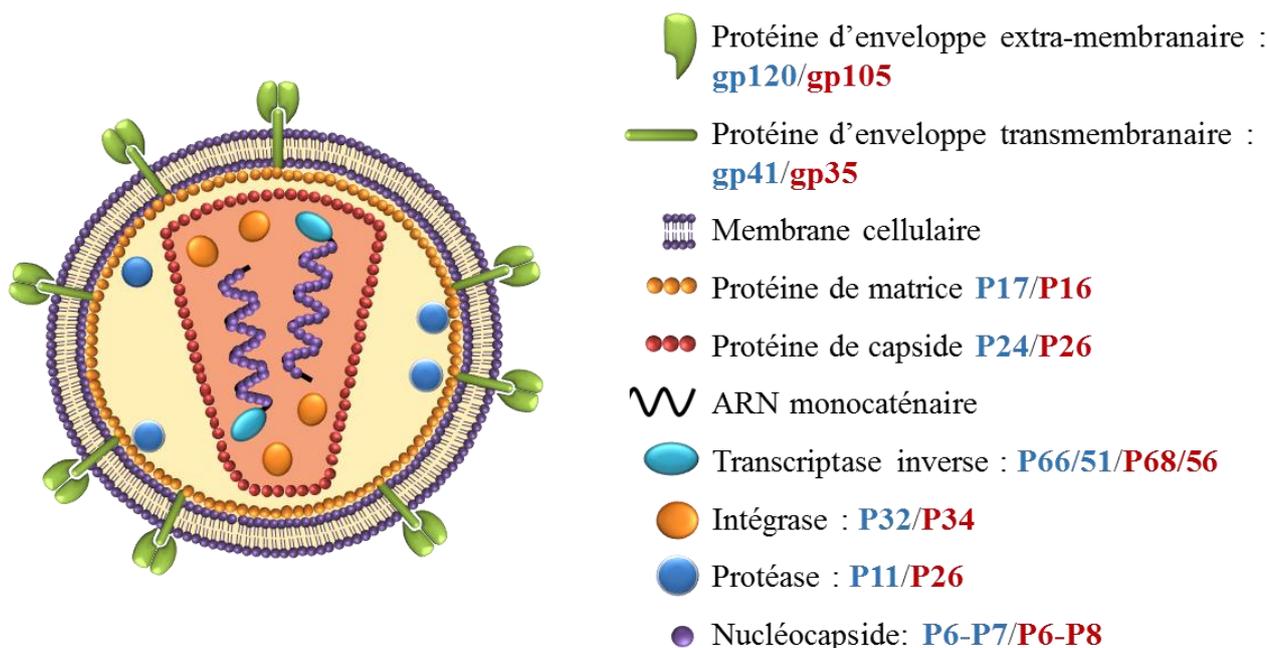
**FIGURE 2 : REPARTITION MONDIALE DES INFECTIONS PAR LE VIH-2**

*Les pays dans lesquels ont été décrits des infections par le VIH-2 sont colorés d'orange à rouge foncé. Plus la couleur est foncée, plus le nombre de cas décrits est important. (Figure reproduite de Visseaux et al., 2016.)*

### 3. Structure et organisation génomique des VIH

Le VIH-1 et le VIH-2 appartiennent tous deux à la famille des *Retroviridae*, à la sous-famille des *Orthoretrovirinae* et au genre *Lentivirus*. Ce sont des virus enveloppés, d'une taille d'environ 120 nm, qui contiennent deux brins d'ARN linéaires de polarité positive, coiffés en 5' et polyadénylés en 3'. Leurs protéines sont nommées d'après leur poids moléculaire en kilo dalton. Ces deux rétrovirus possèdent chacun deux protéines d'enveloppe : la glycoprotéine de surface (gp120 et gp105 pour le VIH-1 et VIH-2, respectivement) et la glycoprotéine transmembranaire (gp41 pour le VIH-1 et gp35 pour le VIH-2) (Figure 3).

Ces deux virus possèdent une enzyme virale, la Transcriptase Inverse (TI), qui permet la réplication de l'ARN viral par le biais d'un intermédiaire ADN viral double brin, ce qui les range dans la classe VI de Baltimore. Cet ADN double brin est capable de s'intégrer dans le génome des cellules hôtes grâce à une autre enzyme virale, l'intégrase, ce qui permet l'établissement d'un réservoir chez les sujets infectés. Le génome viral intégré peut rester à l'état latent ou être réactivé, et enclencher ainsi un nouveau cycle de réplication.



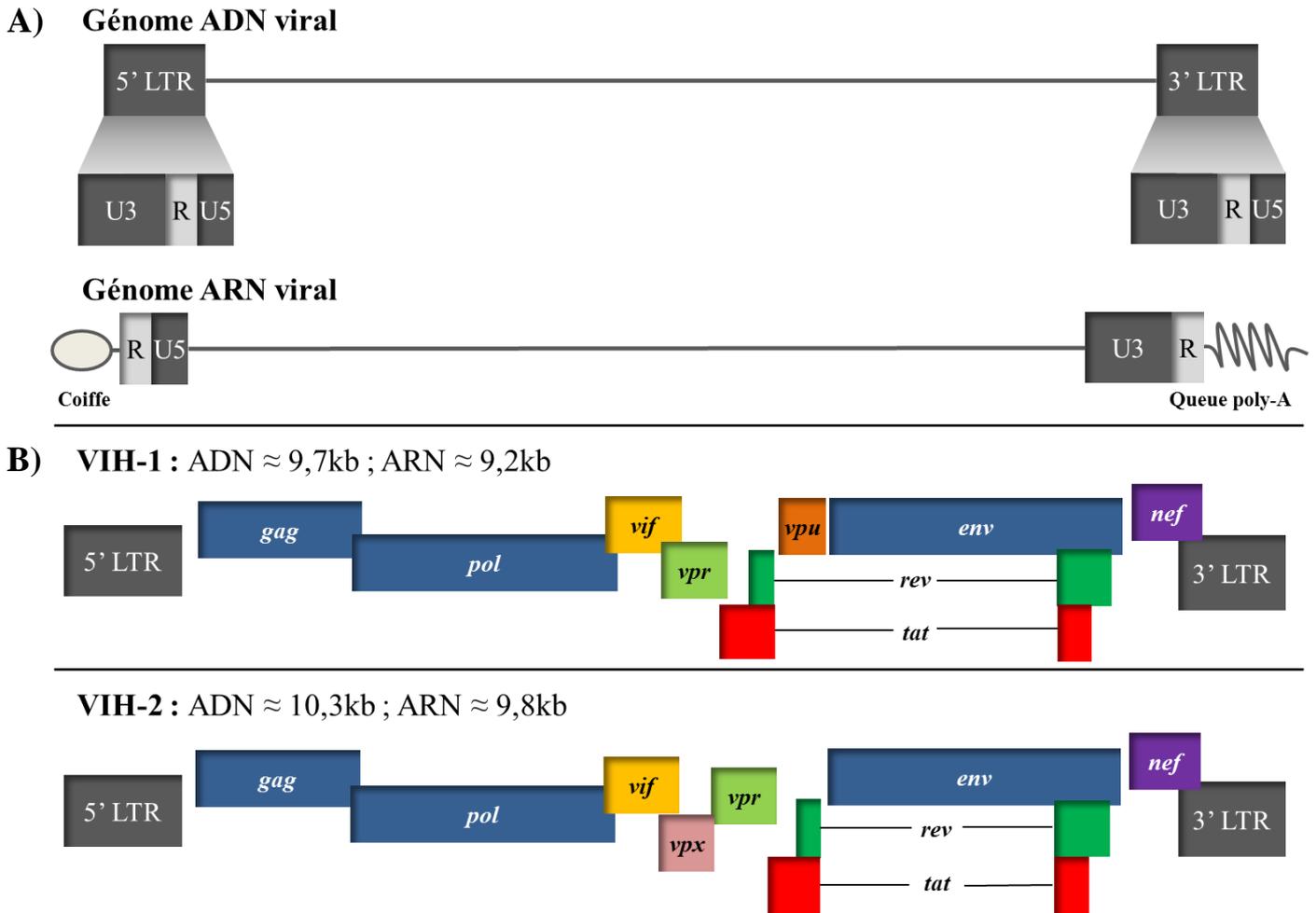
**FIGURE 3 : STRUCTURES DU VIH-1 ET DU VIH-2.**

Schéma des structures des virions du VIH-1 et du VIH-2 avec en bleu les abréviations des protéines du VIH-1 et, en rouge, celles du VIH-2. (Figure adaptée d'après B. Visseaux)

Abréviation : P : protéine et gp : glycoprotéine.

Ces virus partagent une organisation génomique similaire aux autres rétrovirus (Figure 4-A). Une région Long Terminal Repeat (LTR), dupliquée aux deux extrémités du génome, encadre les régions codantes du génome viral. Les LTR des rétrovirus varient en taille (de 300 à 1700 paires de bases) mais sont toujours subdivisés en 3 régions : U3, R et U5. Dans le génome à ARN, le LTR est partiel. En effet, il ne comprend que les sous-régions R et U5 en 5', et U3 et R en 3'.

Entre les deux régions LTR des VIH, se trouvent les gènes *gag*, *pol* et *env*, ainsi que des gènes codants des protéines de régulation (Tat et Rev) et des protéines accessoires : Nef, Vpr, Vif (communes aux deux VIH), Vpx (retrouvée uniquement chez le VIH-2) et Vpu (retrouvée uniquement chez le VIH-1). Le gène *gag* code pour les protéines internes (protéines de la nucléocapside, de la capside et de la matrice, aussi appelées NC, CA et MA, respectivement) tandis que le gène *pol* code pour les enzymes virales suivantes : l'intégrase, la TI et la protéase (Figure 4-B).



**FIGURE 4 : REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DES GENOMES DU VIH-1 ET DU VIH-2.**

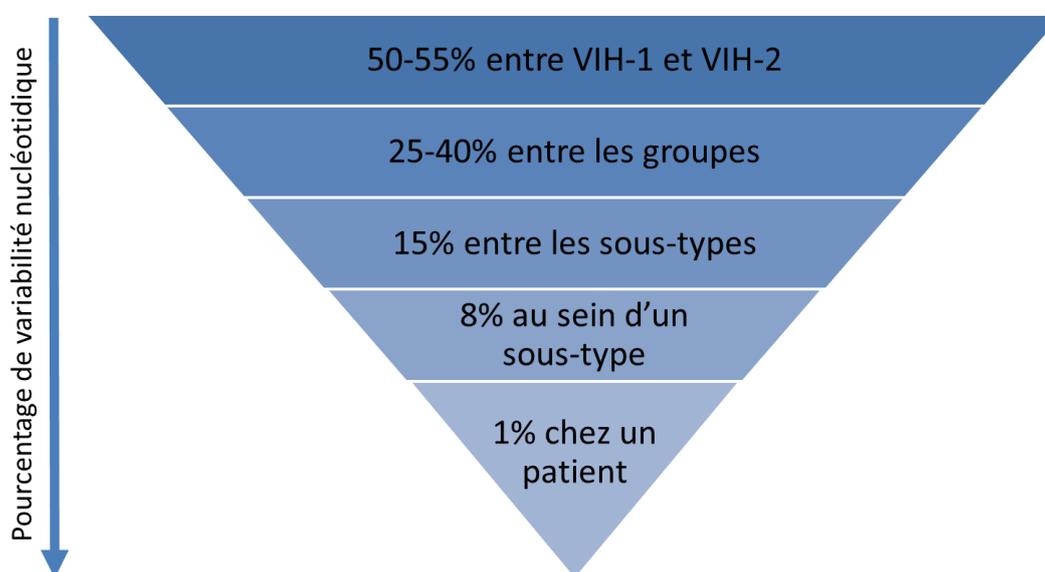
A) Organisation générale des génomes à ARN et à ADN des rétrovirus. B) Organisation génomique du VIH-1 et du VIH-2, avec leurs 3 cadres de lecture et représentation des différentes régions codantes en couleur.

## 4. Origines et variabilité des VIH

Dès l'isolement des premières souches de VIH, la variabilité importante des VIH a été remarquée et elle a été largement étudiée depuis (Clavel et al., 1986b; Li et al., 2015) (Figure 5). Il a d'abord été observé qu'en dépit de nombreuses similitudes structurales, les VIH-1 et VIH-2 ne possèdent qu'une faible homologie dans leurs séquences nucléotidiques : 60% pour les régions les plus conservées (*gag*, *pol*) et 30 à 40% pour les régions plus diverses (*env*, LTR) (Clavel et al., 1986b; Guyader et al., 1987).

Il a donc été décidé de classer les virus en groupes viraux mais également en sous-types (Robertson et al., 2000). Ainsi, le VIH-1 fut subdivisé en 4 groupes : M, N, O et P. Le groupe M, pour « Major », correspond au premier groupe identifié, celui qui est responsable de la pandémie mondiale. Le groupe M est subdivisé en 9 sous-types (notés de A à K, à l'exception de E et I). Les groupes O (pour « Outlier »), N (pour « Non-M, Non-O ») et P ont été identifiés ultérieurement (De Leys et al., 1990; Plantier et al., 2009a; Simon et al., 1998). Le VIH-1 de groupe O n'est endémique qu'au Cameroun, ce groupe viral ayant peu diffusé en dehors de ce pays (Mourez et al., 2013). Les infections par des VIH-1 de groupe N ou P sont rarissimes, une dizaine de cas pour le groupe N et deux pour le groupe P, chez des patients d'origine camerounaise principalement.

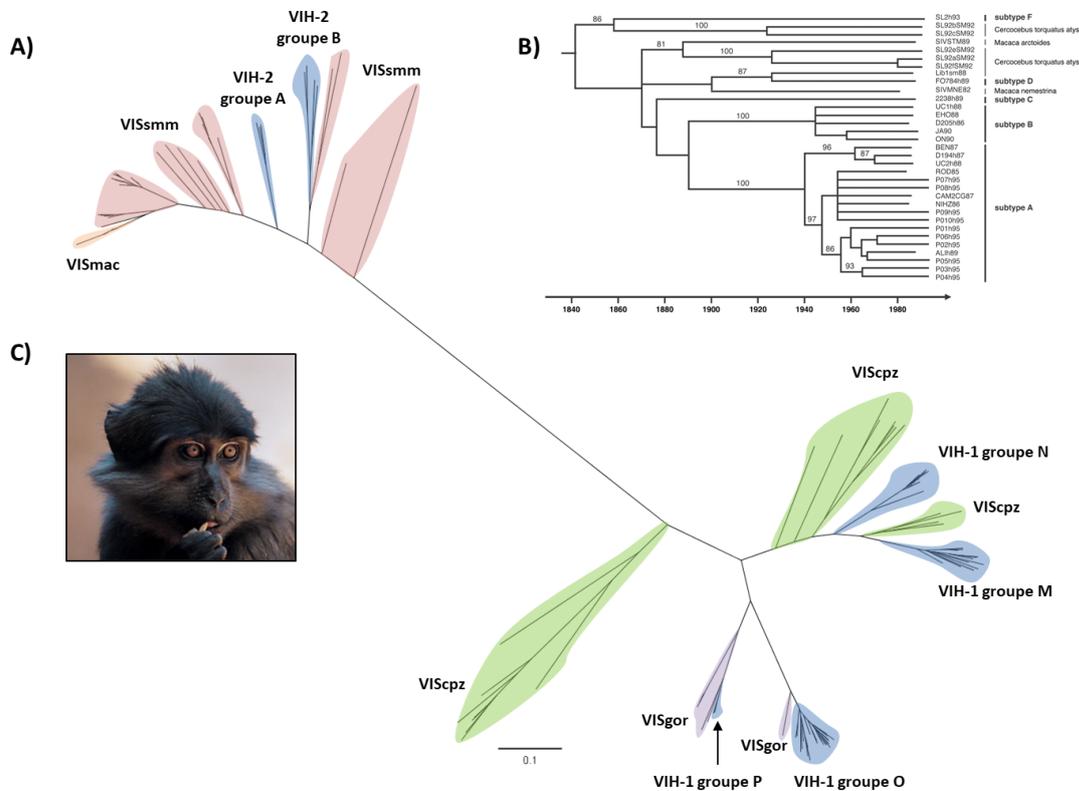
Les VIH-2 sont, eux, séparés en 9 groupes (de A à I). Seuls les groupes A et B du VIH-2 sont devenus épidémiques, les autres groupes ne comprenant qu'un ou deux individu(s) et correspondant à des événements indépendants de transmission des Virus de l'Immunodéficience Simienne (VIS) du sooty mangabey à l'Homme (Faria et al., 2012; Lemey et al., 2003).



**FIGURE 5 : VARIABILITE AU SEIN DES VIH.**

*Pourcentage de différence des séquences nucléotidiques au sein des VIH, d'après des données issues de Clavel et al., 1986b et Li et al., 2015.*

L'étude phylogénétique des VIH et des VIS identifiés dans différentes espèces de primates a permis de déterminer que les VIH ont des origines diverses selon les types et groupes viraux (Figure 6-A). Les groupes M et N du VIH-1 sont ainsi issus de transmission du VIS du chimpanzé (VIScspz) à l'Homme tandis que les groupes O et P du VIH-1 proviennent du VIS du gorille (VISgor) (Huet et al., 1990; Sharp and Hahn, 2011). Tous les groupes du VIH-2 dérivent du VIS du sooty mangabey (VISsmm), un primate de petite taille présent en Afrique de l'Ouest (Apetrei et al., 2005; Hirsch et al., 1989) (Figure 6-B et C). Historiquement, le VISmac isolé de macaques rhésus était décrit comme le VIS le plus proche du VIH-2 mais il s'agit en fait d'un VISsmm transmis accidentellement de sooty mangabey à des macaques dans un centre de primatologie américain (Apetrei et al., 2005).

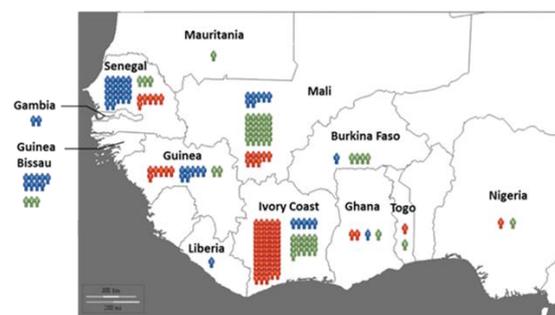


**FIGURE 6 : PHYLOGENIE DES VIH.**

A) L'arbre phylogénétique a été construit par la méthode du maximum de vraisemblance avec 1000 répliques (« bootstraps »), sous un modèle General Time Reversible avec  $\gamma = 4$ , avec le logiciel IQTree v1.6.11, et visualisé avec le logiciel FigTree v1.4.3. Les séquences analysées phylogénétiquement correspondent à toutes les séquences de la TI des VIS et VIH disponibles sur la base de données du Los Alamos National Laboratory, qui recense et vérifie toutes les séquences rétrovirales. La longueur de branches équivalent à une distance génétique de 0,1 substitution par nucléotide est indiquée en bas de la figure. B) Arbre phylogénétique daté (d'après Lemey et al., 2003). C) Le sooty mangabey (*Cercocebus atys*) est un petit primate habitant les forêts d'Afrique de l'Ouest, dont la forêt Taï au Sud-Ouest de la Côte d'Ivoire. La majorité des groupes du VIH2 est proche phylogénétiquement de SIVsmm isolés de sooty mangabey vivant dans la forêt Taï (Santiago et al., 2005).

Chaque groupe du VIH-1 et du VIH-2 correspond ainsi à un événement différent de transmission des primates vers l'Homme. La date d'introduction de ces virus dans l'espèce humaine diffère selon les groupes (Sharp and Hahn, 2011). Le VIH-1 de groupe M daterait ainsi du début des années 1900, dans la région de Kinshasa (République Démocratique du Congo). Les deux groupes épidémiques du VIH-2 seraient eux originaires de la forêt Tai, à l'ouest de la Côte d'Ivoire, avec une date d'introduction estimée aux années 1945-1950, le groupe A ayant davantage diffusé vers la Guinée Bissau par la suite (Lemey et al., 2003) (FIGURE 6-B). Une étude récente (Visseaux et al., 2016b) a permis de mettre en évidence l'existence de deux sous-types du groupe A : A1 et A2 (représentés respectivement par les souches de référence « ROD » et « BEN »), résultant d'effets fondateurs distincts dans des zones géographiques différentes (Figure 7).

	Sous-type A1	Sous-type A2	Groupe B
Séquences sur bases de données françaises	141 (40,4%)	87 (24,9%)	121 (34,7%)
Séquences accessibles publiquement sur bases de données mondiales	481 (85,1%)	41 (7,3%)	43 (7,6%)
Total	622 (68,1%)	128 (14,0%)	164 (17,9%)



**FIGURE 7 : DIVERSITE DES VIH-2.**

A) Distribution des souches VIH-2 séquencées à travers le monde. B) Distribution des différents groupes et sous-types du VIH-2 en Afrique de l'Ouest. Les patients infectés par un VIH-2 apparenté au groupe A sous-type A1 sont représentés en bleu, ceux infectés par un sous-type A2 en vert et ceux infectés par un virus du groupe B en rouge. (Figure adaptée d'après Visseaux et al., 2016b)

Ces deux rétrovirus partagent une autre caractéristique fondamentale : leur grande variabilité. En effet, les TI du VIH-1 et du VIH-2 commettent de nombreuses erreurs durant la réplication. Ainsi, le taux d'erreur de la TI de ces deux rétrovirus est estimé à une erreur tous les 10 000 nucléotides, ce qui correspond approximativement à 1 substitution par génome et par cycle. De plus, ces deux TI ne possèdent pas d'activité correctrice de cette génération d'erreurs. Le fort taux de réplication des VIH (de l'ordre de  $10^9$  à  $10^{10}$  virions produits par jour chez un individu infecté, non traité par antirétroviraux (ARV)) amplifie ce nombre d'erreurs. Cette variabilité nucléotidique est à l'origine de l'existence de quasi-espèces virales au sein des individus infectés.

De plus, les recombinaisons sont fréquentes du fait de la présence de deux ARN simple brin dans le virion. Lorsqu'une cellule est infectée par deux virus parentaux différents, que ces deux virus arrivent à s'intégrer au génome de la cellule hôte et à se répliquer au sein de celle-ci, certains des virions produits pourront être composés d'un ARN simple brin issu de chaque virus parental. Or, lors de la rétrotranscription, la TI du VIH a la particularité de fréquemment sauter d'un brin d'ARN à l'autre, changeant de modèle pour la synthèse de l'ADN viral et générant donc un ADN viral double brin recombinant. Des études phylogénétiques permettent de mettre en évidence les points de recombinaison dans le génome recombinant, qui correspondent aux zones où la TI est passé d'un brin à l'autre. Des points chauds de recombinaison dans Gag et Pol sont décrits pour les VIH-1 (Smyth et al., 2014).

Ces sauts de la TI facilitent l'apparition de virus recombinants dans les cellules infectées par des VIH de différents groupes ou sous-types. Ces virus recombinants pourront ensuite être transmis à d'autres individus. A ce jour, près de 100 formes recombinantes circulantes, ou CRF (« Circulating Recombinant Form ») ont été décrites. Un CRF est défini par l'existence d'au moins 3 patients infectés par des souches virales présentant les mêmes points de recombinaison, sans relation épidémiologique entre ces patients, prouvant ainsi la diffusion de ce recombinant. Parmi les CRF du VIH-1, l'un d'entre eux a pris une importance toute particulière dans l'épidémiologie française où il est devenu l'un des sous-types majoritaires, le CRF02\_AG, issu de la recombinaison de VIH-1 des groupes A et G. Des formes recombinantes uniques, ou URF (« Unique Recombinant Form »), sont fréquemment découvertes.

Les virus recombinants décrits pour le VIH-2 sont rares. Le seul CRF formellement identifié est un recombinant A/B isolé de 3 patients au Japon, similaire à une souche recombinante dénommée « 7312A » qui avait été identifiée en 1990 en Côte d'Ivoire (Gao et al., 1994; Ibe et al., 2010) (Figure 8). Les 3 patients présentaient des charges virales (CV) plasmatiques élevées (25 000 à 680 000 copies/mL) et un faible nombre de cellules CD4 (1 à 241/mm<sup>3</sup>).



**FIGURE 8 : ORGANISATION GENOMIQUE DES DEUX FORMES RECOMBINANTES DECRITES DU VIH-2.**

*Les séquences appartenant au groupe A sont représentées en bleu et celles du groupe B en rouge. Cette forme recombinante circulante est la seule décrite à ce jour pour le VIH-2. (Figure adaptée d'après Visseaux et al, 2016).*

Des facteurs cellulaires peuvent également être à l'origine de variations dans les séquences nucléotidiques du VIH. C'est le cas des protéines de la famille des APOBEC (« Apolipoprotein B mRNA-editing, catalytic peptide »), en particulier APOBEC3G et APOBEC3F qui, par leur activité enzymatique de déamination des cytidines, introduisent des transitions G vers A sur le brin complémentaire (Harris and Liddament, 2004). Le phénomène d'hypermutation des séquences rétrovirales fait partie de l'immunité innée de la cellule vis-à-vis des infections par des rétrovirus et d'autres virus. Ces virus dits « hypermutés » sont classiquement considérés comme défectifs (c'est-à-dire non capables d'induire un nouveau cycle de réplication virale) car les hypermutations induites vont modifier la séquence protéique voire introduire des codons stops induisant un arrêt précoce de la synthèse protéique. Les VIH peuvent contrecarrer l'effet des enzymes APOBEC3G et 3F par le biais de la protéine virale Vif qui va induire la dégradation des protéines APOBEC par le protéasome (Sheehy et al., 2003).

## 5. Conséquences de la variabilité génétique des VIH

La diversité génétique consécutive au sein des VIH a des conséquences importantes, tant sur le plan clinique que biologique. Ainsi, certains VIH présentent des résistance(s) naturelle(s) à certains traitements ARV. En effet, ces VIH présentent des mutations de polymorphisme sur des sites des enzymes de la réplication virale (TI, protéase, intégrase) ciblées par le traitement ARV, ces mutations leur conférant alors une résistance intrinsèque à un ou plusieurs ARV.

Cela est dû notamment au fait que la majorité des ARV ont été développés en étudiant leur action antirétrovirale sur des souches de VIH-1 du groupe B, le groupe majoritaire dans les pays occidentaux où étaient menées les premières études. Ainsi, les VIH-2 sont tous naturellement résistants aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI), ainsi qu'à l'enfuvirtide, l'inhibiteur de fusion, et peu sensibles à certains inhibiteurs de protéase (IP) (Desbois et al., 2008; Ntemgwa et al., 2009; Witvrouw et al., 2004). Le VIH-1 de groupe O est également fréquemment résistant aux INNTI, notamment du fait du polymorphisme 181C dans la TI (Descamps et al., 1997; Tuailon et al., 2004).

Par ailleurs, certaines mutations de résistance apparaissent préférentiellement dans certains groupes viraux. Par exemple, la mutation K65R est plus fréquemment sélectionnée, après un échec virologique sous traitement par certains inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), chez les patients infectés par un VIH-1 du sous-type C. Ce sous-type est celui majoritaire en Afrique du Sud notamment. Cette mutation confère une résistance à de nombreux INTI (Invernizzi et al., 2009). Le VIH-2 sélectionne également plus rapidement que le VIH-1 des mutations de résistance aux différents ARV.

De plus, les anticorps neutralisants synthétisés chez les patients infectés et ciblant les glycoprotéines du VIH ont une efficacité limitée car les gènes de ces protéines d'enveloppe mutent très rapidement, permettant ainsi aux VIH d'échapper à la réponse immunitaire (Wei et al., 2003a). Il s'agit d'un des mécanismes qui complique fortement la recherche vaccinale contre les VIH.

Les différences notables de virulence entre le VIH-1 et le VIH-2 ont rapidement été observées, tandis que l'existence de ces différences au sein des VIH-1 ou des VIH-2 est encore discutée. Ainsi, une première étude avait mise en évidence une progression plus rapide vers le stade SIDA des femmes infectées par un VIH de sous-type non-A (Kanki et al., 1999). Plusieurs études menées sur de larges cohortes ont estimé à environ un tiers la part de virulence due au virus, le reste étant dû à des facteurs génétiques de l'hôte (Fraser et al., 2014). D'autres études ont montré une plus grande pathogénicité du VIH-1 de sous-type D, au Royaume-Uni, dans les pays sub-sahariens et en Ouganda (Easterbrook et al., 2010; Venner et al., 2016).

Des travaux sont en cours afin d'analyser une éventuelle différence de virulence entre les VIH-2 du groupe A et ceux du groupe B. Ainsi, le CRF du VIH-2 semble plus virulent, les charges virales des patients infectés par celui-ci étant très élevées (de l'ordre de  $5 \log_{10}$  c/mL d'ARN du VIH-2) (Ibe et al., 2010).

La diversité génétique au sein de la population virale augmente lors des premières années de l'infection par le VIH chez un patient non traité par ARV, tout comme la divergence (c'est-à-dire la distance génétique par rapport à la souche virale ayant infecté le patient) (Shankarappa et al., 1999). L'impact de cette augmentation de la diversité virale sur la progression de la maladie est encore discuté.

L'une des conséquences bien connue de la diversité génétique des VIH est sa répercussion sur le diagnostic des infections par le VIH. Elle a notamment été à l'origine de faux négatifs sur les premières générations de sérologie VIH (Plantier et al., 2009b). Cette variabilité génétique est aussi impliquée dans la difficulté de mise au point des techniques d'amplification par réaction de polymérase en chaîne (PCR) amplifiant avec succès tous les groupes viraux. Ainsi, plusieurs techniques commerciales de quantification des charges virales plasmatiques du VIH-1 ne détectent pas ou sous-quantifient le groupe O.

Les techniques de quantification du VIH-2 consistent en une PCR duplex, utilisant un couple d'amorces spécifiques au groupe A et un autre pour le groupe B pour contourner la diversité génétique importante du VIH-2, supérieure à ce qui est observé entre deux sous-types du VIH-1 (Damond et al., 2002). Les mêmes difficultés sont retrouvées lors des génotypages de résistance des différents VIH, plusieurs couples d'amorces sont souvent nécessaires pour chaque gène d'intérêt afin de réussir à amplifier le virus de certains patients ayant des mutations sur les sites complémentaires de certaines amorces.

## 6. Cycle du VIH

Le cycle du VIH au sein de sa cellule cible peut schématiquement être divisé en 6 étapes : 1) l'entrée (attachement et fusion), 2) la décapsidation et la rétrotranscription, 3) l'intégration, 4) la transcription du génome proviral, 5) la traduction des ARN messagers et l'assemblage des protéines virales et 6) le bourgeonnement et la maturation des particules virales. Ce cycle est court (24 à 48 heures) et est réalisé en détournant la machinerie cellulaire, le virus exploitant des facteurs cellulaires pour sa réplication, tout en contrecarrant des facteurs de restriction antirétrovirale exprimées par les cellules grâce à ses protéines virales.

## 6.1. Entrée dans les cellules cibles

Le tropisme du VIH-1 pour les cellules exprimant la molécule de surface CD4 a été établi dès le début de l'épidémie (Dalglish et al., 1984). Les principales cellules cibles du VIH sont donc les lymphocytes T CD4+ mais également les monocytes et les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules de Langerhans, ainsi que les cellules de la microglie du système nerveux central et les cellules dendritiques folliculaires. Le VIH se multiplie également dans les syncytiotrophoblastes.

Le mécanisme d'entrée du virus implique la liaison du récepteur cellulaire CD4 au « CD4 binding site » situé sur le trimère de glycoprotéines de surface (gp120 et gp105 pour le VIH-1 et le VIH-2, respectivement). Cette interaction entraîne un changement de conformation du trimère qui va alors exposer la boucle variable V3 de la glycoprotéine de surface (Shaik et al., 2019). Cette boucle V3 contient le site de liaison au corécepteur cellulaire CCR5 et/ou CXCR4, selon le tropisme du virus. Le peptide de fusion (hétérodimère de la glycoprotéine transmembranaire, gp41 ou gp36) qui était jusqu'alors masqué par la gp120 va ensuite s'insérer dans la membrane cytoplasmique, permettant la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire, et la formation d'un pore de fusion au travers duquel le contenu du virion passera dans le cytoplasme de la cellule infectée.

Les cellules dendritiques et les cellules de Langerhans, deux types de cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T, jouent un rôle essentiel dans la physiopathologie de l'infection virale. Les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques DC-SIGN+ sont présentes dans la muqueuse génitale et sont les premières cellules immunitaires en contact avec le virus. Les cellules de Langerhans joueraient principalement un rôle de défense contre l'infection, en capturant le virus par le biais de leur molécule de surface, la langerine, internalisant alors le virus et le dégradant (de Witte et al., 2007). A l'inverse, les cellules dendritiques DC-SIGN+ capturent le virus avec leur molécule de surface DC-SIGN, ce qui facilite à la fois l'infection de la cellule dendritique et la transmission en trans du VIH, c'est-à-dire la transmission du virus à une autre cellule, sans infecter la cellule dendritique (Geijtenbeek et al., 2000). Il peut néanmoins également arriver que des cellules de Langerhans soient infectés par le VIH. Après avoir migré vers les ganglions lymphatiques, au lieu de présenter les antigènes viraux et d'initier une réponse lymphocytaire T, ces cellules vont infecter les lymphocytes T et permettre la dissémination du virus dans l'organisme. Ces deux types cellulaires exprimant

majoritairement le corécepteur R5, cela explique la transmission préférentielle par voie sexuelle des virus de tropisme R5 (Witte et al., 2008).

Au cours de l'infection à VIH, le tropisme des virus évolue chez les personnes infectées, d'un tropisme R5 en début d'infection vers un tropisme X4 ou mixte dans les infections à un stade avancé. Classiquement, les virus à tropisme CCR5 sont dits à tropisme macrophagique et ceux à tropisme CXCR4 ou mixte à tropisme lymphocytaire.

Il est à noter qu'une mutation du corécepteur CCR5 est décrite, la mutation CCR5 $\Delta$ 32 qui correspond à une délétion de 32 paires de bases entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré dans la séquence protéique et la rétention dans le réticulum endoplasmique de la protéine mutée. Cette mutation est retrouvée à des fréquences différentes à travers le monde avec une sur-représentation en Europe, notamment en Europe du Nord, et entraîne une résistance à l'infection *in vivo* et *in vitro* chez les patients homozygotes pour cette mutation (Liu et al., 1996; Martinson et al., 1997; Michael et al., 1997). Néanmoins, des cas d'infections par des virus à tropisme X4 ou mixte ont été décrits chez des patients porteurs de l'allèle CCR5 $\Delta$ 32 (Henrich et al., 2015).

Deux cas de « guérison » d'infections par le VIH sont décrits dans la littérature (Gupta et al., 2019; Hütter et al., 2009). Dans les deux cas, les patients ont reçu des greffes de cellules souches hématopoïétiques d'un donneur homozygote pour cette mutation CCR5 $\Delta$ 32 pour traiter leur hémopathie, et aucun virus ou provirus n'a été isolé dans leurs prélèvements depuis plusieurs années, malgré l'arrêt de tout traitement antirétroviral.

Un autre corécepteur, CXCR6, anciennement appelé BONZO, serait également largement utilisé par le VIH-2 et certains SIV (Blaak et al., 2005; Mörner et al., 1999; Owen et al., 1998; Wetzel et al., 2018). Récemment, une étude a montré que l'expression de ce CXCR6 différait selon les sous-populations lymphocytaires avec une plus faible expression dans les cellules centrales mémoires que dans les cellules transitionnelles mémoires (Samri et al., 2019). Cette observation pourrait expliquer pourquoi le réservoir du VIH-2 est majoritairement présent dans les cellules transitionnelles mémoire et non dans les cellules centrales mémoires comme décrit dans l'infection par le VIH-1 (Chomont et al., 2009).

Un autre mécanisme d'entrée du virus est celui du contact cellule-cellule, notamment par le biais des synapses virologiques établies entre un lymphocyte T infecté et un lymphocyte T non infecté ou bien entre une cellule dendritique infectée et un lymphocyte T non infecté.

Cette voie d'infection serait plus efficace que la libération de virions dans le milieu extracellulaire.

## 6.2. Décapsidation et rétrotranscription

Une fois que la fusion des membranes cellulaire et virale a eu lieu, la capsid virale qui contient les deux brins d'ARN viral et de nombreuses protéines virales va se retrouver dans le cytoplasme de la cellule. La capsid virale est de forme conique et est formée par un assemblage de pentamères de la protéine virale de capsid (p24 pour VIH-1, p26 pour VIH-2). Le désassemblage de la capsid virale est indispensable à l'initiation de la rétrotranscription du génome viral.

Un facteur de restriction cellulaire, TRIM5 $\alpha$  ("tripartite motif-containing 5 $\alpha$ "), peut accélérer la décapsidation en se fixant à la capsid virale et en la déstabilisant, exposant les acides nucléiques viraux et stimulant donc l'immunité innée (Stremlau et al., 2004). Cette action antirétrovirale est très limitée pour le VIH-1 mais elle est jusqu'à 9 fois importante pour le VIH-2 et est liée à la séquence de la capsid virale (Takeuchi et al., 2013; Ylinen et al., 2005).

La rétrotranscription débute rapidement après la décapsidation, cette étape est orchestrée par la TI virale. La TI est un hétérodimère composé des protéines p66 et p51 (pour le VIH-1). La protéine p66 possède deux sites actifs, l'un en partie N-terminale avec une activité ADN-polymérase ADN- et ARN-dépendante et l'autre en partie C-terminale avec une activité RNase H lui permettant de dégrader l'ARN des hybrides ARN/ADN produits lors de la rétrotranscription.

La TI vient se fixer sur le brin d'ARN, sur la séquence PBS (Primer Binding Site) située immédiatement en aval de la région LTR 5' (Figure 9-A) et débute la synthèse d'un ADN de polarité négative (Figure 9-B). Une fois arrivée à la région R du LTR5', la TI effectue son premier saut et va se fixer sur le LTR en 3', par hybridation des séquences R, et reprend la synthèse de l'ADN viral (Figure 9-C et D). En parallèle, la TI dégrade l'ARN viral en 5' via son activité RNase H (Figure 9-E).

Seules deux séquences ARN riches en purine résistent à cette dégradation, le cPPT (« central PolyPurine Tract ») et le 3'PPT. Ces deux séquences servent alors d'amorces pour la synthèse du brin d'ADN de polarité positive, générant ainsi un ADN complémentaire comprenant la région 3' unique précédant le LTR 3', le LTR 3' complet et une région 5' unique (celle

précédant la séquence PBS) (Figure 9-F). Peu après, la TI dégrade les dernières séquences ARN : les PPT et la séquence PBS (Figure 9-G).

En parallèle, le génome ADN double brin va se circulariser et, grâce à la complémentarité des deux brins sur la région 5' unique (région précédant la séquence PPBS), la TI peut poursuivre la synthèse du brin d'ADN de polarité positive (Figure 9-H). La synthèse de ce brin de polarité positive s'arrête au niveau de la séquence CTS (Central Termination Sequence) (Figure 9-I). La TI va alors effectuer son deuxième saut pour se fixer sur l'ADN de polarité négative et entamer la synthèse du LTR 5' (Figure 9-J), permettant d'obtenir deux brins d'ADN complémentaires, sauf sur une courte région proche du CTS où il y a un recouvrement d'environ 100 nucléotides (Figure 9-K) (Charneau et al., 1994).

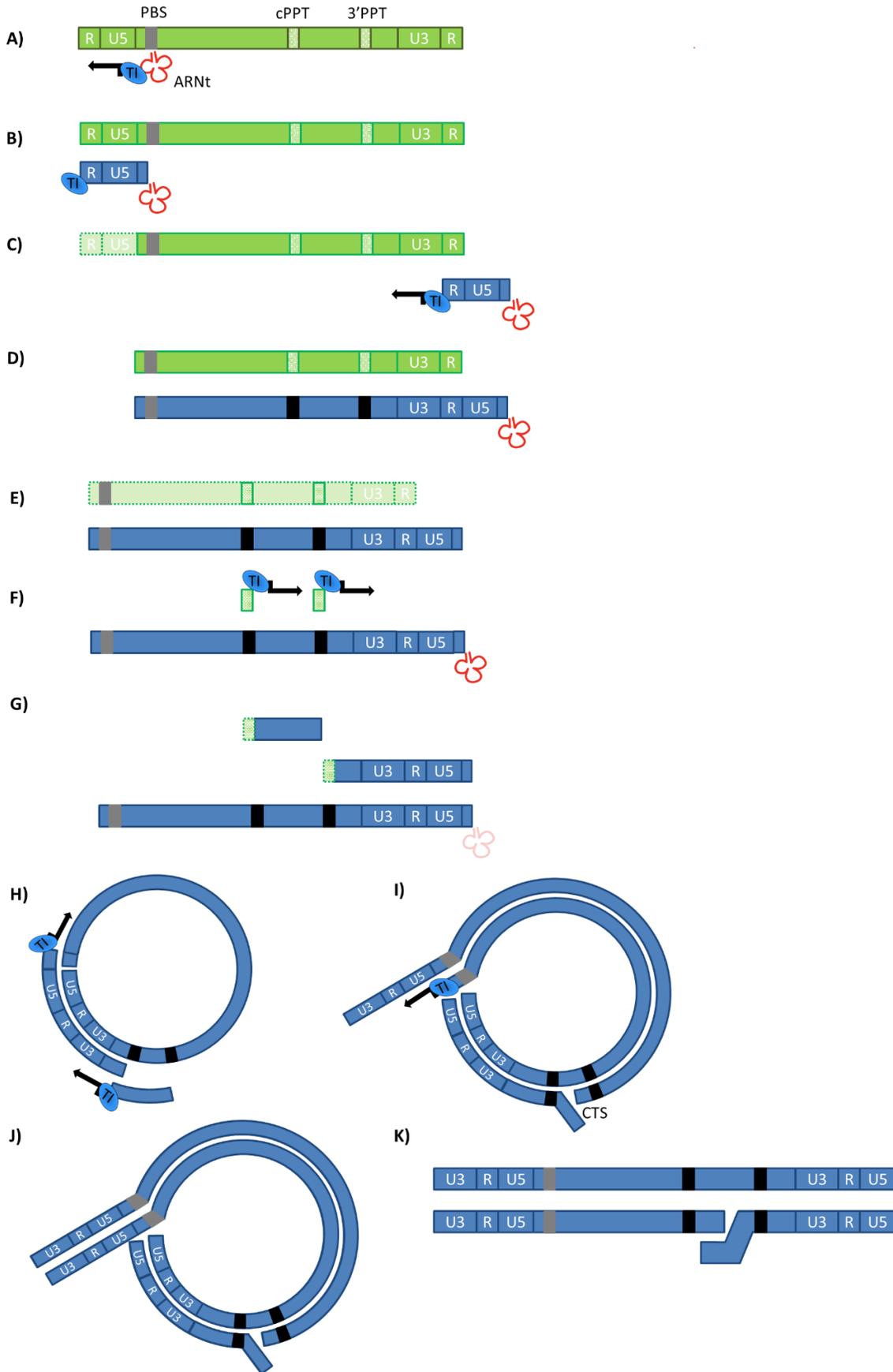
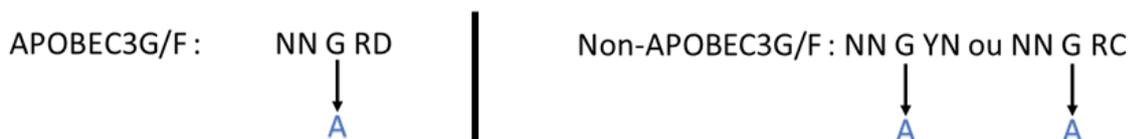


FIGURE 9 : RETROTRANSCRIPTION DES VIH

Représentation schématique de la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN viral double brin par la transcriptase inverse. Les ARN viraux sont représentés en vert, les ARN viraux en bleu. (D'après (Charneau et al., 1994)

Abréviations : ARNt : ARN de transfert ; CTS : « Central Termination Sequence » ; PBS : « Primer Binding Site » ; PPT : « Poly Purine Tract » ; TI : transcriptase inverse.

Deux facteurs de restriction cellulaire de cette étape de rétrotranscription sont décrits : les protéines cellulaires APOBEC3G/F et la protéine SAMHD1. Les protéines APOBEC3G/F sont des protéines cellulaires qui vont être intégrées aux virions nouvellement formés et qui vont induire des mutations G vers A lors de la rétrotranscription, rendant potentiellement les provirus porteurs de ces mutations incapables de se répliquer (Figure 10). C'est donc un facteur de restriction antirétrovirale qui a la particularité d'agir sur le cycle suivant d'infection. La protéine Vif des VIH dégrade les protéines APOBEC3G/F (Sheehy et al., 2002).



**FIGURE 10 : DESCRIPTION DU CONTEXTE NUCLEOTIDIQUE D'EDITION PAR APOBEC3G/F.**

APOBEC3G et 3F sont des protéines cellulaires avec une activité cytidine déaminase. Elles vont agir sur le brin d'ARN viral en transformant une déoxycytidine en déoxyuridine par déamination. Par convention, le contexte APOBEC est regardé sur le brin d'ADN complémentaire, où est visible une mutation G vers A. Ces deux protéines vont préférentiellement induire une transition G vers A sur des guanines suivies d'un R (G ou A) puis d'un D. Les contextes non-APOBEC3G/F sont donc tous les autres environnements nucléotidiques.

Abréviations : A : adénosine, C : cytosine, D : tout nucléotide sauf cytosine, G : guanine, T : thymine et R : guanine ou adénosine.

La protéine SAMHD1 déplete le pool intracellulaire en dNTP qui sont indispensables pour la synthèse des acides nucléiques, limitant voire bloquant la rétrotranscription du génome viral (Hrecka et al., 2011; Laguette et al., 2011). Son action est contrecarrée par la protéine Vpx du VIH-2 qui se fixe à SAMHD1 et à un complexe ubiquitine ligase, entraînant la dégradation de SAMHD1 par le protéasome. Le VIH-1 ne possède pas de protéine Vpx, ce qui expliquerait la difficulté du VIH-1 à se répliquer dans les cellules avec un faible taux intracellulaire de dNTP tels que les macrophages ou les cellules dendritiques (Hrecka et al., 2011). Dans un modèle

expérimental de déplétion de SAMHD1 par une protéine Vpx de VIH-2 ou de VISmac, les cellules dendritiques peuvent être infectées par le VIH-1, l'activation immunitaire étant dépendante de l'interaction de la cyclophiline A cellulaire avec la capsid virale (Manel et al., 2010). La présence de Vpx dans le génome des VIH-2 ne leur permet néanmoins pas d'infecter efficacement les cellules dendritiques dérivées de monocytes, cela n'étant a priori pas dû à SAMHD1 mais plutôt à un défaut dans le mécanisme d'entrée du virus (Chauveau et al., 2015).

### 6.3. Complexe de pré-intégration et intégration

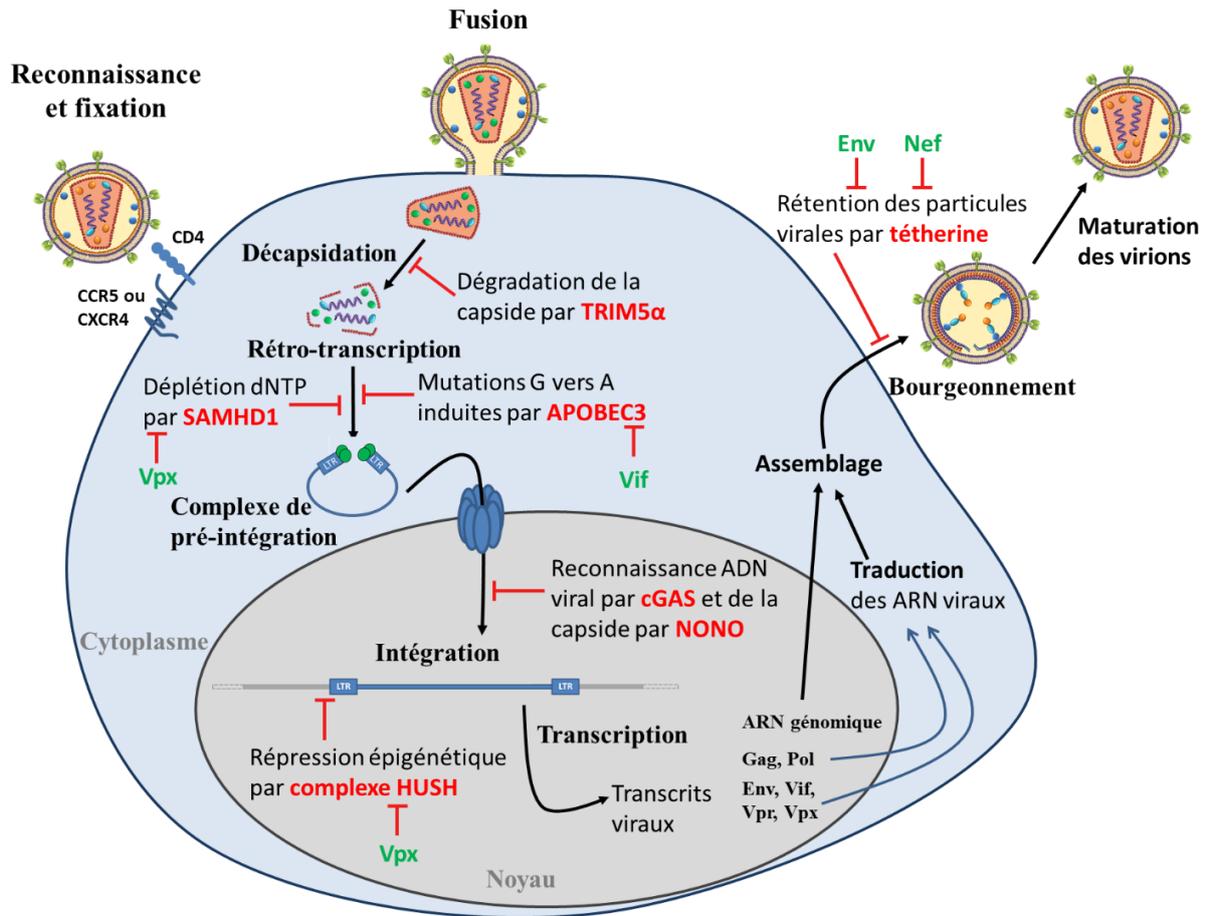
Après la synthèse du double brin d'ADN, il va y avoir formation d'un complexe de pré-intégration qui comprend l'ADN viral, les protéines de capsid et de l'intégrase du virus, ainsi que des protéines cellulaires. Le mécanisme de formation du complexe de pré-intégration (ou PIC, pour « pre-integration complex ») est mieux documenté pour les VIH-1 que pour les VIH-2. Ce PIC est fondamental puisque c'est lui qui confère la capacité aux VIH d'infecter les cellules, quel que soit le moment du cycle cellulaire et non pas uniquement les cellules en division comme les autres rétrovirus. Le PIC permet l'import nucléaire de l'ADN viral après interaction avec un NPC (« nuclear pore complex ») (Figure 11).

La capsid virale joue un rôle crucial dans l'import nucléaire de l'ADN viral puisque la protéine cyclophiline A va se fixer sur la capsid virale, induire des changements conformationnels sur la capsid virale et la rapprocher de la protéine RANBP2, située près du NPC, au niveau cytoplasmique (Lusic and Siliciano, 2017). D'autres protéines cellulaires jouent également un rôle dans l'import de l'ADN viral, dont la transportine 3 (TNPO3) impliquée dans le transport à travers le NPC, ainsi que deux protéines situées près du NPC mais au niveau nucléaire : NUP153 et CPSF6 (Brass et al., 2008; König et al., 2008). Ces deux dernières protéines semblent jouer un rôle non seulement dans l'import nucléaire mais également dans le site d'intégration de l'ADN viral au sein du génome de la cellule hôte (Lusic and Siliciano, 2017).

Dès la fin de la rétrotranscription, l'intasome se forme dans le PIC, il s'agit d'un complexe composé de l'ADN viral et d'un tétramère d'intégrases virales fixées aux extrémités de cet ADN viral (Figure 11).

L'intégrase virale possède deux activités enzymatiques : une activité de 3'-processing et une activité de transfert de brin. L'ADN viral débute par TGGA et se termine par AGCA pour les VIH-1 comme pour les VIH-2 (Compendium Los Alamos). Dans le PIC, l'intégrase va exciser deux nucléotides en 3' des deux brins de l'ADN viral, créant ainsi une extrémité 3' avec deux nucléotides puis un groupement hydroxyl libre. Une fois importé dans le noyau cellulaire, les groupements hydroxyl libres de l'ADN viral vont permettre de réaliser une attaque nucléophile au niveau du grand sillon de l'ADN de la cellule infectée et d'insérer le génome viral (Brady et al., 2009; Lusic and Siliciano, 2017). Il y a alors insertion du brin complémentaire puis réparation par les enzymes cellulaires.

L'intégration de l'ADN viral n'a pas lieu au hasard dans le génome de la cellule hôte. L'intégration se fait préférentiellement dans un ADN situé à moins d'un micron du NPC et dans l'euchromatine, une zone plus relâchée de la chromatine qui correspond généralement à une zone transcriptionnellement active, ce qui favorisera la réactivation ultérieure du génome proviral. De plus, certains motifs nucléotidiques (RYRY avec R pour purine et Y pour pyrimidine) sont privilégiés par le virus comme sites d'intégration. La sélectivité du VIH-1 pour certains motifs nucléotidiques semble dépendante de deux acides aminés de l'intégrase, S119 et R231 (Demeulemeester et al., 2014; Serrao et al., 2014).



**FIGURE 11 : CYCLE DU VIH-2 ET RÔLE DES FACTEURS DE RESTRICTION ANTIRETROVIRAUX.**

Les protéines virales sont indiquées en vert, les facteurs cellulaires de restriction antirétrovirale en rouge.

Abréviations : cGAS : « cyclic GMP-AMP cyclase » ; complexe HUSH : « human silencing hub » ; et TRIM5α : « tripartite motif-containing 5α ».

## 6.4. Réactivation des provirus et transcription

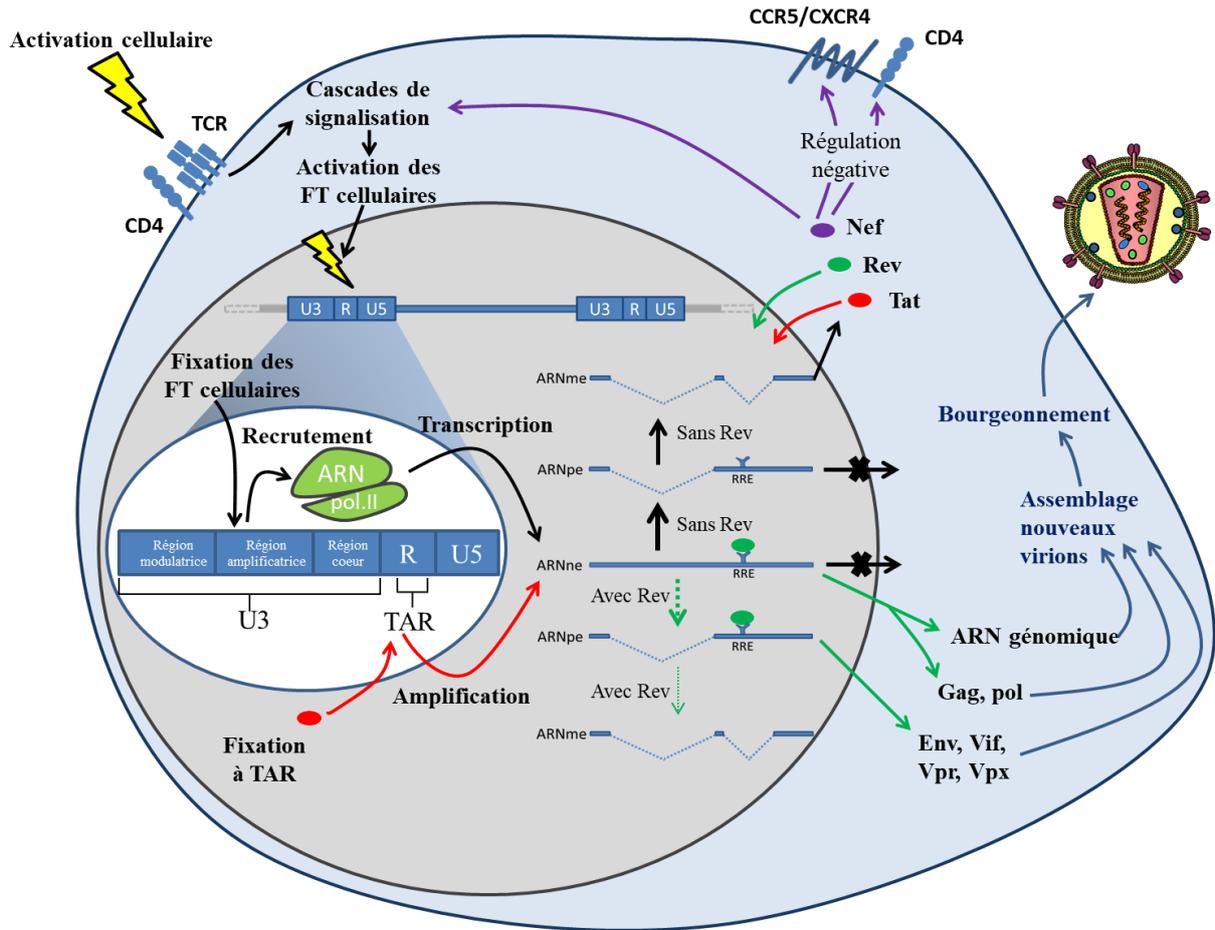
La région critique du provirus pour sa réactivation est la région LTR, qui est le promoteur du VIH. Son activation permet d’initier la transcription du génome proviral. Dans un premier temps, l’activité transcriptionnelle du LTR est faiblement activée par des FT cellulaires (NFκB, Sp1, Elf-1, etc.) qui viennent se fixer sur des sites de fixation des FT présents dans la fin de la sous-région U3 du LTR. Cela permet de recruter l’ARN polymérase II cellulaire au niveau de la « TATAA box » et d’initier la transcription à bas bruit de l’ADN viral en ARN.

Ces ARN viraux précoces sont rapidement épissés dans le noyau avant d'être exportés hors de celui-ci et traduits en trois protéines virales dites régulatrices : Tat, Rev et Nef (Figure 12).

La protéine virale Tat va transactiver le LTR en se fixant sur la région TAR (« Tat-Activated Region ») du LTR et augmente de façon exponentielle la transcription de l'ADN viral (Figure 12). Il est également décrit une transactivation des LTR par interaction des protéines virales Vpr (pour le VIH-1 uniquement) et Tat avec la protéine cellulaire Sp1 quand celle-ci est fixée sur ses sites de fixation (Pagtakhan and Tong-Starksen, 1997; Wang et al., 1995).

La protéine virale Rev va être importée dans le noyau, où elle va se fixer sur la région RRE (« Rev Recognition Element ») des ARN viraux et permettre un export plus rapide de ceux-ci, avant qu'ils ne soient multi-épissés (Pollard and Malim, 1998). Les ARN viraux retrouvés dans le cytoplasme seront alors majoritairement peu ou non-épissés. Ce passage d'une phase de production de transcrits viraux majoritairement multi-épissés à une phase de synthèse de transcrits viraux peu ou non épissés est critique pour la réplication virale.

La protéine virale Nef va réguler négativement l'expression à la surface de la cellule infectée du récepteur CD4, des corécepteurs CCR5 et CXCR4, ainsi que de la tetherine (Laguette et al., 2010). Cela permet d'éviter une super-infection de la cellule par les virus nouvellement produits et d'augmenter le nombre de virions libérés par la cellule infectée en limitant la rétention des virus à la surface cellulaire par la tetherine. De plus, la protéine virale Nef va également diminuer la synthèse et internaliser les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I, afin d'échapper à la réponse lymphocytaire T cytotoxique. La protéine virale Nef peut également entraîner une activation cellulaire, par les mêmes cascades de signalisation que celles activées par le récepteur des cellules T (TCR), ainsi qu'interférer avec les signaux pro- et anti-apoptotiques (Laguette et al., 2010).



**FIGURE 12 : SCHEMA DE LA TRANSACTIVATION DU VIH-2.**

Lors de l'activation cellulaire, les FT cellulaires vont pouvoir se fixer sur leurs sites de fixation dans le 5'-LTR du VIH-2 et entraîner une transcription à bas bruit du génome viral. Les ARN transcrits précocement sont multi-épissés avant de sortir du noyau et d'être traduits en trois protéines : Tat, Rev et Nef. La protéine virale Tat va amplifier la transcription du génome viral en se fixant à TAR. Les nombreux ARN tardifs transcrits sont peu ou pas épissés car ils sont exportés précocement du noyau cellulaire du fait de la fixation de Rev sur le site RRE (« Rev Recognition Element »). Dans le cytoplasme, ces ARN vont permettre l'assemblage de nouveaux virions qui sortiront de la cellule infectée par bourgeonnement.

Abréviations : ARNme : ARN messagers multi-épissés, ARNpe : ARN messagers partiellement épissés, ARNne : ARN messagers non épissés, FT : Facteurs de Transcription, ARN pol. II : ARN polymérase II ; TAR : « Tat-Activated Region » et TCR : « T Cell Receptor ».

Différents facteurs de restriction antirétrovirale, dont l'action antirétrovirale se déroule dans le noyau cellulaire, ont été décrits récemment : la protéine NONO, en association avec la protéine cGAS, et le complexe HUSH (Figure 11).

La protéine NONO reconnaît la capsid virale du VIH-2 de façon plus affine que celle du VIH-1 (Lahaye et al., 2018). En se fixant à la capsid virale, cette protéine pan-nucléaire va rapprocher l'ADN viral double brin du senseur cGAS (« cyclic GMP-AMP cyclase ») (Lahaye et al., 2013). En effet, dans certaines lignées cellulaires dont les cellules dendritiques et les macrophages, la protéine cGAS, d'habitude retrouvée dans le cytoplasme, est également présente dans le noyau où elle est associée à la protéine NONO. La détection d'ADN double brin par cGAS dans le noyau entraîne une activation de l'immunité innée dans la cellule infectée par phosphorylation d'IRF3, entraînant la production d'interférons de type I et III. Cette détection de l'ADN viral double brin dans les noyaux des cellules dendritiques et des macrophages pourrait induire une immunité antivirale protectrice vis-à-vis du VIH-2.

Le complexe HUSH (« human silencing hub »), composé des protéines TASOR, MPP8 et périphilline, recrute l'histone méthyltransférase H3K9me3. Cette enzyme induit une répression épigénétique des gènes en modifiant la condensation de la chromatine par méthylation des histones. La protéine virale Vpx va se fixer à une ubiquitine ligase et à la protéine TASOR, induisant l'ubiquitinylation de celle-ci et donc sa dégradation par le protéasome (Chougui et al., 2018). Cela va déstabiliser le complexe HUSH, limitant la répression épigénétique induite par celui-ci. La protéine Vpx va également dégrader la protéine MPP8. Dans un modèle expérimental de cellules infectées par le VIH-1, la présence de Vpx du VIH-2 ou de VIS entraîne la perte des marques épigénétiques sur les histones et la dé-répression des provirus VIH-1, c'est-à-dire leur réactivation (Chougui et al., 2018). Le complexe HUSH est donc un facteur de restriction antirétrovirale, limitant l'expression des transcrits viraux par un mécanisme épigénétique, contrecarré par la protéine Vpx du VIH-2 (Figure 11).

## 6.5. Traduction des ARN messagers et assemblage des particules virales

Après la transcription des gènes viraux et l'export des ARN viraux dans le cytoplasme, différentes polyprotéines virales vont être synthétisées par traduction des ARN messagers par l'ARN ribosomal (ARNr). Ce sont les polyprotéines Gag, Gag-pol et Env.

La polyprotéine Env est clivée par une protéase cellulaire, au niveau de l'appareil de Golgi, pour donner les deux glycoprotéines gp105 et gp36. Les polyprotéines Gag et Gag-pol sont produites à partir du même transcrit mais, du fait d'un décalage du cadre de lecture lors de la traduction par l'ARNr, à la fin de la traduction de Gag, environ 5% des protéines produites correspondent à la polyprotéine Gag-poll qui code pour les protéines de matrice (MA), de capsid (CA) et de nucléocapsid (NC), ainsi que pour les enzymes virales (protéase, TI et intégrase).

Les différentes protéines codées par le précurseur polyprotéique Gag jouent toutes un rôle dans l'assemblage du virion. Les glycoprotéines d'enveloppe vont migrer au niveau de la membrane et s'y ancrer. Le domaine MA (matrice) dirige Gag vers la membrane cellulaire et, en interagissant avec eux, permet l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe dans les virions en formation. La NC va, elle, recruter l'ARN génomique dans ces mêmes virions, en se fixant au signal de packaging  $\psi$  (Freed, 2015).

## 6.6. Maturation et bourgeonnement

Enfin, le domaine p6 de Gag fixe les protéines ESCRT-I (« endosomal sorting complex required for transport ») et ALIX, qui recrutent alors la protéine ESCRT-III qui va catalyser le processus de séparation des membranes, permettant le bourgeonnement des virions (Freed, 2015).

Les particules virales peuvent être retenues à la surface cellulaire par un facteur de restriction antirétrovirale induit par l'interféron, la tetherine, aussi appelée BST2 (Neil et al., 2008). Selon les rétrovirus, différentes protéines virales vont contrecarrer l'action de cette protéine membranaire en la séquestrant dans un compartiment périnucléaire : Vpu et Nef pour le VIH-1, Env et Nef pour le VIH-2 (Jia et al., 2009, 2009; Le Tortorec and Neil, 2009; Neil et al., 2008; Zhang et al., 2009).

Une étape de maturation a lieu ensuite dans les virions immatures, la protéase virale va se libérer par autoclivage, se dimériser et ensuite cliver les précurseurs polyprotéiques Gag et Gag-pol, à différents sites de clivage. Cela permet de libérer les protéines MA, CA, NC, P6 et deux peptides « spacers » (SP1 et SP2), ainsi que la protéase, la TI, l'intégrase dans le cas de la polyprotéine Gag-pol (Freed, 2015). Cela entraîne une transformation morphologique du virion, appelée maturation, qui rend le virus infectieux. Lors de la formation des virions, la cyclophiline A est incorporée à ceux-ci en se fixant à la capsid virale. De la même façon, les protéines cellulaires APOBEC peuvent être incorporées à ces virions.

## 7. Traitements antirétroviraux

### 7.1. Objectifs

Dès la découverte des VIH, un effort massif pour développer des molécules antirétrovirales a été déployé. La compréhension du cycle rétroviral a permis de développer des molécules inhibitrices des différentes étapes clés de ce cycle de réplication (Figure 13). En inhibant la réplication virale, les traitements antirétroviraux ont plusieurs objectifs : 1) Bloquer l'évolution clinique chez les patients, 2) Restaurer une fonction immunitaire normale et 3) Limiter la transmission du virus.

Pour suivre l'efficacité du traitement antirétroviral, deux marqueurs sont utilisés en France : le taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, seul marqueur disponible au début de l'épidémie, et la charge virale plasmatique, utilisée depuis 1993 (Piatak et al., 1993). Le critère de succès virologique d'un traitement antirétroviral est l'obtention d'une virémie inférieure à 50 copies/mL après plusieurs mois de traitement (Morlat, 2013). Sous traitement antirétroviral, le taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> augmente régulièrement jusqu'à revenir à des niveaux proches de ceux des personnes non infectées et le ratio T CD4/T CD8 redevient supérieur à 1, signe d'une réduction de l'activation lymphocytaire.

### 7.2. Traitements disponibles

La première classe de molécules mise sur le marché fut celle des inhibiteurs nucléosid(t)idiques de la transcriptase inverse (INTI ou NRTI). La zidovudine (AZT) fut commercialisée en 1987 et fut d'abord utilisée en monothérapie puis en bithérapie avec

d'autres INTI (Fischl et al., 1987). Les INTI sont divisés schématiquement entre les premières molécules qui ont rapidement suivi l'AZT, qui présentaient des toxicités importantes et ne sont désormais plus commercialisées en France (stavudine ou d4T, didanosine ou dDI et zalcitabine ou ddC) et celles commercialisées plus tardivement et qui sont encore aujourd'hui à la base des traitements antirétroviraux (lamivudine ou 3TC, emtricitabine ou FTC, abacavir ou ABC et ténofovir disoproxil fumarate ou TDF, ainsi que sa prodrogue, le ténofovir alefenamide ou TAF) (Tableau 2).

Une fois tri-phosphorylés par des kinases cellulaires, les INTI sont utilisés par la TI lors de la synthèse de l'ADN viral en lieu et place des dNTP. Les INTI sont alors incorporés dans le brin d'ADN en cours de synthèse et bloquent son élongation, ne possédant pas de groupement hydroxyl sur lequel brancher le nucléotide suivant. Ce mécanisme d'action est aussi appelé « terminaison de chaîne ».

Les mutations de résistance aux INTI sont de deux types : 1) mutations empêchant l'incorporation de l'INTI tri-phosphorylé (mutations K65R, Q151M et M184V), et 2) mutations permettant à la TI d'exciser l'analogue nucléosidique (TAMs ou « Thymidine-Associated Mutations » : M41L, D67N, K70R, T215F/Y et K219E/Q).

Les monothérapies d'AZT devenant rapidement inefficaces du fait de l'émergence de ces mutations de résistance, dès l'apparition des autres INTI, des bithérapies de 2 INTI ont été proposées aux patients. Malheureusement, là encore, les traitements n'étaient efficaces que sur une courte période de temps puis les virémies redevenaient positives avec émergence de mutations de résistance et les taux de CD4 des patients diminuaient de nouveau.

La grande révolution dans l'ère du traitement antirétroviral a été l'instauration de trithérapies (Hammer et al., 1997). Les premiers essais de trithérapies testèrent l'association de 3 INTI mais avec un succès très modéré. L'avènement des trithérapies hautement efficaces a été rendue possible par l'apparition des autres classes d'antirétroviraux, les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI ou NNRTI) et les inhibiteurs de protéase (IP). Les IP sont des peptidomimétiques se fixant au niveau du site actif de la protéase virale, l'empêchant de cliver les précurseurs polyprotéiques Gag et Gag-Pol en composants fonctionnels. Les IP bloquent donc la maturation des virus, étape indispensable pour que ceux-ci deviennent infectieux. Les INNTI sont des inhibiteurs de la TI mais, contrairement aux INTI, ce ne sont pas des analogues nucléos(t)idiques. Les INNTI se fixent sur un site hydrophobe, à proximité du site catalytique de l'enzyme. L'encombrement stérique généré par

la fixation de l'INNTI bloque l'activité de la TI. La barrière génétique des INNTI est faible, une seule mutation pouvant générer un haut niveau de résistance à ces molécules. A l'inverse, la barrière génétique des IP est élevée, il faut accumuler plusieurs mutations avant d'observer des augmentations des  $CI_{50}$  de ces molécules.

Au début des années 2000, l'enfuvirtide (inhibiteur de gp41) et le maraviroc (inhibiteur de la liaison au CCR5) ont été commercialisés. Il s'agit encore aujourd'hui de molécules principalement utilisées chez des patients ayant échoué à des premières lignes de traitement ARV et présentant des mutations de résistance aux autres classes d'ARV.

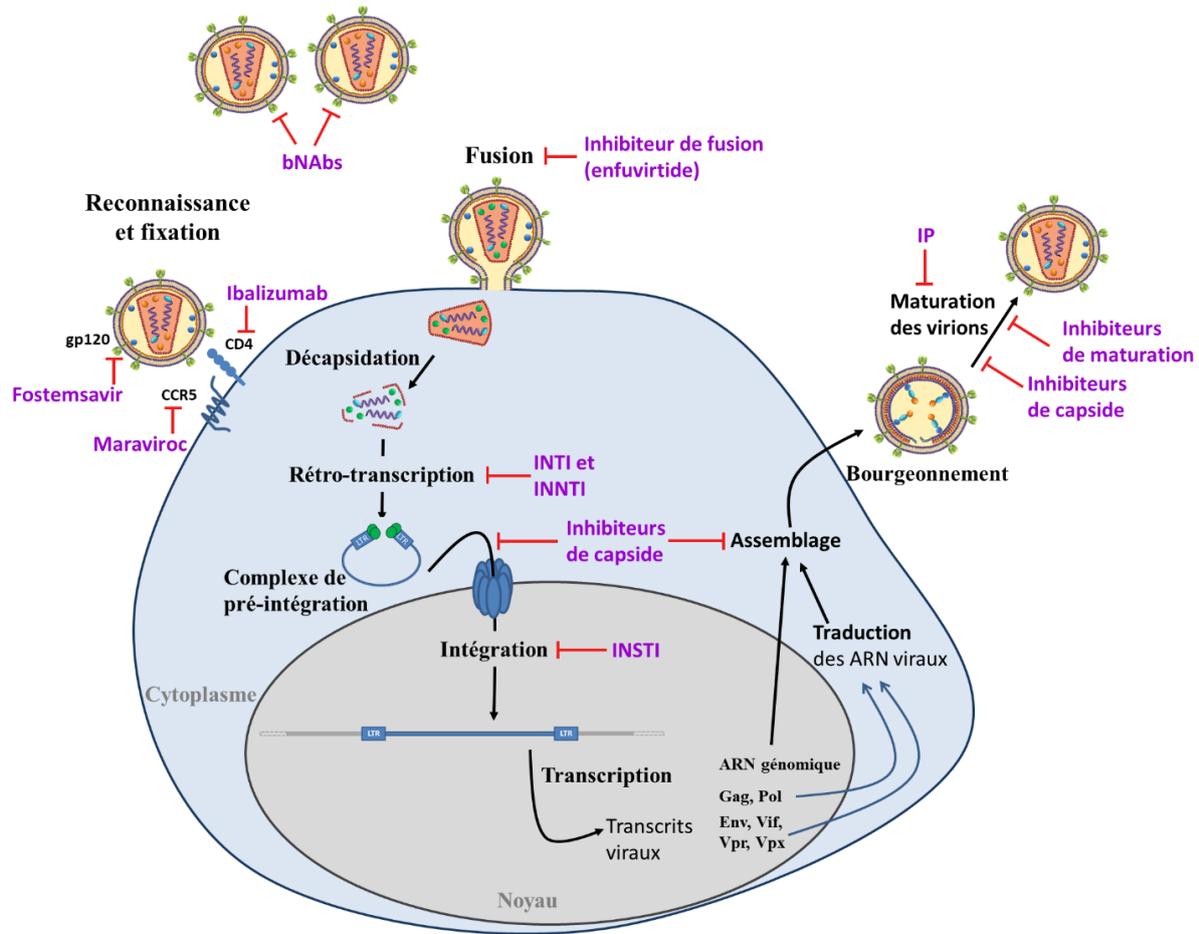
Les virus évoluant d'un tropisme R5 en début d'infection à un tropisme X4, il faut réaliser un géotypage de la boucle V3 de la gp120 pour confirmer le tropisme R5 du virus avant d'initier un traitement par maraviroc. L'enfuvirtide n'est, lui, administrable que par voie sous-cutanée, en 2 injections par jour et entraîne des réactions au site d'injection (douleur, érythème, nodules), souvent mal tolérées par les patients.

Au cours de la dernière décennie, l'arsenal thérapeutique s'est étoffé avec le développement d'une nouvelle classe d'ARV, celle des inhibiteurs de transfert de brin de l'intégrase (INSTI). Les molécules actuellement commercialisés ou utilisées dans le cadre d'essais cliniques sont les suivantes : raltegravir, elvitegravir, dolutegravir, cabotegravir et bictegravir. Les INSTI sont subdivisés en molécules de 1<sup>ère</sup> génération (RAL et EVG) et de 2<sup>e</sup> génération (DTG, CAB et BIC).

Ces dernières années, les traitements antirétroviraux ont continué à évoluer. L'accessibilité à des molécules plus puissantes a permis de proposer des stratégies de simplification thérapeutique (passage de plusieurs molécules avec 1 à plusieurs comprimés par jour à des STR, ou « single tablet regimen », contenant les 3 molécules dans le même comprimé) et d'allègement. Les stratégies d'allègement sont de deux types : 1) diminution du nombre de molécules (par exemple, monothérapies d'IP ou bithérapies contenant 1 INTI + 1 INSTI ou 1 INNTI + 1 INSTI), et 2) réduction du nombre de jours de prise (par exemple, 4 jours par semaine dans l'essai ARNS 162-4D (de Truchis et al., 2018)). Les allègements sont actuellement réservés aux patients contrôlés virologiquement (charge virale plasmatique inférieure à 50 copies/mL) depuis au moins 6 mois et dont les virus ne présentent pas de mutation de résistance, ou d'historique de mutation, aux molécules prescrites.

Des essais cliniques, actuellement en phase III, étudient les traitements dits « long-acting », c'est-à-dire actifs sur une longue durée. Dans ces traitements, des molécules à demi-vie longue sont administrées par voie intra-musculaire ou sous forme d'implants. Les patients ne reçoivent ainsi qu'une injection toutes les 4 à 8 semaines dans le cas de l'association cabotegravir + rilpivirine (Margolis et al., 2017). Ces stratégies de traitement « long-acting » seraient applicables à la fois chez des patients naïfs ou non de traitement antirétroviral, ainsi qu'en prévention de l'infection par le VIH. Néanmoins, des précautions s'imposent lors de l'utilisation de ces traitements. Une phase d'induction par voie orale est impérative pour vérifier la tolérance des molécules avant de passer à ce traitement à longue demi-vie.

Depuis quelques années, les traitements antirétroviraux sont également utilisés en « PrEP » (ou « Pre-Exposition Prophylaxis ») chez les personnes non infectées par le VIH mais à fort risque d'infection (hommes ayant des relations sexuelles non protégées avec des hommes, travailleurs du sexe, couples sérodifférents, etc.) (Molina et al., 2015). La PrEP consiste en une bithérapie par TDF+FTC par voie orale, soit à la demande (2 comprimés avant le rapport à risque, 1 comprimé le lendemain, 1 le surlendemain), soit en continu (1 comprimé par jour). Une des limites de la PrEP est actuellement son autorisation principalement limitée aux pays occidentaux et à la communauté HSH alors que son déploiement dans les pays avec de fortes prévalences de l'infection par le VIH pourrait être salvateur.



**FIGURE 13 : SITES D’ACTION DES MOLECULES ANTIRETROVIRALES**

*Abréviations : bNAbs : « broadly neutralizing antibodies » ou anticorps neutralisants à large spectre ; IP : inhibiteurs de protéase ; INTI : inhibiteurs nucléos(t)idiques de la transcriptase inverse ; INNTI : inhibiteurs non nucléotidiques de la transcriptase inverse ; INSTI : inhibiteurs de l’activité de transfert de brin de l’intégrase.*

En parallèle de l’autorisation de la PrEP dans de nombreux pays, plusieurs études ont assené le message important du « U=U » (« Undetectable = Untransmittable » soit « Virus indétectable = Virus non transmissible »). Dans ces études menées sur des couples sérodifférents (un partenaire est infecté par le VIH, l’autre non) ayant des relations sexuelles non protégées alors que la personne infectée est sous trithérapie et est contrôlée virologiquement, aucune contamination à l’intérieur du couple n’a été observée (Rodger et al., 2019). Cette stratégie de protection du partenaire séronégatif en traitant le conjoint infecté par le VIH est parfois appelée TASP, pour « Treatment As Prevention ».

Classe	Molécules (DCI et abréviation)	Date de commercialisation ou statut des EC <sup>1</sup>	Activité sur les VIH
<b>Inhibiteurs nucléot(s)idiques de la transcriptase inverse (INTI)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zidovudine (AZT)</li> <li>- Didanosine (ddI) †</li> <li>- Zalcitabine (ddC) †</li> <li>- Stavudine (d4T) †</li> <li>- Lamivudine (3TC)</li> <li>- Abacavir (ABC)</li> <li>- Emtricitabine (FTC)</li> <li>- Ténofovir disoproxil fumarate (TDF)</li> <li>- Ténofovir alafenamide (TAF)</li> <li>- GS-9131</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1987</li> <li>• 1991</li> <li>• 1992</li> <li>• 1994</li> <li>• 1995</li> <li>• 1998</li> <li>• 2003</li> <li>• 2001</li> <li>• 2018</li> <li>• EC : Phase II</li> </ul>	VIH-1 et VIH-2
<b>Inhibiteurs non nucléotidiques de la transcriptase inverse (INNTI)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Névirapine (NVP)</li> <li>- Delavirdine (DLV) †</li> <li>- Efavirenz (EFV)</li> <li>- Etravirine (ETR)</li> <li>- Rilpivirine (RPV)</li> <li>- Doravirine (DOR)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1996</li> <li>• 1997</li> <li>• 1998</li> <li>• 2008</li> <li>• 2011</li> <li>• 2018 (USA)</li> <li>• EC : Phase III (FR)</li> </ul>	VIH-1
<b>Inhibiteurs de protéase (IP)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Saquinavir (SQV) †</li> <li>- Ritonavir (RTV) <sup>2</sup></li> <li>- Indinavir (IDV) †</li> <li>- Nelfinavir (NFV) †</li> <li>- Amprenavir (APV) †</li> <li>- Lopinavir (LPV)</li> <li>- Fosamprenavir (FPV)</li> <li>- Atazanavir (ATV)</li> <li>- Tipranavir (TPV)</li> <li>- Darunavir (DRV)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1995</li> <li>• 1996</li> <li>• 1996</li> <li>• 1997</li> <li>• 1999</li> <li>• 2000</li> <li>• 2003</li> <li>• 2003</li> <li>• 2005</li> <li>• 2006</li> </ul>	VIH-1 (pour tous) VIH-2 (pour SQV, LPV et DRV)
<b>Inhibiteur du CCR5</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Maraviroc (MVC)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2007</li> </ul>	VIH-1 et VIH-2
<b>Inhibiteur de fusion</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enfuvirtide (T20)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2003</li> </ul>	VIH-1
<b>Inhibiteurs de l'activité transfert de brin de l'intégrase (INSTI)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Raltegravir (RAL)</li> <li>- Elvitegravir (EVG)</li> <li>- Dolutegravir (DTG)</li> <li>- Cabotegravir (CAB)</li> <li>- Bictegravir (BIC)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2007</li> <li>• 2012</li> <li>• 2013</li> <li>• EC : Phase III</li> <li>• 2018</li> </ul>	VIH-1 et VIH-2
<b>Inhibiteur d'attachement</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fostemsavir</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EC : Phase III</li> </ul>	VIH-1 (et VIH-2 ?) <sup>3</sup>
<b>Anticorps monoclonal anti-CD4</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ibalizumab</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2018 (USA)</li> <li>• ATU (FR)</li> </ul>	VIH-1 et VIH-2
<b>INTI et inhibiteur de translocation de RT</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EC : Phase IIB</li> </ul>	VIH-1 et VIH-2
<b>Inhibiteur de capsid</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- GS-CA1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EC : Phase I</li> </ul>	VIH-1 et VIH-2 <sup>4</sup>

**TABLEAU 2 : LISTE DES MOLECULES ANTIRETROVIRALES ACTUELLEMENT COMMERCIALISEES OU DISPONIBLES DANS LE CADRE D'ESSAIS CLINIQUES OU D'ATU.**

D'après la revue de De Clercq and Li, 2016, tableau actualisé avec les dernières données disponibles sur <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/> et sur <https://clinicaltrials.gov> pour les dates d'autorisation par la FDA et les essais cliniques en cours, respectivement. Pour les molécules actuellement en développement, la phase de l'essai clinique le plus avancé a été indiquée. Le fostemsavir n'a pas été inclus dans ce tableau, son mécanisme d'action exact n'étant pas encore élucidé.

<sup>1</sup> : Les dates de commercialisation indiquées sont celles des USA. Pour les molécules pour lesquelles une autorisation de mise sur le marché a été obtenue aux USA mais pas encore en France, le statut du médicament en France est précisé. Un obélisque est rajouté après les noms des molécules qui ne sont plus commercialisées en France (†) (d'après [vidal.fr](http:// Vidal.fr)).

<sup>2</sup> : Le ritonavir n'est plus utilisé pour son activité antirétrovirale, qui est limitée, mais est prescrit en association avec un autre IP pour son activité pharmacologique potentialisatrice ou « effet boost » (par inhibition de la glycoprotéine P intestinale et du CYP3A dont les IP sont des substrats).

<sup>3</sup> : Le fostemsavir serait actif sur certaines souches de VIH-2 (données non publiées).

<sup>4</sup> : L'inhibiteur de capsid serait actif sur le VIH-2, avec des  $CI_{50}$  de l'ordre de 1 à 2 nanomolaires, contre 140 picomolaires pour le VIH-1 (données non publiées).

Abréviations : ATU : autorisation temporaire d'utilisation ; EC : essais cliniques ; DCI : dénomination commerciale internationale ; FR : France et USA : Etats-Unis d'Amérique.

### 7.3. Nouvelles classes d'antirétroviraux en développement

De nouvelles molécules appartenant à de nouvelles classes antirétrovirales sont actuellement en essais cliniques : un INTI qui est également un inhibiteur de translocation de la transcriptase inverse (EFdA) et un inhibiteur d'attachement (fostemsavir), tous deux actuellement en phase III. Le fostemsavir se lie à la gp120 du virus, interférant avec son attachement au récepteur CD4. Cet inhibiteur d'attachement n'est efficace que sur un spectre limité des sous-types du VIH-1 et son activité serait variable selon les souches de VIH-2, tandis que l'EFdA est actif sur VIH-1 et VIH-2, et présente la particularité d'être l'un des rares antirétroviraux avec des concentrations inhibitrices 50% ( $CI_{50}$ ) plus faibles pour le VIH-2 que pour le VIH-1.

Récemment, un anticorps monoclonal anti-CD4 a été mis sur le marché aux Etats-Unis pour le traitement des infections VIH-1 multi-résistantes, l'ibalizumab. Cet anticorps monoclonal cible un domaine extracellulaire du récepteur CD4 humain, empêchant le changement conformationnel de la protéine d'enveloppe gp120 du VIH-1 (gp105 pour le VIH-2) essentiel

à l'entrée du virus dans la cellule cible (Emu et al., 2018). Cet anticorps est également actif sur le VIH-2.

Dans un futur plus lointain, l'arrivée d'inhibiteurs de capsid est espérée, le premier médicament de cette classe, le GS-CA1, étant en essai de phase I depuis 2018. Cet inhibiteur de capsid aurait des  $CI_{50}$  sur les VIH-1 de l'ordre du picomolaire (140 pM en moyenne) mais peu de données sont disponibles sur son efficacité sur le VIH-2, pour lequel la  $CI_{50}$  serait plus élevée, de l'ordre de 1 à 2 nM (Tse et al., 2017).

## 7.4. Autres pistes thérapeutiques

D'énormes efforts de recherche sont déployés afin d'obtenir une guérison (« cure ») ou une guérison fonctionnelle (« functional cure ») de l'infection par le VIH, c'est-à-dire réussir à induire un contrôle de l'infection VIH sur le long terme, en l'absence de traitement ARV (Davenport et al., 2019; Pitman et al., 2018).

Trois grandes stratégies pour obtenir une guérison fonctionnelle peuvent être définies (Pitman et al., 2018) :

- celles ciblant le cycle de réplication virale, comprenant :
  - la transplantation de cellules souches hématopoïétiques d'un donneur homozygote CCR5 $\Delta$ 32 après un conditionnement par chimiothérapie ou par irradiation corporelle totale. Proposée dans certaines maladies hématologiques, cette thérapie lourde et risquée entraîne une réduction du réservoir viral et a permis, dans deux cas, la guérison de patients infectés par le VIH (patients de Berlin et de Londres)
  - des thérapies géniques notamment avec le système CRISPR-Cas9
  - des stratégies de « shock and kill » associant des agents de renversement de la latence virale, comme les inhibiteurs d'histone déacétylases qui augmentent la transcription du provirus, associés à des traitements antirétroviraux
  - des stratégies du « block and lock » utilisant des molécules inhibant la transcription du génome proviral

- celles améliorant la réponse immunitaire anti-VIH, dont :
  - l'administration d'une combinaison d'anticorps neutralisants à large spectre (« bNAb »), capables de neutraliser une grande variété de virus
  - l'injection de « Chimeric Antigen Receptor T cells », ou « CAR T cell », qui sont des lymphocytes T du patient, modifiés pour exprimer un récepteur dirigé contre les cellules infectées par le VIH et entraîner une réponse cytotoxique
- celles modulant le système immunitaire :
  - des bloqueurs de points de contrôle immunitaire comme les anticorps anti-PD1 (« programmed cell death protein 1 »), permettant d'augmenter les réponses immunitaires anti-VIH
  - des molécules réduisant l'inflammation chronique présente lors de l'infection par le VIH, responsable d'une persistance virale et d'un épuisement des cellules immunitaires

Toutes ces stratégies en sont encore à des phases expérimentales et, pour chacune d'entre elles, il reste à déterminer quels patients seront les meilleurs candidats pour obtenir ces guérisons fonctionnelles.

## 7.5. Principes du traitement du VIH-2 en 2019

En France, jusqu'en 2013, pour les infections par le VIH-2, le traitement antirétroviral était recommandé uniquement chez les patients présentant des signes cliniques (stades B ou C) ainsi que chez les patients asymptomatiques avec des taux de CD4 < 500/mm<sup>3</sup>. Le traitement antirétroviral était à envisager chez les patients présentant une charge virale plasmatique > 1000 copies/mL et/ou une pente de décroissance rapide des CD4 et/ou chez les patients ayant plus de 40 ans et/ou en cas de co-infection par le VHB et/ou le VHC (Yeni, 2010).

Depuis la publication du rapport Morlat en 2013, la stratégie nationale concernant le traitement des personnes vivant avec le VIH-2 (PVVIH-2) a évolué. Un traitement antirétroviral est désormais recommandé pour tous les PVVIH-2, à l'exception des patients asymptomatiques de moins de 40 ans, sans comorbidité, avec une charge virale indétectable, un nombre de CD4 > 500/mm<sup>3</sup> et une pente de décroissance faible (diminution de moins de 30 CD4/an) chez qui l'initiation du traitement antirétroviral peut être différée (Morlat, 2013).

Actuellement, les traitements antirétroviraux recommandés en première ligne en France pour les infections par le VIH-2 associent 2 INTI (abacavir/lamivudine ou ténofovir/emtricitabine) et 1 IP (darunavir) boosté par le ritonavir ou 1 INSTI (raltegravir ou dolutegravir). Les options à privilégier en deuxième et troisième ligne de traitement, après des échecs virologiques, ne sont pas clairement définis, que ce soit au niveau français ou mondial (Gottlieb et al., 2018).

Il faut noter que tous les antirétroviraux ont été développés initialement pour leur activité contre le VIH-1 et leur mise sur le marché a été décidé principalement sur la base de cette activité. Toutes les molécules ne sont pas actives sur le VIH-2 qui est naturellement résistant à l'enfuvirtide, aux INNTI et au fostemsavir. De plus, fréquemment, peu de données sur l'activité anti-VIH-2 sont disponibles lors de la commercialisation d'une nouvelle molécule, en dehors d'essais *in vitro*.

En cas d'échec, le VIH-2 sélectionne rapidement des mutations de résistance à ces molécules antirétrovirales. Ainsi, les mutations K65R, Q151M et M184V sont fréquemment sélectionnées lors d'échecs virologiques de traitement à base d'INTI (Adjé-Touré et al., 2003; Charpentier et al., 2014; Damond et al., 2005; Descamps et al., 2004; Gottlieb et al., 2009). La mutation Q151M entraîne une résistance dite «de classe» car elle diminue la susceptibilité à l'AZT, d4T, ddI, ainsi qu'aux autres INTI en combinaison avec les mutations K65R ou M184V (Smith et al., 2009).

Alors que les TAMs («Thymidine-Associated Mutations», i.e. mutations aux positions 41, 67, 70, 210, 215 et 219) sont fréquemment observées chez les patients infectés par le VIH-1, lors d'échecs virologiques de traitements comprenant par les analogues de la thymidine (d4T, ZDV), ces mutations sont rares chez les patients infectés par le VIH-2, traités par les mêmes molécules. De plus, toutes les TAMs décrites dans le VIH-1 ne sont pas retrouvées dans le VIH-2, les mutations identifiées sont généralement celles aux codons 215 et/ou 219. Cette différence dans la sélection de mutations de résistance serait dû au mécanisme de résistance induit par les mutations. Dans le VIH-1, les mutations dans la TI peuvent soit entraîner une meilleure discrimination entre les dNTP et les analogues nucléotidiques, limitant ainsi l'incorporation de ces derniers (K65R, Q151M et M184V), soit entraîner l'excision par la TI de l'analogue nucléotidique incorporé dans le brin d'ADN viral en cours de synthèse (TAMs) (Deval et al., 2002; Gu et al., 1995; Krebs et al., 1997; Meyer et al., 1999). La TI ne

posséderait pas cette activité d'excision des INTI et donc ne sélectionnerait pas ou peu ces TAMs (Boyer et al., 2006).

Concernant les IP, le VIH-2 n'est sensible qu'au saquinavir, au lopinavir et au darunavir (Desbois et al., 2008). De plus, contrairement au VIH-1 chez lequel la barrière génétique des inhibiteurs de protéase est élevée, peu de mutations sont nécessaires pour observer une résistance aux IP : V47A pour le lopinavir, I54M+L90M pour le darunavir (Raugi et al., 2013).

Les inhibiteurs d'intégrase sont tous actifs sur le VIH-2 (Ba et al., 2018; Descamps et al., 2015; Matheron et al., 2018). Les 3 principales voies de résistance observées sont les mêmes que chez le VIH-1, soit des substitutions aux codons 143, 155 ou 148, près du cœur catalytique de l'enzyme (Smith et al., 2012).

La sélection rapide de mutations de résistance chez le VIH-2, du fait des barrières génétiques plus faibles et parfois d'erreurs diagnostiques ayant amené à traiter les patients par 2 INTI + 1 INNTI en pensant qu'ils étaient infectés par le VIH-1, pose des problèmes de prise en charge des PVVIH-2 en cas d'échec à une première ligne de traitement antirétroviral. En effet, dans l'infection par le VIH-2, les options thérapeutiques en deuxième ligne sont limitées et ont peu été étudiées (Gottlieb et al., 2009, 2018).

Ainsi, l'accès à des traitements antirétroviraux efficaces ne règle pas totalement les problèmes posés par l'infection par le VIH-2. La recherche vaccinale et le développement de nouvelles classes d'antirétroviraux et de molécules avec une meilleure efficacité sur les virus « divergents » (VIH-2 mais aussi VIH-1 groupe O) restent indispensables.

## 8. Réservoirs du VIH

Le principal obstacle à la guérison des infections par le VIH est l'existence de réservoirs viraux empêchant d'envisager pour le moment une guérison de l'infection par le VIH (Chun et al., 1998; Iglesias-Ussel and Romerio, 2011). Ce sont ces réservoirs qui sont à l'origine des rebonds de CV plasmatique dans les jours à semaines suivant l'arrêt des traitements antirétroviraux.

Ces réservoirs se constituent dès les premiers jours de l'infection par le VIH (Barouch et al., 2016; Chun et al., 1998) et la décroissance de la taille du réservoir est très lente, ce qui s'explique notamment par la longue demi-vie des lymphocytes T CD4+ latents infectés (44 mois). La diminution de la taille du réservoir est également limitée par l'auto-entretien de celui-ci par la réplication à bas bruit du VIH dans les réservoirs. Cette réplication a été objectivée par la production d'ARN associé aux cellules (Pasternak et al., 2013).

Différents types de réservoirs du VIH sont décrits :

### 8.1. Réservoirs latents

Ils sont composés des cellules ayant un génome viral intégré (provirus) mais ne produisant pas de virion. Ce sont notamment les lymphocytes T CD4+ (principal réservoir du VIH), les cellules de la microglie, les progéniteurs hématopoïétiques, etc. Comme il n'y a pas de réplication virale au sein de ces cellules quand elles sont latentes, ces réservoirs ne sont pas sensibles à l'action des ARV. En revanche, lorsque ces cellules latentes sont activées, elles peuvent produire des virus et initier de nouveaux cycles d'infections cellulaires.

Néanmoins, une grande partie de ces provirus est défective, seulement 1 à 10% des lymphocytes T CD4+ ayant une copie d'ADN du VIH intégré à leur génome sont capables de se répliquer, une fois activés (Chun et al., 1997). Le caractère défectif des provirus peut être dû à l'existence de larges délétions au sein du génome proviral, à la présence de codons stop dans les gènes viraux et/ou à des hypermutations induites par les protéines cellulaires APOBEC (Bruner et al., 2019) (Figure 15).

### 8.2. Réservoirs extracellulaires

Ils comprennent les cellules ayant des virions associés à leur membrane mais dans lesquels il n'y a pas de réplication virale : cellules dendritiques folliculaires, lymphocytes B (Iglesias-Ussel and Romerio, 2011; Smith et al., 2001).

### 8.3. Sanctuaires

Ce sont des cellules au sein desquels les ARV ont une efficacité moindre par des mécanismes de phosphorylation ou d'efflux, tels les macrophages. Les sanctuaires sont également constitués de réservoirs anatomiques, dans lesquels la diffusion des ARV est limitée : le système nerveux central (où les astrocytes et les cellules de la microglie peuvent être infectés), les organes lymphoïdes (notamment dans le tube digestif), les organes génitaux.

Dans les deux cas, les concentrations suboptimales d'ARV peuvent permettre une réplication locale du virus et une compartimentalisation de celui-ci, c'est-à-dire que la population virale qui va émerger dans ce sanctuaire sera distincte de celle retrouvée dans le plasma.

### 8.4. Quantification des réservoirs

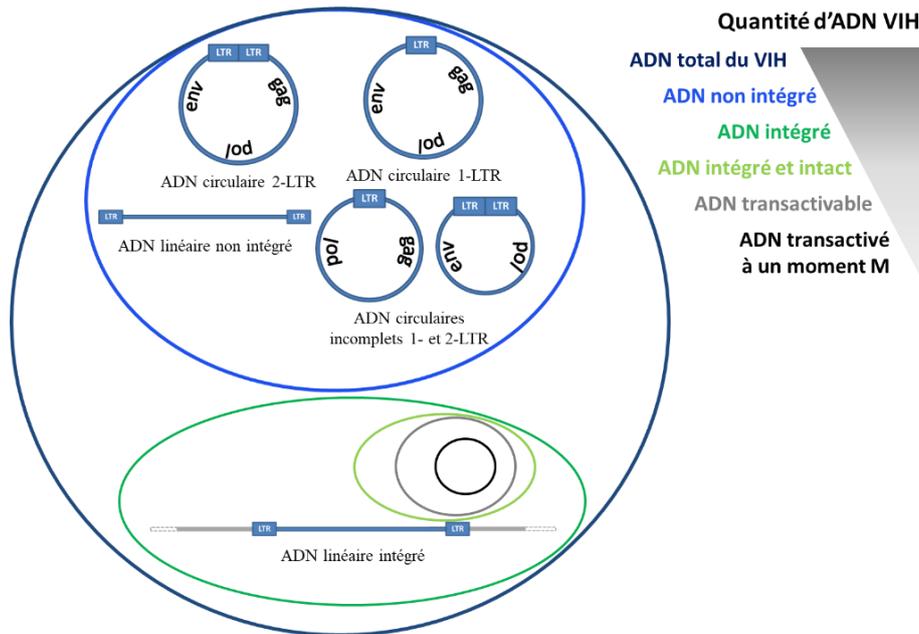
Différentes techniques de quantification du réservoir proviral ont été développées, elles sont basées soit sur des techniques de culture cellulaire, soit sur de la biologie moléculaire (Bruner et al., 2015).

La technique de référence est le qVOA (« quantitative Viral Outgrowth Assay ») qui consiste à mesurer la proportion de provirus qui sont réactivables depuis les lymphocytes T CD4+ latents d'un patient (Chun et al., 1997; Finzi, 1997; Wong, 1997). C'est une technique historique qui consiste à isoler les lymphocytes T CD4+ non activés d'un patient, d'activer ces cellules (par de la PHA ou des anticorps anti-CD3 et anti-CD28) et de co-cultiver les cellules du patient avec des lymphocytes de donneur non infecté. La production de particules virales est ensuite mesurée dans les jours suivants, par mesure de l'antigène p24 ou de l'ARN viral dans le surnageant de la culture cellulaire. Afin de quantifier la proportion de réservoir activable, la technique de dilution limite est utilisée. Les cellules isolées du patient sont diluées à différentes concentrations et le puits avec le moins de cellules dans lequel une production virale est détectée permet de déterminer le titre, exprimé en IUPM (« Infectious Units Per Million »), c'est-à-dire en nombre de lymphocytes T CD4+ réactivables par million de lymphocytes T CD4+ latents. La taille du réservoir réactivable est estimée à environ 1 copie/10<sup>6</sup> lymphocytes T CD4+ latents chez les patients infectés par le VIH-1 (Finzi, 1997). A ce jour, il n'existe pas de quantification précise du réservoir réactivable chez les personnes infectées par le VIH-2.

Cette technique est considérée comme celle de référence car elle ne détecte que les provirus intacts et capables de répliation. De plus, elle peut permettre d'isoler des clones de provirus par séquençage des virus produits aux dilutions limites. Néanmoins, elle possède plusieurs inconvénients. Tout d'abord, elle sous-estimerait le réservoir réactivable car tous les lymphocytes ne seraient pas réactivés après un seul cycle d'activation (Ho et al., 2013). De plus, cette technique est réservée aux laboratoires de recherche spécialisés car elle est complexe et coûteuse (cultures durant 2 à 3 semaines, manipulations à réaliser dans un laboratoire de type P3, nombreuses mesures de quantification de la production virale, volume de sang important requis pour pouvoir tester un nombre suffisant de lymphocytes T CD4+ latents : 120 à 180 mL).

Ces contraintes ont poussé les chercheurs à développer de nombreuses techniques de quantification par biologie moléculaire du réservoir au cours de ces dernières années, qui sont des techniques plus facilement implémentables dans les laboratoires de diagnostic et dans les essais cliniques. Ces techniques amplifient soit les ARN, soit les ADN du VIH présents dans les cellules infectées.

Différentes formes d'ADN du VIH sont présentes dans le noyau des cellules : ADN linéaire intégré, ADN linéaire non intégré, ADN circulaire à 1 ou 2 LTR (Figure 14). Seul l'ADN intégré pouvant mener à la répliation virale, les autres formes sont parfois appelées « dead-end products », c'est-à-dire que ce sont des impasses pour les virus, ne permettant pas la répliation du génome viral. Il est classiquement considéré que les ADN linéaire non intégrés sont la forme la plus abondante, suivie par les ADN intégrés puis les cercles 1-LTR et les cercles 2-LTR. La répartition est toutefois dynamique au cours de la vie cellulaire et/ou des traitements antirétroviraux éventuels (Munir et al., 2013).



**FIGURE 14 : DIFFERENTS TYPES D'ADN VIRAUX DU VIH.**

*Représentation des différents types d'ADN du VIH présents dans le noyau d'une cellule infectée. Seule une faible proportion de l'ADN linéaire intégré et intact est réactivable à un moment donné.*

Les différentes techniques de PCR utilisées pour quantifier ces différentes formes d'ADN VIH sont les suivantes :

- Quantification de l'ADN total :

Ce fut la première technique de biologie moléculaire développée, elle vise à quantifier tous les ADN du VIH présents dans les CSMP ou les lymphocytes T CD4+ latents. Elle consiste à amplifier une région de l'ADN du VIH sur un extrait d'ADN, par le biais d'une PCR en temps réel ou droplet digital PCR. Les échantillons sont amplifiés en même temps qu'une gamme (généralement un ADN plasmidique) permettant d'avoir une quantification du nombre de copies d'ADN VIH dans l'échantillon. La région amplifiée est une région hautement conservée du génome rétroviral afin de limiter les mésappariements des amorces et de la sonde. En parallèle de cette PCR, une PCR sur un gène ménager est réalisé (gène de la RNase P, de l'albumine, etc.) afin de quantifier le nombre de cellules présentes dans l'échantillon de départ. Cela permet de faire un ratio entre ces deux valeurs et d'obtenir la taille du réservoir, exprimé en nombre de copies d'ADN total du VIH par  $10^6$  cellules.

Cette technique ne fait pas le distinguo entre les différents types d'ADN viraux mais a l'avantage d'être simple et rapide (moins d'un jour de délai avant le rendu des résultats).

De nombreuses études ont analysé le réservoir cellulaire chez les patients infectés par le VIH-1. Il a notamment été démontré que le niveau d'ADN total du VIH-1 était prédictif de l'évolution de la maladie ainsi que du délai avant le rebond de la CV après une interruption des ARV (Rouzioux et al., 2005).

- Quantification de l'ADN linéaire non intégré :

L'ADN linéaire non intégré a une demi-vie très courte dans la cellule infectée, une partie de celui-ci sera intégré dans le génome de la cellule hôte et le reste sera dégradé rapidement. La quantification de l'ADN linéaire non intégré ne présente pas d'intérêt diagnostique aussi aucune PCR n'a été développée pour l'amplifier spécifiquement.

- Quantification de l'ADN intégré (ou Alu-PCR) :

Cette technique se réalise en deux temps. L'ADN extrait des lymphocytes va être amplifié par une première PCR appelée Alu-PCR car l'amorce sens se situe dans la région LTR du VIH et deux amorces anti-sens au niveau d'une séquence répétée « Alu », dans le génome humain. Ces séquences sont répétées dans le génome humain et il est communément admis que les provirus ne sont jamais éloignés de plus de 4000 paires de bases d'une séquence Alu, une distance acceptable pour une amplification par biologie moléculaire. Ainsi, seuls les ADN du VIH intégrés au génome de la cellule hôte vont pouvoir être amplifiés. Des amplicons de taille variable sont donc générés et ces produits de première PCR vont être amplifiés par une PCR nichée en temps réel, avec une amorce sens correspondant à lambda-T, tandis que la sonde et l'amorce anti-sens sont complémentaires de la région LTR du VIH. Cette deuxième PCR spécifique du VIH présente deux avantages : 1) elle permet d'amplifier le signal et de quantifier par PCR en temps réel le nombre de copies d'ADN VIH intégré, 2) elle ne détecte que les ADN intégrés car du fait de l'utilisation de la séquence lambda T, les ADN non intégrés ne pourront pas être amplifiés durant la PCR en temps réel car n'ayant pas été amplifiés durant la première PCR, l'amorce correspondant à la séquence lambda T ne se fixera pas et 2) elle peut également permettre d'obtenir des informations sur les sites d'intégration du virus, par séquençage haut débit des produits de PCR nichée.

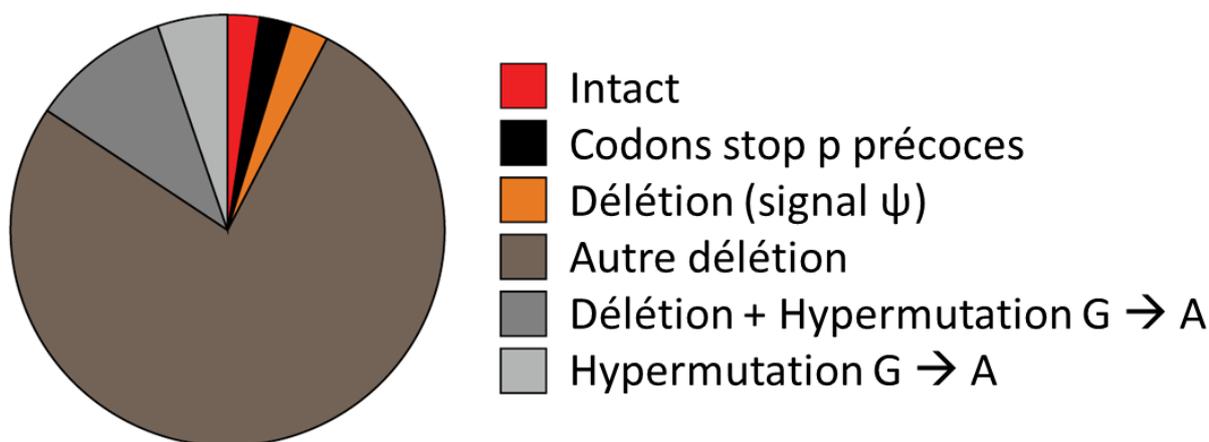
- Quantification des ADN circulaires à 1 ou 2-LTR :

Il s'agit de deux ADN dits épisomaux, qui sont principalement retrouvés dans les cellules nouvellement infectées (Butler et al., 2001). Ces deux types d'ADN sont rarement quantifiés, en dehors de certains travaux de recherche.

La PCR de l'ADN circulaire à 2-LTR peut être utilisée comme un marqueur d'infection récente mais également sur les cellules traitées par un inhibiteur d'intégrase car les molécules de cette classe tendraient à augmenter la proportion de cercles 2-LTR dans le noyau (Thierry et al., 2015). La PCR utilise alors une amorce anti-sens dans la région U3 du LTR, une amorce sens dans la région U5 du LTR et une sonde chevauchant la jonction U5-U3. Cette PCR ne peut amplifier que les cercles à 2-LTR qui présente deux régions LTR collées et donc les régions suivantes : U3-R-U5-U3-R-U5 alors que les autres ADN n'ont pas cette jonction U5-U3.

Toutes ces techniques ont en commun de surestimer le réel réservoir du VIH réactivable puisqu'elles peuvent amplifier des provirus dits défectifs, c'est-à-dire non capables de se répliquer, car porteurs de mutations G vers A, de larges délétions dans le génome, des « indels » (des petites insertions ou délétions) ou des délétions dans le signal de « packaging » (Figures 15 et 16).

Récemment de nouvelles techniques de quantification du réservoir latent ont été décrites. Ces techniques se basent sur le séquençage complet, ou quasi-complet, du provirus (Bruner et al., 2016; Hiener et al., 2017). Des dilutions limites des échantillons sont réalisées avant amplification par PCR pour n'amplifier qu'un génome proviral par réaction de PCR. De nombreuses réactions de PCR sont réalisées en parallèle afin d'amplifier les différents provirus présents dans l'échantillon de départ. Les produits de PCR sont ensuite séquencés par une technologie de séquençage haut débit et les séquences obtenues sont analysées pour identifier les provirus intacts et les provirus défectifs, et leur proportion respective (Bruner et al., 2019) (Figure 15).



**FIGURE 15 : REPARTITION DES PROVIRUS DU VIH-1**

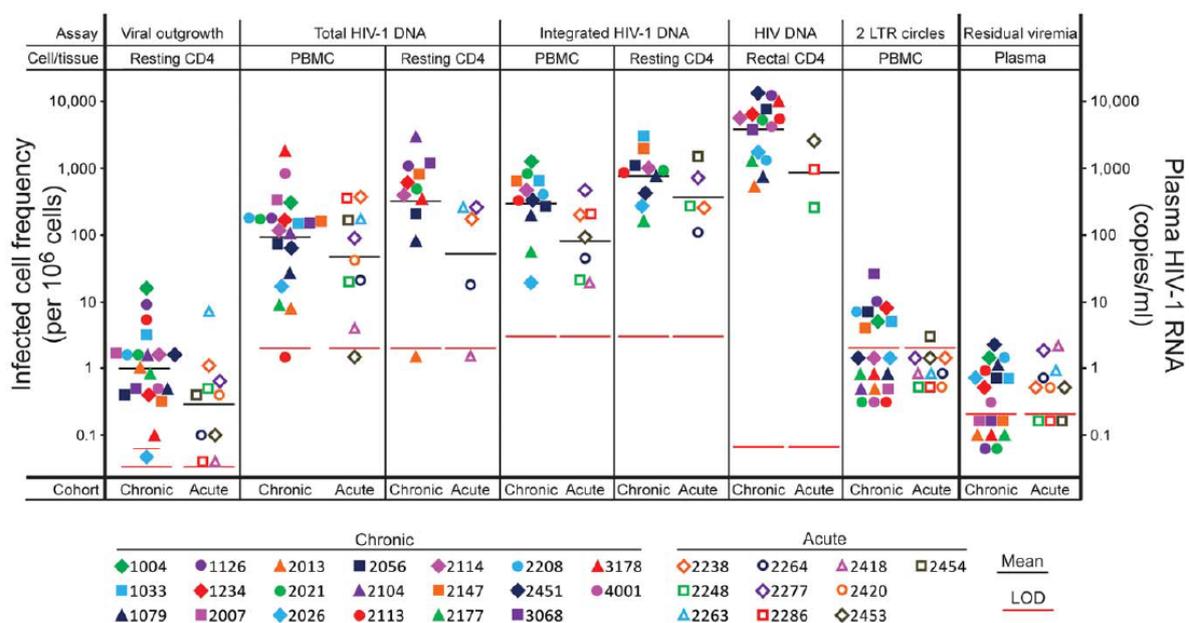
*Les provirus du VIH-1 amplifiés à partir des lymphocytes de patients sont majoritairement défectifs, du fait de délétions internes et/ou d'hypermutations G vers A induites par les protéines cellulaires APOBEC3GF. D'autres formes de provirus défectifs sont décrites, des délétions dans le signal de packaging  $\psi$  et l'introduction de codons stop précoces dans les régions codantes. (Figure adaptée de Bruner et al., 2019)*

Pour quantifier les réservoirs latents dans le VIH-2, seule la PCR de l'ADN total du VIH-2 est utilisée, les autres techniques n'ayant pas encore été développées (Bertine et al., 2017). Notre connaissance du réservoir latent du VIH-2 est principalement limitée au réservoir viral dans les CSMP, peu de prélèvements profonds ayant été analysés. La taille de ce réservoir serait réduite chez les PVVIH-2 par rapport aux PVVIH-1 mais la différence n'est pas retrouvée dans d'autres études, notamment quand les PVVIH-1 et PVVIH-2 sont appariés par le taux de CD4, leur âge et la durée d'infection (Gottlieb et al., 2008a; Gueudin et al., 2008).

Une étude a rapporté les sites d'intégration du VIH-2 dans le génome humain mais cela n'a été fait que sur des cellules infectées *in vitro* par une seule souche de VIH-2 (MacNeil et al., 2006). Une autre étude de la même équipe a montré que le pourcentage d'ADN intégré ne différait pas entre les PVVIH-1 et les PVVIH-2, mais que la quantité d'ARN messagers LTR-Gag était plus faible chez les PVVIH-2 (MacNeil et al., 2007).

Enfin, certaines équipes utilisent des mesures des ARN viraux pour estimer le réservoir viral activé à un moment M. Ces PCR vont amplifier soit l'ARN plasmatique par des techniques ultrasensibles, soit les ARN messagers associés aux cellules, aussi appelés « transcrits viraux », qu'ils soient peu, multi- ou non épissés (Pasternak et al., 2013).

Ces techniques de RT-PCR ont été appliqués à la fois aux techniques de culture (VOA), afin de détecter plus précocement les puits dans lesquels il y a une production virale, et ont également été utilisés pour détecter ces transcrits viraux dans les cellules des patients.



**FIGURE 16 : COMPARAISON DES TECHNIQUES DE QUANTIFICATION DU RESERVOIR LATENT DU VIH-1**

Le réservoir latent a été quantifié par différentes techniques au sein d'une cohorte de 20 patients traités par ARV au stade chronique de l'infection et de 10 patients traités au stade précoce. La virémie de ces patients était indétectable depuis 8 et 6 ans, en médiane, respectivement. (Figure reproduite d'Eriksson et al., 2013)

## 9. Physiopathologie de l'infection par le VIH-2

### 9.1. Histoire naturelle de l'infection par le VIH-2

#### a) Infections chroniques

Rapidement après la description du VIH-2, il fut remarqué que la progression clinique était plus lente chez les PVVIH-2 que chez les personnes vivant avec le VIH-1 (PVVIH-1), les PVVIH-2 pouvant rester asymptomatiques plus d'une dizaine d'années (Grassly et al., 1998; Thiébaud et al., 2011). De plus, les charges virales (CV) plasmatiques du VIH-2 sont fréquemment indétectables au moment du diagnostic, même en l'absence de traitement antirétroviral (Matheron et al., 2003; Popper et al., 1999). L'infection par le VIH-2 est ainsi souvent considérée comme un modèle atténué d'infection rétrovirale (Tableau 3).

Au cours de l'histoire naturelle de l'infection par le VIH-2, un maintien prolongé du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est observé. La baisse annuelle du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> serait 4 à 5 fois plus lente que dans le cas d'une infection par le VIH-1 (-10 CD4/mm<sup>3</sup>/an versus -50/mm<sup>3</sup>/an; Gottlieb et al., 2002). Néanmoins, à charge virale plasmatique équivalente, la baisse du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est aussi rapide que lors des infections par le VIH-1 (Gottlieb et al., 2002) et la reconstitution immunitaire sous traitement antirétroviral efficace est plus limitée (+50 CD4/mm<sup>3</sup>/an versus +150 CD4/mm<sup>3</sup>/an) (Benard et al., 2011; Benson et al., 2002; Ekouevi et al., 2014; Gathe et al., 2004; Ruelle et al., 2008).

Une classification des PVVIH-2 selon leur profil de progression immunologique ou virologique a été proposée, en s'appuyant sur la littérature et par analogie avec la classification utilisée en France pour les PVVIH-1 (Grabar et al., 2009).

Des profils particuliers de PVVIH-2 peuvent être définis :

- « HIV Controller » (patient asymptomatique, infecté depuis plus de 10 ans avec une charge virale VIH-2 inférieure à 500 copies/mL) : 9,1% des patients inclus dans la cohorte ANRS CO5 VIH-2 (Thiébaud et al., 2011)

- « Long Term Non Progresser » (LTNP) (patient asymptomatique, infecté depuis plus de 8 ans avec un nadir de CD4 supérieur à 500/mm<sup>3</sup>, en l'absence de tout traitement antirétroviral) : 6,1% des patients dans la cohorte ANRS CO5 VIH-2 (Thiébaud et al., 2011)
- « Elite controllers » (patients contrôlant spontanément leur réplication virale (charge virale plasmatique inférieure à 100 copies/mL)) : estimé à 8,8% (Thiébaud et al., 2011)
- « Elite LTNP » (patients avec un nadir de CD4 supérieur à 600/mm<sup>3</sup> et sans déclin du nombre de CD4 en l'absence de tout traitement antirétroviral) : estimé à 1,5% dans la cohorte ANRS CO5 VIH-2 (Thiébaud et al., 2011)

Les patients LTNP et « HIV controllers » sont 10 à 100 fois plus nombreux parmi les PVVIH-2 que les PVVIH-1, illustrant bien le caractère moins agressif des infections par le VIH-2 (Grabar et al., 2009; Thiébaud et al., 2011).

Au sein de la cohorte ANRS CO5 VIH-2, dont le laboratoire de virologie du CHU Bichat-Claude Bernard assure la coordination virologique, 70% des patients ont une CV indétectable à l'inclusion, en l'absence de traitement par ARV.

La raison de cette différence de pathogénicité entre le VIH-1 et le VIH-2 est encore mal connue. Plusieurs théories sont évoquées : 1) des facteurs génétiques liés à l'hôte, 2) des facteurs viraux et 3) des différences dans la réponse immunitaire, notamment dans la réponse immunitaire innée ; les différents facteurs pouvant être intriqués.

## b) Transmission

Les taux de transmission du VIH-2 sont plus faibles que ceux du VIH-1, que ce soit par voie sexuelle ou materno-fœtale (Kanki et al., 1994; Matheron et al., 1990). En l'absence de traitement antirétroviral, le taux de transmission materno-fœtale du VIH-1 est de 20 à 25% (80% de ces transmissions ayant lieu au moment de l'accouchement, 20% durant la grossesse). Des études ont démontré que le taux de transmission materno-fœtale du VIH-2, en l'absence de traitement antirétroviral et de mesures de prévention, était inférieure à 5% (Adjorlolo-Johnson et al., 1994; Matheron et al., 1990). En France, l'immense majorité des

femmes enceintes infectées par le VIH est suivie au sein d'une cohorte appelée EPF (Enquête de Périnatalité Française). Entre 1986 et 2007, seulement deux cas de transmission materno-fœtale du VIH-2 ont été rapportés dont l'un suite à une primo-infection chez la mère durant la grossesse, situation particulièrement à risque du fait des charges virales plasmatiques plus élevée (Burgard et al., 2010). Cette étude de cohorte a confirmé que le taux de transmission materno-fœtale du VIH-2 était bien inférieure à 5%, en l'absence de traitement antirétroviral. Cette différence dans le taux de transmission est probablement due aux différences de réplication des deux virus.

Depuis la mise en place de mesures pour limiter le taux de TME (instauration du traitement antirétroviral chez les femmes enceintes infectées par le VIH, idéalement avant la conception, et/ou perfusion d'AZT au cours du travail et/ou mise sous traitement antirétroviral du nouveau-né pendant 2-4 semaines et contre-indication de l'allaitement), les transmissions de la mère à l'enfant sont devenues exceptionnelles en France et sont davantage dues à des mères non suivies durant leur grossesse qu'à de réels échecs de prise en charge thérapeutique (Mandelbrot et al., 2015).

### c) Primo-infection

Seulement trois cas de primo-infections par le VIH-2 ont été décrits dans la littérature, deux comprenant uniquement des analyses sérologiques et l'un incluant également une étude de la réplication virale par biologie moléculaire (mesures de la charge virale plasmatique et du niveau d'ADN proviral) (Besnier et al., 1990; Cazals et al., 2018; Christiansen et al., 1996).

Comme décrit lors des infections chroniques, la réplication virale du VIH-2 semble limitée au cours de la primo-infection. Dans le dernier cas rapporté (Annexe 3), le patient présentait un fort taux de cellules T CD4 au moment de la découverte de l'infection, une caractéristique également décrite dans une analyse de cohorte en Guinée-Bissau récemment publiée (Cazals et al., 2018; Esbjörnsson et al., 2018).

	<b>VIH-1</b>	<b>VIH-2</b>
<b>Réplication virale</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Primo-infection : charges virales plasmatiques pouvant dépasser 6 logs<sub>10</sub> copies/mL</li> <li>• Infection chronique : <ul style="list-style-type: none"> <li>○ CV à l'équilibre : 4 à 5 log<sub>10</sub> copies/mL</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Primo-infection : peu de cas décrits, charges virales probablement plus faibles (Burgard et al., 2010; Cazals et al., 2018)</li> <li>• Infection chronique : <ul style="list-style-type: none"> <li>○ CV plasmatiques 30 fois inférieures au VIH-1 (Popper et al., 1999)</li> <li>○ 40 à 70% de patients avec des CV plasmatiques indétectables (Popper et al., 1999; Visseaux et al., 2016a)</li> <li>○ Si CV positive : médiane à 3 log<sub>10</sub> copies/mL (Matheron et al., 2003)</li> </ul> </li> </ul>
<b>Evolution des patients en l'absence de traitement antirétroviral</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Délai médian jusqu'au stade SIDA : 6,2 ans (Esbjörnsson et al., 2018)</li> <li>• Médiane de survie : 8,2 ans (Esbjörnsson et al., 2018)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Délai médian jusqu'au stade SIDA : 14,3 ans (Esbjörnsson et al., 2018)</li> <li>• Médiane de survie : 15,6 ans (Esbjörnsson et al., 2018)</li> </ul>
<b>Taux de transmission en l'absence de mesures de prévention et de traitement</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transmission materno-foetale : 20 à 25% (Adjorlolo-Johnson et al., 1994)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Taux de transmission par voie sexuelle 5 à 9 fois plus faible que pour le VIH-1 (Kanki et al., 1994)</li> <li>• Transmission materno-foetale : inférieure à 5% (Adjorlolo-Johnson et al., 1994; Burgard et al., 2010; Matheron et al., 1990)</li> </ul>
<b>Taux de lymphocytes T CD4+ à la découverte de l'infection par le VIH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fréquemment inférieure à 500 CD4/mm<sup>3</sup> même lorsque l'infection est diagnostiquée précocement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fréquemment supérieure à 500 CD4/mm<sup>3</sup> même si le diagnostic a lieu à distance de l'infection (Esbjörnsson et al., 2018)</li> </ul>
<b>Evolution des lymphocytes T CD4+ au cours de l'infection</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En l'absence de traitement (Gottlieb et al., 2002) : <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Baisse de 50 CD4/mm<sup>3</sup>/an</li> </ul> </li> <li>• Sous traitement : reconstitution immunitaire importante (+150 CD4/mm<sup>3</sup>/an)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En l'absence de traitement (Gottlieb et al., 2002) : <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Baisse de 10 CD4/mm<sup>3</sup>/an</li> <li>○ Baisse équivalente au VIH-1 quand CV appariées</li> </ul> </li> <li>• Sous traitement (Matheron et al., 2006, 2018) : reconstitution immunitaire plus limitée (+40 à +80 CD4/mm<sup>3</sup>/an selon le 3<sup>e</sup> agent de la trithérapie)</li> </ul>
<b>Fréquence des « Long-Term Non Progressors » et « HIV controllers » au sein des cohortes françaises</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• « Long-Term Non Progressors » : 0,43% (Grabar et al., 2009)</li> <li>• « HIV controllers » : 0,22% (Grabar et al., 2009)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• « Long-Term Non Progressors » : 6,1% (Thiébaud et al., 2011)</li> <li>• « HIV controllers » : 9,1% (Thiébaud et al., 2011)</li> </ul>

**TABLEAU 3 : DIFFERENCES CLINIQUES, IMMUNOLOGIQUES ET VIROLOGIQUES ENTRE LES INFECTIONS PAR LE VIH-1 ET PAR LE VIH-2.**

Définitions utilisées dans ce tableau : « HIV controllers » : patients asymptomatiques, infectés il y a plus de 10 ans, avec plus de 90% de leurs charges virales plasmatiques inférieures à 500 copies/mL, et « Long Term Non Progressors » : patients

*asymptomatiques, infectés il y a plus de 8 ans, avec un nadir de lymphocytes T CD4+ supérieur à 500/mm<sup>3</sup>, en l'absence de traitement antirétroviral.*

## 9.2. Facteurs pouvant expliquer la moindre pathogénicité du VIH-2

### a) Activation immunitaire

L'activation immunitaire est un médiateur essentiel de l'immunopathologie des infections par le VIH, causant un épuisement immunitaire, mais est également un prédicteur de la progression des infections par le VIH-1 (Miedema et al., 2013; Nowroozalizadeh et al., 2009). Une étude de cohorte explorant la co-expression de HLA-DR et CD38 a montré un profil d'activation moindre chez les PVVIH-2 que chez les PVVIH-1, ce qui est en accord avec les études montrant une progression plus lente des PVVIH-2 vers le stade SIDA (Esbjörnsson et al., 2018; Sousa et al., 2002; Zheng et al., 2004). Néanmoins, chez les PVVIH-2 avec une charge virale plasmatique élevée, le niveau d'activation immunitaire ne différait pas de celui des PVVIH-1 (Giorgi et al., 1999; Zheng et al., 2004).

Le plus faible niveau d'activation immunitaire chez les PVVIH-2 pourrait expliquer le maintien prolongé du taux de lymphocytes T observé au cours de l'infection VIH-2. La fonction thymique est davantage préservée chez les PVVIH-2 que les PVVIH-1, permettant de conserver une meilleure capacité répliquative et une moindre différenciation des lymphocytes T CD4, et d'induire des réponses plus polyfonctionnelles (Alatrakchi et al., 2006).

### b) Réponse lymphocytaire T

Des différences majeures dans la réponse immunitaire au cours des infections par le VIH-1 et par le VIH-2 ont été observées, les réponses immunitaires spécifiques semblant notamment mieux préservées lors des infections par le VIH-2. Lors d'une infection par le VIH-2, les lymphocytes T CD4 spécifiques du VIH sont moins différenciés, conservent une meilleure capacité répliquative et induisent davantage de réponses polyfonctionnelles avec une plus grande diversité de cytokines produites (Gautier et al., 2007).

En revanche, les populations T CD8 spécifiques du VIH diffèrent entre PVVIH-1 et PVVIH-2, elles sont davantage oligoclonales chez les PVVIH-1 et polyclonales chez les PVVIH-2 (Lopes et al., 2003). La plus grande diversité dans les TCR exprimés à la surface des T CD8 chez les PVVIH-2 pourrait limiter l'échappement du virus à la réponse lymphocytaire T cytotoxique (CTL) par le biais de mutations, tel que décrit dans les infections par le VIH-1. Cette plus grande variété des réponses T CD8 pourrait être due au maintien des lymphocytes T CD4, et notamment des lymphocytes T CD4 auxiliaires, au début de l'infection chez les PVVIH-2.

### c) Rôle des protéines virales accessoires et des facteurs de restriction antirétrovirale

De manière générale, la plupart des facteurs de restriction antirétrovirale exprimés par les cellules humaines infectées présentent une activité plus importante contre le VIH-2 que contre le VIH-1, ce qui pourrait contribuer à la plus faible capacité répliquative du VIH-2.

Cela peut être dû à une moindre neutralisation par les protéines virales du VIH-2. Ainsi, la protéine Vif du VIH-2 dégrade moins efficacement les protéines cellulaires APOBEC humaines, et cela est confirmée par le fait, qu'en plus du réservoir viral plus réduit, un plus grand nombre de provirus défectifs est observé dans les infections par le VIH-2 (Bertine et al., 2015). La tetherine empêche le bourgeonnement des virions depuis la membrane cellulaire, ce facteur de restriction est contrecarré par les protéines virales Nef et Env des VIH mais également par Vpu, protéine spécifique au VIH-1, ce qui pourrait encore diminuer l'activité de la tetherine dans les infections par les VIH-1 (Jia et al., 2009).

Dans certains cas, il peut y avoir une activité préférentielle des facteurs de restriction antirétrovirale sur le VIH-2, c'est notamment le cas pour TRIM5 $\alpha$  dont l'activité est négligeable pour le VIH-1 et qui se fixe davantage sur la capsid du le VIH-2 (Onyango et al., 2010). Enfin, cela peut être dû à des mécanismes d'action différents des protéines virales. Ainsi, la protéine Nef du VIH-2 entraîne une régulation négative du complexe TCR dans les cellules T CD4 infectées, tandis que la protéine Nef du VIH-1 semble avoir perdu cette propriété et pourrait donc entraîner une activation immunitaire chronique, favorisant l'épuisement immunitaire (Laguet et al., 2010).

## d) Réponses immunitaires humorales

Chez la majorité des PVVIH-1, des anticorps neutralisants de forte puissance mais dirigés uniquement contre les virus autologues sont synthétisés avec, tout au long de l'infection, un échappement viral par le biais de mutations dans l'enveloppe virale à la pression induite par ces anticorps neutralisants de spécificité restreinte (Albert et al., 1990; Arendrup et al., 1992; Montefiori et al., 1996). Parmi les PVVIH-2, les anticorps neutralisants semblent capables de neutraliser une plus grande proportion de virus que chez les PVVIH-1 (Rodriguez et al., 2007; Wei et al., 2003b). D'un autre côté, l'étendue de la réponse humorale est significativement plus importante chez les PVVIH-1, ce qui pourrait être expliqué par la nécessité d'un cocktail complexe d'anticorps afin de pouvoir neutraliser davantage de virions car les anticorps ont une spécificité plus restreinte (Ozkaya Sahin et al., 2012; Rodriguez et al., 2007).

La plus grande sensibilité des quasi-espèces du VIH-2 à la neutralisation humorale peut être au moins partiellement expliquée par un plus faible nombre de sites de glycosylation dans la boucle V3 de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-2 par rapport au VIH-1 (2-3 versus 4-5), ce plus faible nombre de glycosylation entraînant une accessibilité accrue aux anticorps neutralisants (Popper et al., 2000). Différentes études ont tenté de relier la plus forte neutralisation humorale du VIH-2 à une plus forte pression de sélection dans le gène *env* qui limiterait l'apparition de mutations d'échappement à la CTL. Cependant, si certains auteurs ont effectivement décrit une forte pression de sélection négative dans *env* (Skar et al., 2010), d'autres ont identifié un plus fort taux d'évolution dans *env* pour le VIH-2 que pour le VIH-1 sans pour autant mettre en évidence d'échappement immunitaire à la CTL (Shi et al., 2005).

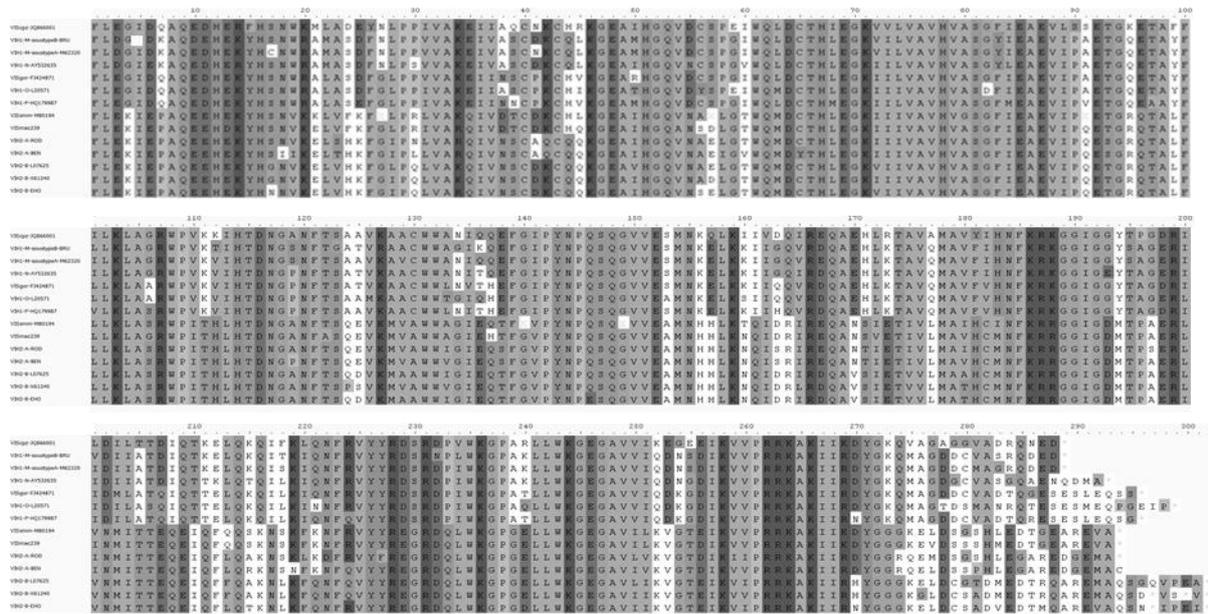
## 10. Régions LTR et intégrase des VIH-2

### 10.1. Intégrase du VIH-2

L'intégrase du VIH-2 est une protéine d'environ 300 acides aminés qui joue un rôle crucial dans la réplication virale. Comme l'intégrase du VIH-1, elle possède deux activités enzymatiques distinctes : 1) une activité exonucléasique (aussi appelée « 3'-processing ») au cours de laquelle deux nucléotides sont retirés aux deux extrémités 3' du double brin d'ADN viral, exposant un groupement hydroxyl, et 2) une activité de transfert de brin durant laquelle le groupement hydroxyl permet une attaque nucléophile de l'ADN de la cellule hôte et une intégration de l'ADN viral (Delelis et al., 2008). Des enzymes cellulaires vont alors réparer le site d'intégration, finalisant cette intégration du génome rétroviral.

Une des particularités de l'intégrase du VIH-2 est sa variabilité dans sa longueur en acides aminés. En effet, les différents groupes du VIH-1 ont des longueurs différentes d'intégrase mais la longueur de l'intégrase ne diffère pas entre les sous-types. Ainsi, tous les VIH-1 de groupe M, peu importe leur sous-type, possèdent une intégrase de 288 acides aminés.

Au sein des VIH-2, il existe des variations dans la longueur des intégrases à la fois entre les groupes et au sein de ces groupes. Les VIH-2 appartenant au groupe A ont tous une intégrase de 293 acides aminés, tandis que ceux du groupe B varient entre 287, 301 ou 306 acides aminés, selon la présence ou non de codons stop précoces (Figure 17).



**FIGURE 17 : ALIGNEMENT DES INTEGRASES DE DIFFERENTS RETROVIRUS**

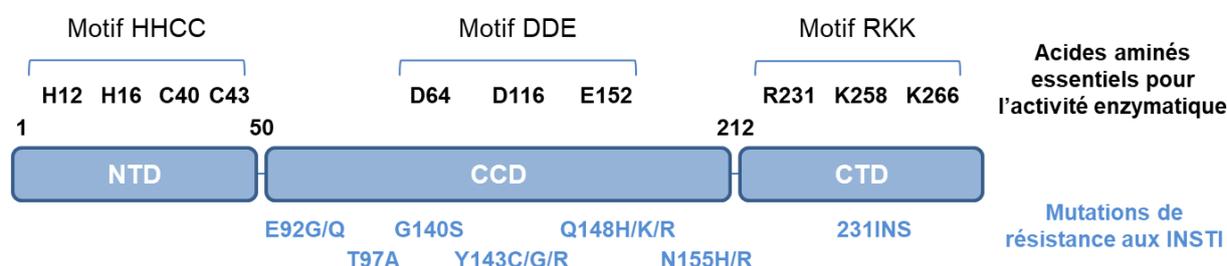
Les séquences d'acides aminés de différents rétrovirus (VIH-1, VIH-2 et VIS de différents primates : macaque, sooty mangabey, gorille et chimpanzé, appelés respectivement SIVmac, SIVsmm, SIVgor et SIVcpz) ont été alignées avec le logiciel Aliview v1.21.

Abréviations : \* : codon stop ; VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine, et VIS : Virus de l'Immunodéficience Simienne.

L'intégrase des VIH-2, comme celle des VIH-1, peut être subdivisée en 3 domaines structurellement et fonctionnellement distincts (Figure 18):

- le domaine N-terminal (ou « N-terminal domain », CTD, nucléotides 1 à 50) : composé de trois hélices  $\alpha$  et stabilisé par un atome de zinc au cœur du motif HHCC (Eijkelenboom et al., 1997). Le CTD permet notamment la multimérisation de l'intégrase, nécessaire à son activité, la forme tétramérique étant la forme active de l'intégrase.
- le domaine du cœur catalytique (ou « catalytic core domain », CCD, nucléotides 51 à 121) : il s'agit du domaine le plus conservé entre les différents rétrovirus. Le cœur catalytique de la protéine est constitué par 3 acides aminés invariables : D64, D116 et D152.
- le domaine C-terminal (ou « C-terminal domain », CTD, à partir du 213<sup>e</sup> nucléotide) : c'est le domaine dont le rôle est le moins bien caractérisé. Il serait impliqué dans la liaison,

spécifique ou non, à l'ADN, notamment via le motif RKK : R231, K258 et K266. Il prend la forme d'un domaine SH3, un tonneau constitué de 2 feuillets bêta anti-parallèles (Figure 19)



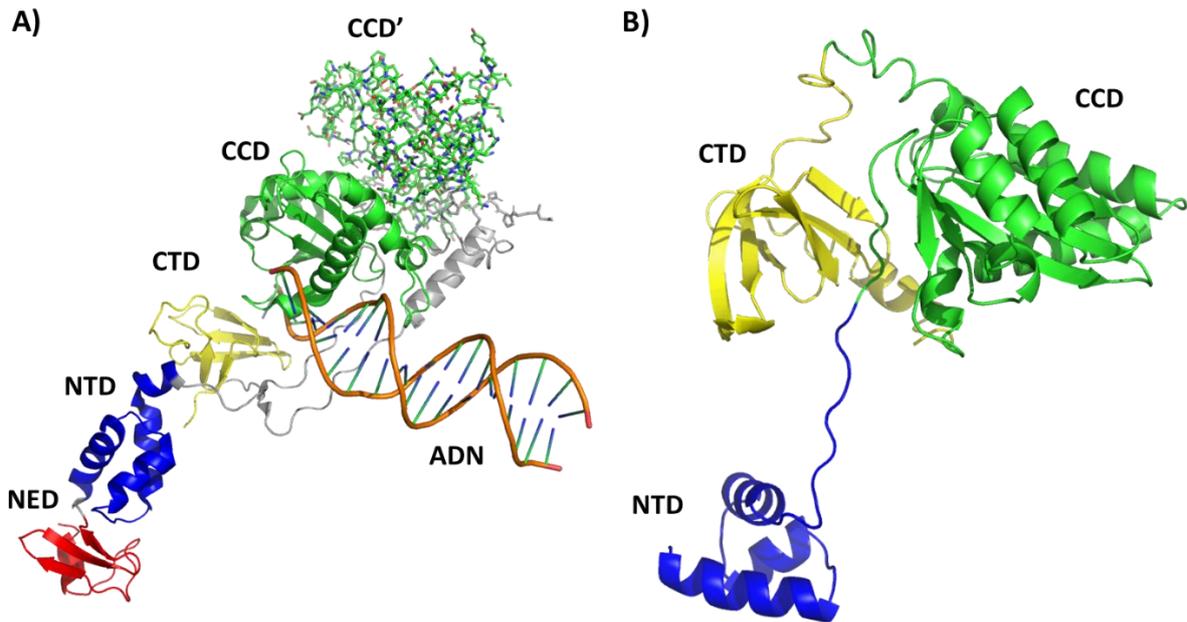
**FIGURE 18: DESCRIPTION DE L'INTEGRASE DU VIH-2 ET DES PRINCIPALES MUTATIONS DE RESISTANCE AUX INHIBITEURS D'INTEGRASE**

Représentation des trois domaines structuraux de l'intégrase (NTD, CCD et CTD) avec les motifs critiques pour son activité enzymatique, ainsi que les différentes mutations associées à la résistance aux inhibiteurs d'intégrase.

Abréviations : CCD : « Core Catalytic Domain », CTD : « C-terminal Domain » ; INSTI : « Integrase Strand Transfer Inhibitor » ou inhibiteur d'intégrase ; et NTD : « N-terminal Domain ».

La protéine cellulaire LEDGF (« lens-epithelium derived growth factor », aussi dénommée p75) se lie aux domaines CCD et NTD de l'intégrase des VIH. La fixation au domaine CCD est nécessaire à son activité, tandis que celle au niveau du NTD permet une liaison de plus haute affinité (Cherepanov et al., 2005; Hare et al., 2009). Cette liaison de LEDGF à l'intégrase est très importante puisque la protéine LEDGF est associée à la chromatine et permettrait de rapprocher l'intégrase virale de zones transcriptionnellement actives.

Tout comme pour le VIH-1, la structure de l'intégrase entière du VIH-2 n'a pas été cristallisée à ce jour. Les structures prédites de l'intégrase du VIH-2 sont donc basées sur les régions cristallisées du VIH-2 (NTD et CCD), et sur l'intégrase du PFV (« prototype foamy virus »), un rétrovirus dont l'intasome a été cristallisé et qui sert de référence pour les études sur l'intégrase des VIH-1 et VIH-2 (Hare et al., 2010) (Figure 19).



**FIGURE 19 : STRUCTURES DES INTEGRASES DU PFV ET DU VIH-2.**

A) Structure de l'intégrase du prototype foamy virus (PFV). Cette structure a été déterminée par cristallographie (identifiant PDB : 3L2R ; Hare et al., 2010). La structure représentée est celle de l'intasome en complexe avec du magnésium. L'intégrase du PFV possède une partie en amont du NTD, le NED ou « NTD Extension Domain », et des séquences espaçant les domaines de son intégrase, appelées « linkers », colorées en gris dans cette figure. La partie notée CCD' correspond au domaine CCD d'une autre molécule d'intégrase. En effet, la structure fonctionnelle de l'intégrase du PFV est l'intasome qui se compose de deux dimères d'intégrase, comme pour les VIH. B) structure de l'intégrase de la souche ROD du VIH-2. Cette structure a été prédite par homologie, à l'aide de la suite I-TASSER, aucune structure complète de l'intégrase du VIH-2 n'ayant été cristallisée à ce jour.

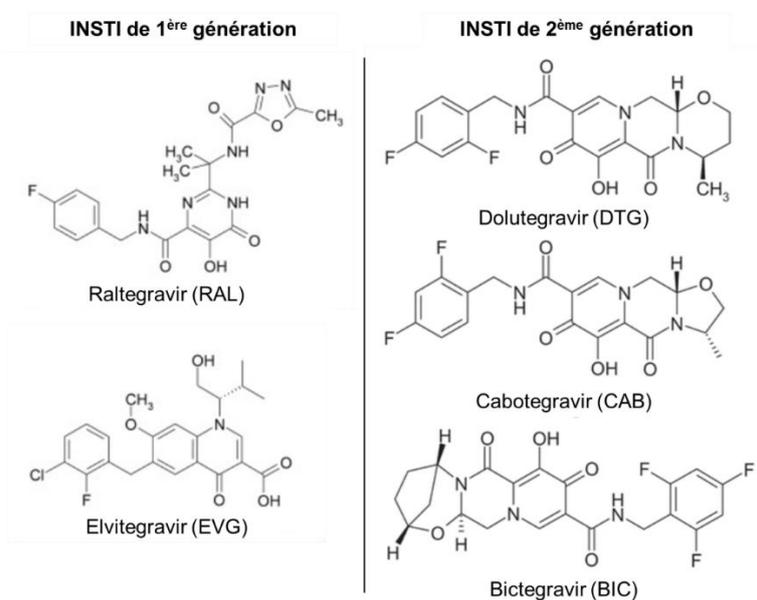
Abréviations : CCD : « Catalytic Core Domain » ; CTD : « C-terminal Domain » ; NED : « NTD Extension Domain » et NTD : « N-terminal Domain ».

## 10.2. Inhibiteurs de l'intégrase

L'intégration étant une étape critique pour la réplication virale, de nombreuses recherches pour identifier des composés inhibant les activités enzymatiques de l'intégrase virale ont été menées. Actuellement, une seule classe d'inhibiteurs de l'intégrase est commercialisée, celle des inhibiteurs de transfert de brin de l'intégrase (aussi appelés INSTI pour « Integrase Strand transfer Inhibitors »). Ces molécules vont se fixer de façon très spécifique sur les complexes intégrase-ADN viral, au niveau du motif DDE, le site catalytique de l'intégrase (Espeseth et al., 2000). La fixation de l'INSTI va inhiber la fixation de l'ADN de la cellule hôte et donc

inhiber sélectivement la réaction de transfert de brin (Delelis et al., 2008). De plus, les INSTI chélatent les cations divalents nécessaires à l'activité de l'enzyme,  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$  (Delelis et al., 2008).

Les molécules de la classe des INSTI ont été classées en 2 générations, selon leur puissance antirétrovirale et leur barrière génétique qui va en augmentant au fil des générations (1<sup>ère</sup> génération : raltegravir et elvitegravir, 2<sup>e</sup> génération : dolutegravir, cabotegravir et bictegravir) (Figure 20). Ces molécules sont récentes puisque la première molécule de cette classe, le raltegravir, n'a été commercialisée qu'en 2007 (Tableau 2). Malgré les différences entre les intégrases du VIH-1 et du VIH-2, le VIH-2 est naturellement sensible aux différents INSTI développés (Roquebert et al., 2008; Smith et al., 2015).



**FIGURE 20 : STRUCTURES DES DIFFERENTS INSTI**

Une autre classe d'inhibiteur d'intégrase est en cours de développement, celle des inhibiteurs du site non catalytique de l'intégrase (ou « Non-Catalytic site Integrase Inhibitors » ou NCINI). Ces molécules sont des inhibiteurs allostériques se fixant sur le dimère d'intégrases virales, au niveau de la poche fixant la protéine cellulaire associée à la chromatine LEDGF (Feng et al., 2015). Cette poche est située dans le domaine CCD mais est distante du site catalytique, et elle est conservée parmi les VIH-1. Les mutations de résistance induites par ces NCINI diffèrent de celles des INSTI, et l'un des intérêts de ces molécules réside dans leur efficacité sur des virus porteurs de mutations de résistance au RAL (Fenwick et al., 2014; Mitchell et al., 2017).

Les molécules de cette classe sont encore en développement pré-clinique, et leur activité serait limitée aux VIH-1, du fait d'une mutation de polymorphisme du VIH-2 au codon 128 de l'intégrase (Christ et al., 2010).

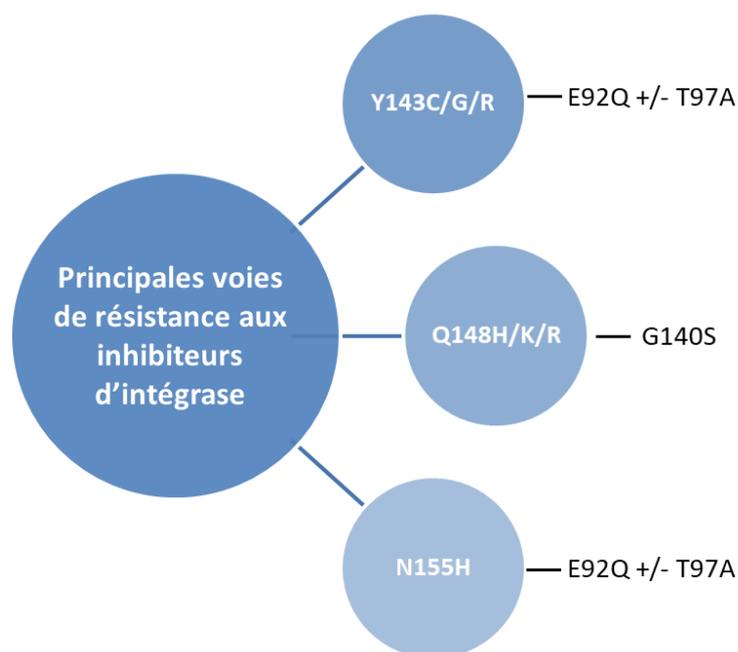
### 10.3. Résistances du VIH-2 aux inhibiteurs de transfert de brin de l'intégrase

Comme pour les autres classes d'antirétroviraux, des mutations de résistance aux INSTI ont émergé chez des patients infectés par le VIH-2 en échec virologique. Ces mutations ont principalement été observées chez des patients ayant précédemment échoué sous d'autres traitements antirétroviraux et chez qui les deux INTI de la trithérapie contenant un INSTI n'étaient plus totalement actifs. La majorité de ces mutations sont retrouvées dans le CCD, près du cœur catalytique, comme pour le VIH-1 (Anstett et al., 2015; Fourati et al., 2015; Smith et al., 2012) (Figures 18 et 21).

Comme pour les résistances aux autres antirétroviraux, la détection des résistances aux INSTI se fait en réalisant un génotype de résistance. Cet examen consiste à amplifier les différents gènes d'intérêt (intégrase, mais aussi TI, protéase et/ou gp105 selon le traitement du patient) à partir d'un prélèvement du patient, le plasma généralement. Le gène séquencé est aligné et les mutations observées dans la séquence virale sont analysées à l'aide d'algorithmes recensant l'ensemble des mutations de résistance connues et leur impact sur la sensibilité aux différents ARV. Différents algorithmes existent, notamment celui de l'Université de Stanford, HIV Drug Resistance, actuellement disponible uniquement pour le VIH-1 (<https://hivdb.stanford.edu/>), et ceux de l'ANRS, qui a édité un algorithme pour l'interprétation des génotypes de résistance du VIH-1 et un autre pour ceux du VIH-2. Ces algorithmes évoluent dans le temps, ils incrémentent régulièrement des nouvelles mutations régulièrement, à la lumière des dernières données (études de cohorte, rapports de cas et/ou données *in vitro* : phénotypes de résistance, expériences de sélection de résistance dans des cultures *in vitro*, etc.).

Les génotypes de résistance sont idéalement réalisés au moment de l'échec virologique car, la capacité répliquative des mutants étant fréquemment diminuée, en l'absence de pression de sélection (c'est-à-dire en l'absence de traitement antirétroviral), le virus sauvage redevient

souvent majoritaire. Or les génotypes de résistance du VIH sont actuellement réalisés par séquençage Sanger, une technologie qui ne détecte que les virus représentant 20% ou plus de la population virale amplifiée. Pour détecter les variants minoritaires (avec des seuils à 1 ou 2%), il faut réaliser ces génotypes de résistance par des techniques de séquençage de haut débit, ce qui n'est actuellement réalisé que dans le cadre de travaux de recherche.



**FIGURE 21 : PRINCIPALES VOIES DE RESISTANCE DU VIH-2 AUX INHIBITEURS D'INTEGRASE.**

Trois voies principales de résistance aux INSTI sont décrites chez le VIH-2 : les substitutions Y143C/R/G, Q148H et N155H. Des mutations secondaires sont décrites, notamment E92Q, T97A et G140S. Les substitutions E92Q et T97A augmentent le niveau de résistance au raltegravir et/ou à l'elvitegravir, tandis que la substitution G140S ne change pas le niveau de résistance mais permet de restaurer la capacité répliquative du mutant Q148H/K/R qui est fortement réduite (Smith et al., 2012).

## 10.4. Région Long Terminal Repeat

La région Long Terminal Repeat (LTR) du VIH-2 est une région nucléotidique d'un peu plus de 800 nucléotides, subdivisée en trois régions aux fonctions différentes : U3, R et U5 (Figure 22). Dans l'ADN proviral, les trois régions sont présentes aux deux extrémités du génome viral et dans le même ordre, tandis que, dans l'ARN viral, le LTR se compose uniquement de R puis U5 en 5' et de U3 puis R en 3'. Tous les rétrovirus présentent ces régions LTR, que ce soient les autres rétrovirus humains (HTLV-1 et HTLV-2) ou les rétrovirus animaux (SIV, Virus de l'Immunodéficience Féline, etc.).

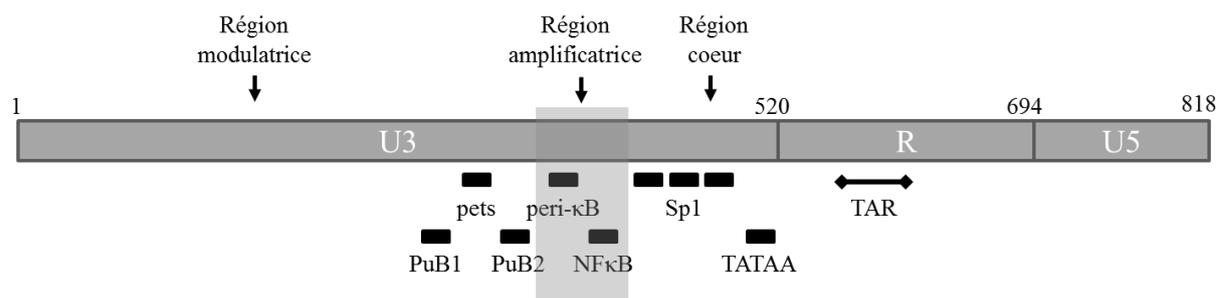
La région U3 est la plus grande (environ 520 nucléotides) et la plus importante dans l'activité promotrice du LTR. Elle est subdivisée en sous-régions *modulatory*, *enhancer* et *core* :

- *Modulatory* (ou modulatrice) : cette région située à l'extrémité 5' de la région U3, est le site de fixation de nombreux facteurs de transcription (FT), responsables d'une régulation positive ou négative de la transcription. Parmi ceux-ci, sont notamment décrits les sites de fixation PuB1 et PuB2 (« Purine Boxes 1 and 2 », deux sites riches en purines) et pets (« peri-Elf1 transcription site »). Ces 3 sites fixent Elf-1, un FT exprimé dans les lymphocytes T activés qui appartient à la famille du proto-oncogène *ETS* (Leiden et al., 1992). La délétion d'un seul de ces sites diminue fortement la transcription virale.
- *Enhancer* (ou amplificatrice) : située entre les régions *modulatory* et *core*, c'est une région très courte (une dizaine de nucléotides) correspondant principalement aux sites de fixation de NFκB et peri-κB chez le VIH-2 (et aux deux ou trois sites de fixation de NFκB chez le VIH-1). Le site de fixation de NFκB va être activé dans tous les types cellulaires, suite à l'expression de NFκB lors de l'activation cellulaire, tandis que le site peri-κB est spécifique des monocytes. De cette différence d'expression des FT selon le type cellulaire découlent de potentielles différences de transactivation du LTR selon la lignée cellulaire infectée.
- *Core* (ou cœur) : située à l'extrémité 3' de la région U3, cette région comprend notamment la « TATAA box » qui est reconnue par l'ARN polymérase II cellulaire, permettant ainsi d'initier la transcription de l'ADN viral en ARN viraux. La sous-

région *core* comprend également 3 sites de fixation de la protéine Sp1 (« Specificity protein 1 »), parfois numérotés Sp1.I à Sp1.III. La protéine cellulaire Sp1 est ubiquitaire.

La région R contient notamment la séquence TAR (« Tat-Activated Region ») et la séquence de polyadénylation. La structure secondaire de la région TAR est fondamentale pour la reconnaissance de la protéine virale transactivatrice Tat. La région TAR diffère entre les VIH-1 et VIH-2, elle possède une seule boucle de deux à trois nucléotides chez le VIH-1 et deux boucles chez le VIH-2 (Rhim and Rice, 1995). Il est à noter que c'est la seule région du LTR qui est présente aux deux extrémités du génome à ARN.

La région U5 est la région la plus conservée et la plus courte du LTR, sa fonction est encore mal connue. Elle se termine immédiatement en amont du tLys PBS (« tLys Primer Binding Site »), site du début de la rétrotranscription.



**FIGURE 22 : SCHEMA DE LA REGION LTR DU VIH-2.**

Représentation des trois régions du LTR : R, U3 et U5. Les boîtes noires correspondent aux sites de fixation de facteurs de transcription cellulaires décrits, et TAR à la « Tat-Activated Region » qui fixe la protéine virale transactivatrice Tat. Les positions nucléotidiques indiquées sont celles de la souche de référence du groupe A, « ROD ». Adapté d'après Krebs et al., 2001.

## 10.5. Fonctions de la région Long Terminal Repeat

Le LTR est une région majoritairement non codante mais qui est impliquée dans de nombreuses étapes du cycle viral. Des mutations dans le LTR peuvent donc avoir un impact sur toutes les étapes suivantes :

- La réactivation du provirus, décrite au paragraphe 6.4
- Les activités de la protéine Nef : Le gène *Nef* est partiellement encodé dans la région U3 du LTR en 3' (Laguette et al., 2010). Cette protéine est impliquée dans la dissémination virale, l'infectivité des virions et la régulation négative (« down-regulation ») du nombre de récepteurs du VIH et des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité exposées à la surface de la cellule infectée.
- L'intégration du provirus : l'activité exonucléasique en 3' de l'intégrase du VIH permet le clivage de quelques nucléotides aux deux extrémités du LTR afin de pouvoir intégrer le génome viral au génome humain.
- La polyadénylation de l'ARN viral : cette activité est dépendante de l'intégrité de la séquence poly-A présente dans la région R du LTR.

## Objectifs

---

Malgré une grande similarité structurale avec le VIH-1, le VIH-2 est responsable d'une infection rétrovirale qui est considérée atténuée, du fait de l'évolution plus lente des patients infectés vers le stade SIDA en l'absence de traitement, d'une réplication virale réduite et de plus faibles taux de transmission.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la physiopathologie diminuée de l'infection par le VIH-2, dont une réponse immunitaire précoce plus efficace et une efficacité plus importante des facteurs de restriction antirétrovirale. Nous nous sommes interrogés sur le potentiel rôle des mutations dans le génome viral sur la réplication virale. Nous avons donc étudié deux régions impliquées dans l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire et dans la réactivation du provirus : l'intégrase et la région Long Terminal Repeat.

L'objectif de travail de cette thèse était : i) d'étudier l'activité de l'intégrase du VIH-2, et les impacts des mutations de résistance, ii) d'étudier la variabilité dans la région Long Terminal Repeat, la région promotrice du VIH-2, et son association avec le niveau de transcription virale.

Dans la première partie de notre travail, nous avons amélioré une technique d'isolement de souches du VIH-2 à partir de prélèvements de patients, afin de pouvoir étudier phénotypiquement ces virus.

Dans la deuxième partie, nous avons étudié la sensibilité phénotypique aux inhibiteurs de transfert de brin de l'intégrase de différents virus isolés chez des patients en échec virologique de traitements comprenant un inhibiteur d'intégrase.

Dans une troisième partie, nous avons construit des virus comprenant des insertions ou des mutations ponctuelles dans le gène de l'intégrase, afin d'étudier l'impact de ces mutations sur la réplication virale, mais aussi sur la sensibilité aux inhibiteurs d'intégrase et la structure de la protéine.

Enfin, dans la dernière partie de notre travail, nous avons déterminé la variabilité du VIH-2 dans la région Long Terminal Repeat dans une cohorte de patients infectés par le VIH-2 et naïfs d'antirétroviraux. Nous avons également quantifié le réservoir viral dans les CSMP de ces patients, et mesurer l'activité transcriptionnelle de ces LTR, afin de mettre en évidence une éventuelle association entre la variabilité du LTR et des différences dans la taille du réservoir viral et/ou des modifications de l'activité transcriptionnelle de la région LTR.

# Résultats

---

## 1. Premier article

### **Amélioration du taux de succès des cultures de VIH-2 par une purification préalable des échantillons à l'aide de billes paramagnétiques anti-CD44**

**Efficiency of HIV-2 cultures from clinical isolates is enhanced after purification by anti-CD44 microbeads**

Quentin Le Hingrat, Marine Perrier, Gilles Collin, Suzon Drumard, Alexandre Storto, Mélanie Bertine, Lucile Larrouy, Sophie Matheron, Florence Damond, Charlotte Charpentier, Diane Descamps, Benoit Visseaux

*Journal of Virological Methods (2018)*

#### **Contexte :**

Le taux de succès des isollements des souches VIH-2 à partir d'isolats cliniques est limité, du fait de la faible virémie des patients actuellement suivis en France, ainsi que de la présence de protéines interférentes dans le plasma des patients (antirétroviraux, protéines du complément, etc.). Or disposer de souches de VIH-2 est fondamental, notamment pour étudier les caractéristiques phénotypiques de ces souches, en particulier celles obtenues à partir des prélèvements de patients en échec virologique à un traitement antirétroviral.

#### **Objectif :**

Nous souhaitons évaluer l'impact sur le taux de succès d'isolement des souches d'une étape de purification de l'échantillon avant la mise en culture. Pour cela, nous avons tenté d'isoler les virus à partir de plasmas de patients virémiques par deux méthodes différentes : 1) la méthode historique, consistant à mettre en contact le plasma du patient avec des lymphocytes

de donneur non infecté, et 2) la même méthode de culture mais réalisé après purification de l'échantillon à l'aide de billes paramagnétiques anti-CD44.

### **Matériel et méthodes :**

Une culture virale a été réalisée à partir du plasma de 23 patients infectés par le VIH-1 et de 29 patients infectés par le VIH-2, par deux méthodes différentes, ainsi qu'une gamme des souches de référence du VIH-1 et du VIH-2, « BRU » et « ROD ».

Pour l'étape de purification, 200 µL de plasma étaient mélangées avec 50 µL de billes paramagnétiques anti-CD44 (µMACS VitalVirus Isolation Kit, Miltenyi Biotec GmbH, Allemagne) pendant 30 minutes puis le mélange était passé à travers une colonne magnétique afin de retenir les virus liés aux billes anti-CD44 et de se débarrasser des composants du plasma par plusieurs lavages de la colonne. Enfin, le virus était élué dans 1 mL de milieu RPMI et était directement utilisé pour infecter des lymphocytes de donneur non infecté, infecté par PHA pendant 48 heures.

La production virale était mesurée à J7, J14, J21 et J28, en observant l'apparition de l'effet cytopathogène sur les cultures et en mesurant l'antigène p24 dans le surnageant de ces cultures.

### **Résultats :**

Le taux d'isolement après purification par les billes anti-CD44 était augmenté pour les plasmas de patients infectés par le VIH-2 (17/29, contre 8/29 pour la technique classique ;  $p=0,03$ ), principalement du fait d'un meilleur isolement des virus des patients avec une virémie entre  $10^4$  et  $10^5$   $\log_{10}$  copies/mL. Cela était également vrai pour le virus de référence « ROD », qui était isolé avec des inocula plus faibles. De plus, les cultures devenaient positives plus précocement. Ainsi, à J7, 13 des cultures de VIH-2 étaient déjà positives après purification, contre 5/29 avec la technique classique ( $p=0,02$ ).

En revanche, aucune amélioration du taux d'isolement n'était observée pour le VIH-1, que ce soit à partir du plasma des patients virémiques (7/23, contre 5/23 pour la technique classique ;  $p=0,74$ ) ou sur la souche de référence « BRU ».

## **Conclusion :**

Nous avons montré que le taux d'isolement des souches du VIH-2 était amélioré après une étape de purification par des billes anti-CD44. Les protéines de surface CD44 sont présentes à la surface de tous les VIH, elles sont incorporées à la membrane virale lors du bourgeonnement depuis la membrane cellulaire, que ces virus aient été produits par des lignées lymphocytaires ou bien monocytaires/macrophagiques. L'étape de purification permet donc de retenir tous les virus, peu importe leur origine. Cette purification est rapide, peu coûteuse et implémentable facilement dans tous les laboratoires disposant d'un secteur de culture cellulaire. L'autre intérêt de cette nouvelle méthode de culture est d'économiser le plasma puisque seuls 200 microlitres sont nécessaires, contre 1000 pour la technique classique, permettant de conserver le reste du prélèvement.

L'amélioration du taux d'isolement chez le VIH-2, et pas le VIH-1, suggère que le VIH-2 pourrait être plus sensible aux protéines plasmatiques interférentes et/ou que les anticorps anti-CD44 pourraient améliorer l'infectivité du VIH-2 en favorisant un contact rapproché des cellules et des virus (Terry et al., 2009).



## Efficiency of HIV-2 cultures from clinical isolates is enhanced after purification by anti-CD44 microbeads

Quentin Le Hingrat<sup>a,b,\*</sup>, Marine Perrier<sup>a,b</sup>, Gilles Collin<sup>a,b</sup>, Suzon Drumard<sup>b</sup>, Alexandre Storto<sup>a,b</sup>, Mélanie Bertine<sup>a,b</sup>, Lucile Larrouy<sup>a,b</sup>, Sophie Matheron<sup>a,c</sup>, Florence Damond<sup>a,b</sup>, Charlotte Charpentier<sup>a,b</sup>, Diane Descamps<sup>a,b</sup>, Benoit Visseaux<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> IAME, UMR 1137, INSERM, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 16 rue Henri Huchard, Paris, France

<sup>b</sup> AP-HP, Laboratoire de virologie, Hôpital Bichat, 46 rue Henri Huchard, Paris, France

<sup>c</sup> AP-HP, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Bichat, 46 rue Henri Huchard, Paris, France



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

HIV-2  
Culture  
CD44  
Micro-beads  
Purification

### ABSTRACT

In-depth study of HIV often requires large stock of patients-derived viruses obtained through viral cultures. HIV cultures are currently limited by low recovery rates, especially when viral load is below 100,000 copies per mL. This is problematic for HIV-2 as most patients have spontaneously low to undetectable viremia. New approaches have been developed to enhance viral recovery rates but they are complex or costly to implement. We tested the impact of  $\mu$ MACS™ VitalVirus Isolation Kit (Miltenyi), a HIV virions capture method using paramagnetic microbeads directed against CD44, a human glycoprotein present in HIV envelope. This method separates viruses from interfering proteins in 45 min, using a reduced sample volume (200  $\mu$ L versus 1000  $\mu$ L for classic culture assays). The impact of this purification method on virus recovery rate was assessed with 23 HIV-1 and 29 HIV-2 plasma samples with a wide range of viral loads, in comparison to a classic culture assay used routinely in our laboratory. For both HIV-1 and HIV-2, the culture identification delay was decreased using viral purification ( $\leq 7$  days in most cases). The recovery rate of cultures was improved for HIV-2 isolates (17/29 versus 8/29;  $p = 0.03$ ) but not for HIV-1 (7/23 versus 5/23;  $p = 0.74$ ). Notably, HIV-2 isolates with viral loads over 10,000 copies per mL were frequently recovered in culture (68% versus 32% without purification;  $p = 0.03$ ). This marked improvement on HIV-2, but not on HIV-1, cultures is puzzling. CD44-microbeads may enable a close and prolonged contact between cells and viruses, and may thus overcome HIV-2 difficulties to infect target cells.

HIV particles in plasma represent the most recently produced quasi-species by infected patients. This easily accessible compartment reflects productive infections and is extensively used to monitor the global infection dynamics, influences of immune system or antiretroviral therapies on HIV infection and disease progression. Current methods used for viral load (VL) measurements can determine the number of genomic HIV RNA copies but cannot distinguish between infectious and non-infectious particles, nor allow phenotypic testing for virus replication dynamics, co-receptor use or antiretroviral susceptibility studies.

Viral culture is a mandatory step for non-recombinant phenotypic susceptibility assays. However, it is hampered by the low recovery rate of those cultures due to several factors, including a high proportion of non-infectious viral particles, presence of neutralizing antibodies, plasma charged-proteins or antiretroviral drugs. This is even more problematic for HIV-2-infected patients as most of them spontaneously

display low to undetectable plasmatic VL.

To improve viral culture efficiency, several approaches have been developed: plasma culture with healthy donor's PBMC cells (Andreoni et al., 1997; Coombs et al., 1989; Ho et al., 1989; Lathey et al., 1994; Pan et al., 1993; Piatak et al., 1993; Vella et al., 2000), viral particles concentration (Harrington et al., 2000; Sarmati et al., 1994; Sullivan et al., 1996), addition of negatively-charged polymers (Davis et al., 2004; Ercoli et al., 1995; Sarmati et al., 1994) or complex viral particles purification (Rusert et al., 2004). Despite these improvements, HIV isolation from plasma samples presenting VL below 100,000 copies/mL (c/mL) is frequently unsuccessful and techniques allowing increased viral isolation for lower VL are still needed.

The aim of our study was to improve the recovery rate of HIV cultures, with a simple and affordable pre-treatment of samples. We compared a classic culture assay to cultures performed after a purification protocol, utilizing CD44-MicroBeads<sup>®</sup>, with HIV-1 and HIV-2

\* Corresponding author.

E-mail address: [quentin.lehingrat@aphp.fr](mailto:quentin.lehingrat@aphp.fr) (Q. Le Hingrat).

<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.03.010>

Received 10 January 2018; Received in revised form 23 March 2018; Accepted 23 March 2018

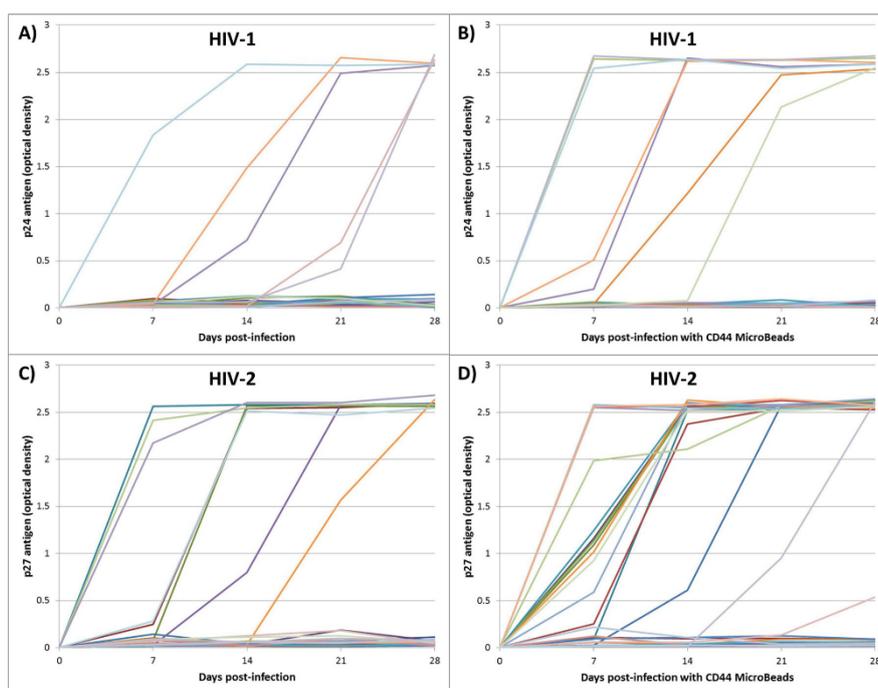
Available online 26 March 2018

0166-0934/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Table 1**  
Recovery rates of HIV cultures.

Plasmatic VL (c/mL)	HIV-1 (n = 23)			HIV-2 (n = 29)		
	Classic culture assay	After viral purification	p	Classic culture assay	After viral purification	p
< 10.000	0/7 (0%)	0/7 (0%)	1	1/7 (14%)	2/7 (29%)	1
10.000–100.000	2/12 (17%)	4/12 (33%)	0.64	6/19 (32%)	13/19 (68%)	0.05
> 100.000	3/4 (75%)	3/4 (75%)	2	1/3 (33%)	2/3 (67%)	1
Overall	5/23 (22%)	7/23 (30%)	0.74	8/29 (28%)	17/29 (59%)	0.03

Recovery rates of HIV-1 and HIV-2 cultures after viral purification or by classic culture assay were compared, using Fisher's test with  $p < 0.05$  as significance level.



**Fig. 1.** Acceleration of HIV cultures after purification by CD44-MicroBeads<sup>®</sup>. Viral production was assessed at days 7, 14, 21 and 28, by measurement of HIV p24 or p27 antigen by optical density with an Ag p24 ELISA assay. An arbitrary value of 0 was attributed to day 0. Viral production was monitored in cultures performed without viral purification (classic culture assay) on HIV-1 (A) and HIV-2 (C) isolates and in cultures performed after viral purification by CD44-MicroBeads<sup>®</sup> of HIV-1 (B) and HIV-2 (D) isolates.

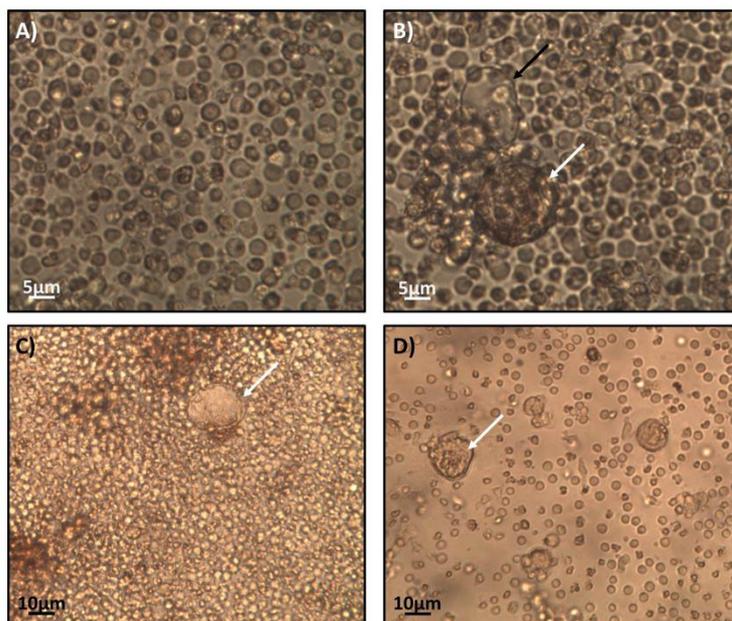
clinical samples.

Plasma samples were obtained from 23 HIV-1-infected patients at Bichat-Claude-Bernard hospital and 29 HIV-2-infected patients included in the French ANRS CO5 HIV-2 cohort. All patients gave a written consent for research use of their clinical samples at the time of inclusion in the cohort. The HIV-2 ANRS CO5 cohort and subsequent viral sub-studies have been assessed and authorized by the CPP IDF XI the 24th of January 2002 and by the CNIL the 30th of December 2002. We also used culture supernatants from two reference strains, BRU for HIV-1 and ROD for HIV-2 (Clavel et al., 1986; Wain-Hobson et al., 1991).

Healthy donors' PBMC, obtained from the Etablissement Français du Sang, were stimulated as previously described (Brun-Vézinet et al., 1992). Briefly, PBMC are incubated for 2 days with phytohemagglutinin, centrifuged and suspended in RPMI medium containing IL-2 to a final concentration of  $2 \times 10^6$  PBMC/mL. Stimulated-PBMC were used

for culture assays within two days after stimulation.

The commercial kit,  $\mu$ MACS<sup>™</sup> VitalVirus Isolation Kit (Miltenyi Biotec GmbH, Germany), has been developed to capture viral particles from clinical and remove neutralizing antibodies, charged proteins and antiretroviral drugs. Briefly, viral particles are captured by paramagnetic micro-beads directed against CD44, a human glycoprotein present in all HIV envelopes regardless of viral origin (myeloid or lymphoid cells). After viral capture, micro-beads are retained into a magnetic column then washed several times to eliminate all plasma compounds. Isolation of HIV particles from plasma was performed, as described by the manufacturer. For each patient, 200  $\mu$ L of plasma was mixed with 50  $\mu$ L of CD44-MicroBeads<sup>®</sup> and, after 30 min at room temperature, the mix was passed through a magnetic column ( $\mu$ Column) placed on a magnet. Columns were washed 4 times by 200  $\mu$ L of wash buffer. The columns were then removed from the magnet and intact viral particles were eluted with 1 mL of RPMI.



**Fig. 2.** HIV-2 cytopathic effect on human lymphocytes.

Cytopathic effects on HIV cultures were observed every 7 days by microscopy. Pictures were taken at day 14 post-infection using OptikamB5 Digital Camera, at magnification  $\times 900$  (A and B) and  $\times 450$  (C and D). A) Mock-infected PBMC; B) HIV-2-infected-PBMC with syncytia (white arrow) and empty syncytia (“bubble”) observed after release of viruses and leaking of cell content (black arrow); C) Large syncytia (white arrow); D) Syncytia with distinguishable cell nuclei (white arrow) in a viral culture with high mortality rate.

For each isolate, two different infections of  $10 \times 10^6$  stimulated-PBMC were performed: (1) with 1 mL of untreated plasma and (2) with 1 mL of RPMI media containing CD44-purified viruses, by using the ANRS PBMC assay (Brun-Vézinet et al., 1992). Briefly, PBMC were incubated with the corresponding viral sample at  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , for 2 hours, then the cell pellet was suspended with 10 mL of RPMI supplemented with L-glutamine, penicillin, streptomycin, neomycin, Fetal Bovine Serum (Biowest, France) and IL-2. Infected-PBMC were incubated at  $37^\circ\text{C}$  with 5% of  $\text{CO}_2$  for 28 days. At day 7, 14 and 21, 4 mL of supernatant were removed for viral replication testing and replaced by 2 mL of fresh PHA-activated PBMC at  $2 \times 10^6$  cells/mL and 4 mL of supplemented RPMI. At day 28, supernatants were removed and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . On each time point, cytopathic effect was observed and viral production was assessed by p24 antigen detection with Innostest<sup>®</sup> HIV Antigen mAb (Innogenetics), according to the manufacturer's specifications. This assay detects both HIV-1 p24 and HIV-2 p27 antigens (Fransen et al., 2001). Negative (RPMI) and positive controls were included in all experiments.

Fisher's tests were performed on R 3.4.0, using  $p < 0.05$  as significance level.

When comparing the two culture protocols on HIV-1 BRU reference strain, classic culture was successful for all dilutions above 50,000 c/mL and was not improved by purifying our samples with CD44-MicroBeads<sup>®</sup>. For HIV-2 ROD reference strain, classic culture was only successful for the dilution at 1,000,000 c/mL, while purification by CD44-MicroBeads<sup>®</sup> enabled us to successfully recover all dilutions at 10,000 c/mL or higher (Supplementary Fig. 1).

Regarding the 23 HIV-1 clinical samples, presenting HIV-1 plasmatic VL ranging from 1500 to 340,000 c/mL, viral purification did not significantly improve the recovery rates (7/23 (30%) versus 5/23 (22%) without CD44-MicroBeads<sup>®</sup>;  $p = 0.71$ ; Table 1). No HIV-1 isolate with VL below 50,000 c/mL was recovered by any method.

For the 29 HIV-2 samples, presenting HIV-2 plasmatic VL ranging from 1800 to 229,900 c/mL (Supplementary data), recovery rate was

significantly higher after viral purification (17/29 (59%) versus 8/29 (28%);  $p = 0.03$ ; Table 1). This gain was mainly observed for VL between 10,000 and 100,000 c/mL, even though the difference in this VL range was not significant (13/19 versus 6/19 without purification;  $p = 0.051$ ).

Viral replication was also accelerated when using CD44-MicroBeads<sup>®</sup>. Indeed, at day 7, recovery rates were higher for HIV-2 (13/29 versus 5/29;  $p = 0.02$ ; Fig. 1). It was also increased for HIV-1 but the difference did not reach a significant level (5/23 versus 1/23;  $p = 0.18$ ). To note, larger syncytia were observed on HIV-2 cultures (Fig. 2).

Nowadays, HIV cultures are limited to research studies due to the expansion and improvements of molecular biology, but remain important for in-depth study of HIV strains (antiretroviral susceptibility, tropism determination, viral fitness, etc.) for which large stocks of patients-derived viruses are required.

The shorter delay of culture observed in our study for HIV-1 and HIV-2 when using CD44-MicroBeads<sup>®</sup> was previously reported for HIV-1 (Terry et al., 2009). However, to date, improvements in recovery rates have never been evaluated or documented. In this work, we did not observe any strong recovery rate increase using CD44-MicroBeads<sup>®</sup> for HIV-1, while it was greatly improved for HIV-2, for both culture supernatant and clinical plasma samples, with a recovery rate even higher than that obtained for HIV-1 with other culture techniques (Harrington et al., 2000; Piatak et al., 1993; Sarmati et al., 1994; Vella et al., 2000). Other previous works presented improved efficiencies of HIV cultures but with various limitations. Thus, Dalmau et al. designed a highly efficient culture method with, however, a rather complex, time-consuming and costly protocol. Briefly, this protocol used PBMC from 3 different donors depleted from CD8+ T-cells and stimulated by 3 different methods (low and high PHA concentrations and IL-3 activation) before being pooled before infection (Dalmau et al., 2012). Cornell et al. also proposed an efficient model of HIV-1 infection but they used immortalized transformed cell lines instead of human lymphocytes,

which might introduce bias in further phenotypic studies (Cornall et al., 2010).

The difference observed between HIV-1 and HIV-2 recovery rates after purification might be explained by a greater sensitivity of HIV-2 to interfering plasma proteins removed through CD44-MicroBeads® purification or by a specific effect of anti-CD44 microbeads. Indeed, it has been previously documented that multimeric CD44 antibodies are required to enhance viral infectivity (Terry et al., 2009). Terry et al. hypothesized that simultaneous binding of viral particles and target cells by microbeads might induce a prolonged contact between target cells and viruses facilitating HIV infection. Regarding our results, such effect may be more beneficial for HIV-2 than HIV-1 but needs further investigations as it could imply HIV-2 has a lower affinity for cell receptors.

A potential limitation of any culture assay is that it could select some clones among the viral quasi-species and bias further experiments. This microbeads assay targets the CD44 marker to capture viral particles produced by lymphocytes or monocytes/macrophages and is used in non-saturated concentration, therefore being able to capture even viral particles with a potential lower density of CD44. This method does not prevent further bias due to cellular culture but, to date, no potential bias has been suggested with such pre-treatment and, in our experience, we did not observe any sequence modification in reverse transcriptase nor integrate regions with bulk sequencing before and after viral culture.

The CD44-MicroBeads® purification steps are easy to perform, quick (less than 45 min), affordable (under 15 dollars per sample) and time-saving as most cultures are positive at day 7, contrary to the classic culture assay. This method improves recovery rates for HIV-2, overcoming the low infectivity of this virus and suggesting its lower affinity for HIV receptors. On the other hand, recovery rates observed for HIV-1 were similar with and without purification. However, this CD44-MicroBeads® purification shortens positivity delay of viral cultures and uses a reduced plasma volume (200 µL versus 1000 µL) sparing precious clinical samples.

#### Funding

This work was supported by the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS).

#### Declarations of interest

None.

We thank all clinicians, technicians and patients participating in the HIV-2 ANRS CO5 cohort.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.03.010>.

#### References

Andreoni, M., Sarmati, L., Ercoli, L., Nicastrì, E., Giannini, G., Galluzzo, C., Pirillo, M.F.,

- Vella, S., 1997. Correlation between changes in plasma HIV RNA levels and in plasma infectivity in response to antiretroviral therapy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 13, 555–561.
- Brun-Vézinet, F., Ingrand, D., Deforges, L., Gochi, K., Ferchal, F., Schmitt, M.P., Jung, M., Masquelier, B., Aubert, J., Buffet-Janvresse, C., 1992. HIV-1 sensitivity to zidovudine: a consensus culture technique validated by genotypic analysis of the reverse transcriptase. *J. Virol. Methods* 37, 177–188.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M.-A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., et al., 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343–346.
- Coombs, R.W., Collier, A.C., Allain, J.P., Nikora, B., Leuther, M., Gjeret, G.F., Corey, L., 1989. Plasma viremia in human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 321, 1626–1631. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198912143212402>.
- Cornall, A., Sharma, L., Solomon, A., Gorry, P.R., Crowe, S.M., Cameron, P.U., Lewin, S.R., 2010. A novel, rapid method to detect infectious HIV-1 from plasma of persons infected with HIV-1. *J. Virol. Methods* 165, 90–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.01.010>.
- Dalmay, J., Codoñer, F.M., Erkizia, I., Pino, M., Pou, C., Paredes, R., Clotet, B., Martínez-Picado, J., Prado, J.G., 2012. In-depth characterization of viral isolates from plasma and cells compared with plasma circulating quasi-species in early HIV-1 infection. *PLoS One* 7. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0032714>.
- Davis, H.E., Rosinski, M., Morgan, J.R., Yarmush, M.L., 2004. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys. J.* 86, 1234–1242. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74197-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74197-1).
- Ercoli, L., Sarmati, L., el-Sawaf, G., Cochi, S., Lanti, T., Iudicone, P., Guglielmetti, M., Giannini, G., Galluzzo, C., Tomino, C., 1995. Plasma viremia titration and RNA quantitation in ICD-p24 negative HIV type-1-infected patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11, 1203–1207.
- Fransen, K., Beelaert, G., van der Groen, G., 2001. Evaluation of four HIV antigen tests. *J. Virol. Methods* 93, 189–193.
- Harrington, R., Wu, L., Pullen, H., Emerman, M., 2000. Direct detection of infectious HIV-1 in blood using a centrifugation-indicator cell assay. *J. Virol. Methods* 88, 111–115.
- Ho, D.D., Moudgil, T., Alam, M., 1989. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N. Engl. J. Med.* 321, 1621–1625. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198912143212401>.
- Lathey, J.L., Fiscus, S.A., Rasheed, S., Kappes, J.C., Griffith, B.P., Elbeik, T., Spector, S.A., Reichelderfer, P.S., 1994. Optimization of quantitative culture assay for human immunodeficiency virus from plasma. Plasma Viremia Group Laboratories of the AIDS clinical trials group (National Institute of Allergy and Infectious Diseases). *J. Clin. Microbiol.* 32, 3064–3067.
- Pan, L.Z., Werner, A., Levy, J.A., 1993. Detection of plasma viremia in human immunodeficiency virus-infected individuals at all clinical stages. *J. Clin. Microbiol.* 31, 283–288.
- Piatak Jr., M., Saag, M.S., Yang, L.C., Clark, S.J., Kappes, J.C., Luk, K.C., Hahn, B.H., Shaw, G.M., Lifson, J.D., 1993. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 259, 1749–1754.
- Rusert, P., Fischer, M., Joos, B., Leemann, C., Kuster, H., Flepp, M., Bonhoeffer, S., Günthard, H.F., Trkola, A., 2004. Quantification of infectious HIV-1 plasma viral load using a boosted in vitro infection protocol. *Virology* 326, 113–129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2004.05.022>.
- Sarmati, L., Ercoli, L., Parisi, S.G., Rocchi, G., Giannini, G., Galluzzo, C., Vella, S., Andreoni, M., 1994. High rate of HIV isolation from plasma of asymptomatic patients through polyethylene glycol (PEG) treatment. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 7, 10–14.
- Sullivan, B.L., Knopoff, E.J., Saifuddin, M., Takefman, D.M., Saarloos, M.N., Sha, B.E., Spear, G.T., 1996. Susceptibility of HIV-1 plasma virus to complement-mediated lysis. Evidence for a role in clearance of virus in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md.* 1950 (157), 1791–1798.
- Terry, V.H., Johnston, I.C.D., Spina, C.A., 2009. CD44 MicroBeads accelerate HIV-1 infection in T cells. *Virology* 388, 294. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.022>.
- Vella, S., Galluzzo, M.C., Giannini, G., Pirillo, M.F., Andreotti, M., Tomino, C., Fragola, V., Bucciardini, R., Ricciardulli, D., Binelli, A., Weimer, L.E., Florida, M., 2000. Plasma HIV-1 copy number and in vitro infectivity of plasma prior to and during combination antiretroviral treatment. *Antivir. Res.* 47, 189–198.
- Wain-Hobson, S., Vartanian, J.P., Henry, M., Chenciner, N., Cheynier, R., Delassus, S., Martins, L.P., Sala, M., Nugeyre, M.T., Guétard, D., 1991. LAV revisited: origins of the early HIV-1 isolates from Institut Pasteur. *Science* 252, 961–965.

## 2. Deuxième article

### **Détermination de la susceptibilité d'isolats cliniques du VIH-2 aux inhibiteurs d'intégrase et identification d'un nouveau mécanisme de résistance**

**A New Mechanism of Resistance of Human Immunodeficiency Virus  
Type 2 to Integrase Inhibitors: A 5-Amino-Acid Insertion  
in the Integrase C-Terminal Domain**

Quentin Le Hingrat, Gilles Collin, Minh Lê, Gilles Peytavin, Benoit Visseaux,  
Mélanie Bertine, Roland Tubiana, Marina Karmochkine, Nadia Valin,  
Fideline Collin, Adrien Lemaigen, Louis Bernard, Florence Damond,  
Sophie Matheron, Diane Descamps, and Charlotte Charpentier;  
for the French National Agency for Research on AIDS  
and Viral Hepatitis (ANRS) CO5 HIV-2 Cohort

*Clinical Infectious Diseases (2018)*

#### **Contexte :**

La susceptibilité au raltegravir, à l'elvitegravir et au dolutegravir de plusieurs mutants VIH-2 a été décrite mais peu de données sont disponibles pour les deux molécules les plus récentes : cabotegravir et bictegravir (Charpentier et al., 2010, 2011; Roquebert et al., 2008; Smith et al., 2011, 2012, 2015).

La sélection de mutations de résistance aux inhibiteurs d'intégrase de 1<sup>ère</sup> génération a été décrite chez les PVVIH-2, amenant à proposer le remplacement du raltegravir par du dolutegravir chez des patients en échec virologique (Descamps et al., 2015). La charge virale plasmatique d'une partie des patients devint indétectable suite à cette modification de traitement mais la virémie resta positive chez plus de la moitié des patients. Or ces derniers présentaient fréquemment des mutations de résistance aux INTI et aux IP, limitant les options thérapeutiques. La mise sur le marché du bictegravir représente donc une potentielle nouvelle option thérapeutique pour ces patients mais la susceptibilité des VIH-2 mutés dans l'intégrase n'avait pas été déterminée.

## **Objectif :**

Nous souhaitons évaluer la susceptibilité d'isolats cliniques, porteurs ou non de mutations de résistance dans le gène de l'intégrase, aux cinq inhibiteurs de transfert de brin de l'intégrase afin de déterminer les traitements à privilégier chez les PVVIH-2.

## **Matériel et méthodes :**

La susceptibilité de douze isolats cliniques de patients a été testé par la méthode phénotypique de l'ANRS. Ces douze isolats correspondent aux virus isolés depuis le plasma de 2 patients naïfs d'INSTI et de 10 patients en échec d'un traitement comprenant un INSTI, par la méthode décrite dans le précédent travail (Le Hingrat et al., 2018a).

Les virus de 9 des 10 patients en échec virologique présentaient des mutations de résistance dans l'intégrase : Y143R, T97A+Y143G, E92Q+T97A, E92Q+T97A+N155H, G140S+Q148H (n=1 pour tous) et une insertion après le codon 231 de 5 acides aminés (aussi appelée 231ins, n=4).

Cette dernière mutation n'ayant pas été observée précédemment, nous avons recherché dans notre base de données tous les patients présentant cette insertion puis déterminé la cinétique d'apparition de cette insertion, en séquençant rétrospectivement tous les échantillons disponibles depuis l'instauration d'un traitement comprenant un INSTI et en dosant les ARV sur ces échantillons.

## **Résultats :**

Les mutations Y143R et T97A+Y143G n'impactaient que la susceptibilité au RAL, augmentant les  $CI_{50}$  d'un facteur 10 et 275, respectivement. Concernant les deux mutants E92Q+T97A et E92Q+T97A+N155H, ils étaient fortement résistants au RAL et à l'EVG, et avaient des  $CI_{50}$  augmentés d'un facteur 5 et 8 pour le DTG. Le bictégravir reste pleinement actif sur le profil E92Q+T97A. En revanche, la substitution N155H, en plus des mutations E92Q+T97A, rend le virus modérément résistant au BIC, avec une  $CI_{50}$  similaire à celle mesurée pour le DTG.

Enfin, le profil G140S+Q148H est complètement résistant à tous les INSTI, sauf au BIC qui présente une augmentation d'un facteur 32 de l' $CI_{50}$ , ce qui empêche néanmoins d'envisager

un traitement par BIC des patients infectés par un virus porteur de la double substitution G140S+Q148H.

L'insertion de 5 acides aminés après le codon 231 dans la partie C-terminale de l'intégrase était responsable d'un haut niveau de résistance aux INSTI de 1<sup>ère</sup> génération (RAL et EVG), ainsi qu'une résistance au CAB et au DTG mais à un niveau moindre. Le BIC restait actif sur 2 des 4 souches présentant cette insertion.

L'acquisition de l'insertion 231ins a été identifiée rétrospectivement chez 6 patients, les acides aminés de l'insertion différaient entre les patients (SREGK, SREGR, YREGR, GYRGR ou GYK GK), ainsi qu'au fil du suivi, mais les insertions contenaient toujours deux résidus chargés positivement (Arginine, R, et/ou Lysine, K). De plus, le virus d'un des patients présenta transitoirement une insertion de deux acides aminés, GK, avant de sélectionner l'insertion de 5 acides aminés.

L'insertion n'était pas présente au moment de l'initiation du traitement contenant du RAL et était sélectionnée, en médiane, 11 mois après l'instauration du traitement par RAL, malgré des concentrations plasmatiques des ARV dans les zones attendues.

### **Conclusion :**

Les résultats des phénotypes de résistances sont cohérents avec les  $CI_{50}$  mesurées sur des mutants obtenus par mutagenèse dirigée dans de précédents travaux (Smith et al., 2011, 2015). La susceptibilité au BIC de souches mutées dans le gène de l'intégrase a pu être déterminé pour la première fois, confirmant son efficacité sur certains profils de mutations, comme chez le VIH-1. Si le bictegravir peut être proposé aux patients dont le virus présente des mutations au codon 143 ou bien l'association E92Q+T97A, la légère augmentation des  $CI_{50}$  pour le triple mutant E92Q+T97A+N155H incite à éviter le BIC, dans la mesure du possible, ou à l'associer à de l'atazanavir pour augmenter les concentrations plasmatiques et passer outre l'augmentation des  $CI_{50}$ .

Nous avons décrit pour la première fois la sélection d'une insertion dans le gène de l'intégrase, chez des patients dont le traitement antirétroviral comprenait du RAL. L'impact de cette insertion de 5 acides aminés sur la susceptibilité aux INSTI a pu être déterminé phénotypiquement. Cette insertion est responsable d'un haut niveau de résistance au RAL et à l'EVG. La susceptibilité au CAB et au DTG était également diminuée, et celle au BIC dépendait du profil de l'insertion.

L'acquisition de cette insertion ne semble pas due à une mauvaise observance mais plutôt au traitement suboptimal de ces patients qui présentaient des mutations de résistance aux INTI et aux IP qui constituaient la base de leur traitement antirétroviral, facilitant donc l'acquisition de mutations de résistance dans le gène de l'intégrase.

Chez l'un des patients, nous avons observé une sélection d'une insertion de 2 acides aminés, GK, précédant l'apparition de l'insertion de 5 acides aminés. Ceci suggère une acquisition en deux temps de l'insertion, d'abord les deux acides aminés terminaux (GK ou GR) puis les 3 autres acides aminés. L'impact de cette insertion transitoire n'est pas connu, tant sur la réplication virale que sur le niveau de résistance aux INSTI.

D'autres études sont nécessaires afin de déterminer l'impact des insertions à 2 et 5 acides aminés sur la structure et/ou l'activité de l'intégrase. Des expériences *in vitro* devront également être réalisées pour déterminer la capacité répliquative et l'infectivité de ces mutants.

Enfin, ces travaux mettent en lumière la nécessité d'un suivi rapproché des PVVIH-2 ayant déjà échoué à une première ligne de traitement, du fait du faible nombre d'options thérapeutiques disponibles et de la rapidité de sélection de nouvelles mutations. Un suivi clinique, virologique et pharmacologique pourrait être bénéfique pour ces patients, en attendant de disposer de nouveaux ARV actifs sur le VIH-2.

## A New Mechanism of Resistance of Human Immunodeficiency Virus Type 2 to Integrase Inhibitors: A 5-Amino-Acid Insertion in the Integrase C-Terminal Domain

Quentin Le Hingrat,<sup>1,2\*</sup> Gilles Collin,<sup>1,2</sup> Minh Lê,<sup>1,3</sup> Gilles Peytavin,<sup>1,3</sup> Benoit Visseaux,<sup>1,2</sup> Mélanie Bertine,<sup>1,2</sup> Roland Tubiana,<sup>4,5</sup> Marina Karmochkine,<sup>6</sup> Nadia Valin,<sup>7</sup> Fideline Collin,<sup>8,9</sup> Adrien Lemaignan,<sup>10</sup> Louis Bernard,<sup>10</sup> Florence Diamond,<sup>1,2</sup> Sophie Matheron,<sup>1,11</sup> Diane Descamps,<sup>1,2</sup> and Charlotte Charpentier<sup>1,2</sup>; for the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS) C05 HIV-2 Cohort<sup>a</sup>

<sup>1</sup>Infections Antimicrobielles Modelling Evolution, Unité Mixte de Recherche (UMR) 1137, Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), <sup>2</sup>Laboratoire de Virologie, and <sup>3</sup>Laboratoire de Pharmacologie, Hôpital Bichat, AP-HP, <sup>4</sup>Service de Maladies Infectieuses, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, <sup>5</sup>Sorbonne Universités, Université Paris 6-Pierre et Marie Curie, INSERM, Institut Pierre Louis d'épidémiologie et de Santé Publique (UMRS 1136), <sup>6</sup>Service d'Immunologie Clinique, Hôpital Européen Georges Pompidou, and <sup>7</sup>Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital St-Antoine, Paris, <sup>8</sup>Bordeaux Population Health Center, UMR 1219, INSERM, <sup>9</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, <sup>10</sup>Service de Médecine Interne et Maladies Infectieuses, Centre Hospitalier Universitaire de Tours, and <sup>11</sup>Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Bichat, AP-HP, Paris, France

**Background.** Integrase strand transfer inhibitors (INSTIs) are crucial for the treatment of human immunodeficiency virus (HIV) type 2 infection, due to limited available therapeutic options. Recently, bictegravir has been approved for HIV-1, but no data are currently available for HIV-2.

**Methods.** We assessed the phenotypic susceptibility of 12 HIV-2 clinical isolates, obtained from 2 antiretroviral-naïve and 10 antiretroviral-experienced patients, to 5 INSTIs (bictegravir, cabotegravir, dolutegravir, elvitegravir, and raltegravir) at the virological failure of an INSTI-based regimen. The 50% inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>s) were determined. Phenotypic inhibitory quotients were determined using trough INSTI plasma concentrations.

**Results.** Wild-type viruses were susceptible to the 5 INSTIs, with IC<sub>50</sub>s in the nanomolar range. Bictegravir had a lower IC<sub>50</sub> than the other INSTIs on those HIV-2 isolates bearing major, resistance-associated mutations (codons 143, 148, and 155). We identified a new resistance profile—a 5-amino-acid insertion at codon 231 of the HIV-2 integrase (231INS)—in 6 patients at the virological failure of a raltegravir-based regimen. Those patients had adequate raltegravir concentrations, but harbored multiresistant viruses with low genotypic susceptibility scores (median = 1.5). This insertion rendered isolates highly resistant to raltegravir and elvitegravir, and moderately resistant to dolutegravir and cabotegravir. Regarding bictegravir, 2 isolates remained susceptible and 2 had a slight increase in IC<sub>50</sub> (3- to 5-fold change).

**Conclusions.** Our results confirm the potency of INSTI on HIV-2 clinical isolates with wild-type integrase. In addition, we identified a new resistance pathway, 231INS, selected in antiretroviral-experienced patients with multiresistant HIV-2 viruses. This highlights the need of close follow-up of those patients initiating an INSTI-based regimen.

**Keywords.** HIV-2; integrase inhibitor; insertion; phenotypic resistance; bictegravir.

Therapeutic options against Human Immunodeficiency Virus type 2 (HIV-2) are limited due to HIV-2 natural resistance to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors, fusion inhibitors, and some protease inhibitors [1–4]. Moreover, few mutations are required to acquire class-wide resistance [5–7].

In vitro phenotypic assays showed that the 50% inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>s) against HIV-2 clinical isolates were in

similar range to that of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) for the integrase strand transfer inhibitors (INSTIs) raltegravir (RAL), elvitegravir (EVG), and dolutegravir (DTG) [4, 8, 9]. Thus, the development of INSTIs has offered a new therapeutic option for HIV-2-infected patients, and RAL has been used for more than a decade. Virological response to a DTG-based regimen has been assessed in HIV-2-infected patients from the French named patient program with viruses resistant to first-generation INSTIs [10]. More recently, 2 trials assessed the efficacy of INSTI-based regimens, including RAL or EVG, among antiretroviral (ARV)-naïve HIV-2-infected patients [11, 12].

In this work, we determined the susceptibility of integrase-mutated and wild-type HIV-2 isolates to the 5 different INSTIs currently marketed or under development: RAL, EVG,

Received 30 August 2018; editorial decision 23 October 2018; accepted 30 October 2018; published online November 1, 2018.

\*Members of the ANRS C05 HIV-2 cohort are listed in the Appendix.

Correspondence: Q. Le Hingrat, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Laboratoire de Virologie, 46 Rue Henri Huchard, 75018 Paris, France (quentin.lehingrat@aphp.fr).

Clinical Infectious Diseases® 2018;XX(XX):1–11

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com. DOI: 10.1093/cid/ciy940

DTG, cabotegravir (CAB), and bicitegravir (BIC), through peripheral blood mononuclear cell (PBMC) phenotypic susceptibility assays. We also identified a new resistance profile among patients failing a RAL-based regimen: a 5-amino-acid (AA) insertion at codon 231 in the integrase C-terminal domain. We assessed the kinetics of selection of this insertion and its impact on the susceptibility to INSTIs.

## MATERIALS AND METHODS

### Samples

Plasma samples were obtained from HIV-2-infected patients included in the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS) CO5 HIV-2 cohort. All patients gave a written consent for research use of their samples at the time of inclusion in the cohort. The ANRS CO5 HIV-2 cohort and subsequent viral substudies have been assessed and initially authorized by the Comité de Protection des Personnes, Ile-de-France XI on 24 January 2002 and by the Commission Nationale Informatique et Libertés on 30 December 2002.

HIV-2 supernatants were obtained by culturing HIV-2 clinical isolates, after purification by CD44-MicroBeads, with healthy donors' PBMCs, as previously described [13]. We also used culture supernatants from 2 reference strains, BRU for HIV-1 and ROD for HIV-2, as controls [14, 15].

### Antiretroviral Drugs

BIC was kindly provided by Gilead Sciences for this study, DTG, EVG, and RAL were previously obtained from ViiV Healthcare, Gilead Sciences, and Merck Sharp & Dohme, respectively. Pure powder of CAB for research use only was purchased from SelleckChem.com.

### Phenotypic Assays

PBMC phenotypic assays were performed according to the ANRS technique [16]. In brief, for each viral isolate, 30 million fresh phytohemagglutinin-activated PBMC were centrifuged at 500g for 10 minutes. Cell pellet was suspended with 5 mL of cell-free HIV-2 culture supernatant, previously diluted in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) media to an infectious titer of 100 50% Tissue Culture Infectious Dose per mL. After 3 hours at 37°C, under 5% of carbon dioxide, cells were washed with RPMI media and centrifuged and the pellet was suspended in 15 mL of RPMI media supplemented with L-glutamine, 1% antibiotics (penicillin and streptomycin), and 10% fetal bovine serum (Biowest, France). Two hundred thousand infected cells were deposited in wells of 96-well plates containing 5 serial 10-fold dilutions of ARVs (ranging from 1000 to 0.1 nM). Each dilution was tested in quadruplicate, and control wells without ARVs were included. At days 3 and 4, 100  $\mu$ L of supernatant was collected to assess viral replication, using Biocentric HIV-2 RNA (Biocentric, Bandol, France). The  $IC_{50}$ s were determined using Prism 5.0 software with the sigmoidal dose response

(GraphPad Software, San Diego, California). Fold changes of  $IC_{50}$ s were obtained by dividing the  $IC_{50}$  for a specific isolate by the  $IC_{50}$  of the HIV-2 reference strain, ROD, for the same ARV. Susceptibility to an ARV was considered as decreased when  $IC_{50}$  fold change was >3, except for BIC, for which a threshold at 2.5 was fixed [17].

### Quantification of HIV RNA Viral Load and Integrase Sequencing

One mL of supernatant was extracted using MagNAPure with the High Volume Total Acid Nucleic Kit (Roche). HIV-2 viral load (VL) was determined, using Biocentric HIV-2 RNA (Biocentric, Bandol, France), with a limit of quantification of 40 copies/mL [18]. HIV-2 integrase sequence was determined by Sanger sequencing method, as previously described [19], on clinical samples and viral isolates. For HIV-1 BRU isolate, HIV-1 VL was determined using Cobas 6800 HIV-1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Integrase sequences of isolates are deposited on GenBank under accession numbers MH536201–MH536212.

### Pharmacological Assays

INSTI plasma concentrations were measured by the ultra-performance liquid chromatography (UPLC)–tandem mass spectrometry method (Waters Acquity UPLC-TQD, Milford, Massachusetts) [20]. For INSTI-experienced patients, trough plasma concentrations were determined on samples collected at visits encompassing the time of isolation of the viral isolate. We also retrospectively measured INSTI trough plasma concentrations on samples preceding the emergence of the 231INS in HIV-2 integrase to determine if it could be due to a low adherence to treatment. Two cutoffs were used for interpretation of RAL trough concentrations: 15 and 50 ng/mL, for the minimal and recommended concentrations, respectively [21]. DTG trough concentrations were interpreted as within the expected therapeutic range if they exceeded 64 ng/mL [22].

We estimated the phenotypic inhibitory quotient (PIQ) by dividing the median INSTI trough concentration by the  $IC_{50}$ . We also computed the genotypic susceptibility score (GSS) using the European algorithm for interpretation of HIV-2 resistance [5, 23]. In brief, for each molecule, a score of 0, 0.5, or 1 was given if the virus was interpreted as resistant, possibly resistant, or susceptible, respectively, to this drug on the cumulative genotype and the GSS was obtained by summing scores obtained for each drug of the regimen.

## RESULTS

### INSTI Susceptibility of HIV-2 Isolates Obtained From INSTI-Naive HIV-2-Infected Patients

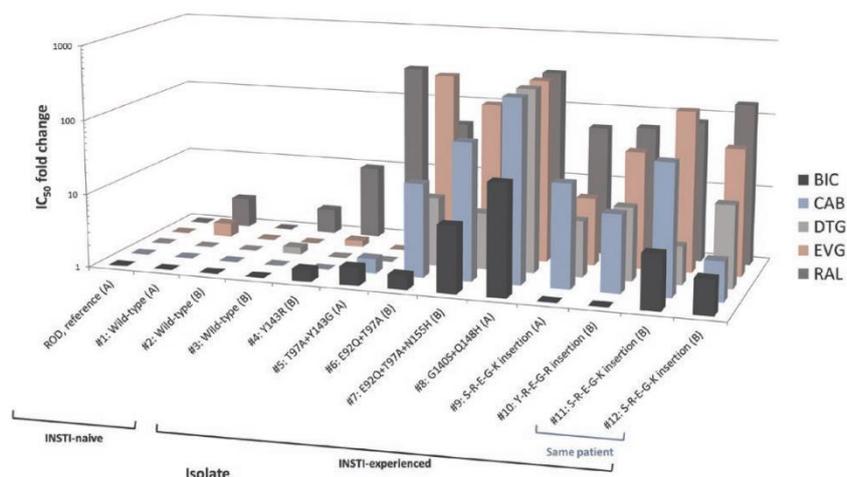
BIC, CAB, DTG, EVG, and RAL were tested on 2 INSTI-naive HIV-2 isolates (1 group A and 1 group B) and on HIV-1 and HIV-2 reference strains (BRU and ROD, respectively). Using a

**Table 1. Characteristics and 50% Inhibitory Concentrations of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Clinical Isolates**

Isolate No.	Viral Group	INSTI-Naive or Experienced	INSTI Received	Integrase Length, Amino Acids, No.	Mutation Profile	BIC		CAB		DTG		EVG		RAL	
						IC <sub>50</sub> , nM	IC <sub>50</sub> , FC	IC <sub>50</sub> , nM	IC <sub>50</sub> , FC	IC <sub>50</sub> , nM	IC <sub>50</sub> , FC	IC <sub>50</sub> , nM	IC <sub>50</sub> , FC	IC <sub>50</sub> , nM	IC <sub>50</sub> , FC
BRU	HIV-1	Naive	...	288	WT	1.42	NA	0.45	NA	1.02	NA	0.4	NA	3	NA
ROD	HIV-2 A	Naive	...	293	WT	3.8	1.0	4.4	1.0	3.6	1.0	3.6	1.0	1.8	1.0
1	HIV-2 A	Naive	...	293	WT	0.8	0.2	1.5	0.3	0.7	0.2	5.6	1.5	4.6	2.5
2	HIV-2 B	Naive	...	301	WT	3.2	0.8	7.6	1.7	2.5	0.7	10.3	2.8	19.7	10.9
3	HIV-2 B	Experienced	EVG	287	WT	0.8	0.2	1.4	0.3	4.5	1.2	2.5	0.7	3.9	2.2
4	HIV-2 B	Experienced	RAL then DTG	287	Y143R	5.6	1.4	1.2	0.3	1.8	0.5	4.4	1.2	17.3	9.6
5	HIV-2 A	Experienced	RAL	293	T97A+Y143G	6.8	1.8	5.1	1.2	0.9	0.3	1.0	0.3	498.0	275.1
6	HIV-2 B	Experienced	RAL	296	E92Q+T97A	6.0	1.6	20.9	4.7	30.7	8.4	>1000	>300	89.0	49.2
7	HIV-2 B	Experienced	RAL	301	E92Q+T97A+N155H	30.8	8.0	313.0	71.0	21.2	5.8	469.0	129.2	141.0	77.9
8	HIV-2 A	Experienced	RAL then DTG	293	G140S+Q148H	123.0	32.0	>1000	>300	>1000	>300	>1000	>1000	>1000	>300
9	HIV-2 A	Experienced	RAL	298	S-R-E-G-K insertion	0.9	0.2	85.1	19.3	20.8	5.7	30.0	8.3	102.0	56.4
10	HIV-2 B	Experienced	RAL	306	Y-R-E-G-R insertion	2.2	0.6	22.4	5.1	35.3	9.7	142.0	39.1	111.0	61.3
11	HIV-2 B	Experienced	RAL	301	S-R-E-G-K insertion	20.9	5.5	349.0	79.1	12.0	3.3	541.0	149.0	146.0	80.7
12	HIV-2 B	Experienced	RAL then DTG	301	S-R-E-G-K insertion	11.3	2.9	57.3	13.0	47.5	13.1	190.0	52.3	273.0	150.8

Susceptibility to integrase strand transfer inhibitors of 12 human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) clinical isolates, as well as HIV type 1 (BRU) and HIV-2 (ROD) reference strains, was assessed using our peripheral blood mononuclear cell phenotypic susceptibility assay, as previously described [16, 24, 41]. The 50% inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) were determined using Prism 5.0 software with the sigmoidal dose response (GraphPad Software, San Diego, California). IC<sub>50</sub> fold changes were obtained by dividing the IC<sub>50</sub> by ROD/IC<sub>50</sub>. IC<sub>50</sub> fold changes above the defined cutoffs of reduced susceptibility (>3 for raltegravir (RAL), elvitegravir (EVG), cabotegravir (CAB), and bictegravir (BIC), and >2.5 for dolutegravir (DTG), and cabotegravir and >2.5 for bictegravir) are shown in bold. Two isolates (numbers 11 and 12) were obtained from the same patient at 2 different time points, at virological failure of a RAL and a DTG-based regimen, respectively.

Abbreviations: BIC, bictegravir; CAB, cabotegravir; E, glutamate; EVG, elvitegravir; FC, fold change; G, glycine; HIV, Human Immunodeficiency Virus; IC<sub>50</sub>, 50% inhibitory concentration; INSTI, integrase strand transfer inhibitor; K, lysine; NA, not available; nM, nanomolar; R, arginine; RAL, raltegravir; S, serine; WT, wild-type; Y, tyrosine.



**Figure 1.** Phenotypic resistance profiles of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) clinical isolates. The 50% inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ s) of bicitegravir, cabotegravir, dolutegravir (DTG), elvitegravir, and raltegravir (RAL) were determined on 12 HIV-2 clinical isolates using a peripheral blood mononuclear cell (PBMC) phenotypic susceptibility assay as previously described [16, 24, 41]. In brief,  $6 \times 10^6$  PBMCs were activated for 48 hours by phytohemagglutinin, washed, then infected by 1 mL of HIV-2 supernatant at a 100 50% tissue culture infectious dose concentration. Infected PBMCs were then seeded in a 96-well plate, in quadruplicate, with integrase strand transfer inhibitor concentrations ranging from 0 to 1000 nM. Viral replication was assessed at day 3 or 4 postinfection, using a commercial quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction assay, and  $IC_{50}$ s were obtained using GraphPad Prism 5.0 software. Each bar represents the  $IC_{50}$  fold change compared with the HIV-2 reference strain, ROD. For each isolate, resistance-associated mutations in the integrase region are labeled under the graph, and the HIV-2 group is indicated between parentheses. Two isolates (numbers 11 and 12) were obtained from the same patient at 2 different time points, at virological failure of an RAL- and a DTG-based regimen, respectively. Abbreviations: BIC, bicitegravir; CAB, cabotegravir; DTG, dolutegravir; E, glutamate; EVG, elvitegravir; G, glycine;  $IC_{50}$ , 50% inhibitory concentration; INSTI, integrase strand transfer inhibitor; K, lysine; R, arginine; RAL, raltegravir; S, serine; Y, tyrosine.

PBMC-based phenotypic assay, both wild-type isolates (numbers 1 and 2, Table 1) showed an  $IC_{50}$  in the low nanomolar range, similar to HIV-2 and HIV-1 references.

**INSTI Susceptibility of HIV-2 Isolates Obtained From INSTI-Experienced HIV-2-Infected Patients**

We also assessed INSTI phenotypic susceptibility of 10 HIV-2 clinical isolates obtained from INSTI-experienced HIV-2-infected patients at the time of virological failure (VF) of an INSTI-based regimen (3 in group A and 7 in group B). For each patient, HIV-2 plasma VL, INSTI plasma concentration, and selected INSTI resistance-associated mutations (RAMs) at the time of VF are described in Table 1. Five isolates presented classical INSTI RAMs (E92Q + T97A; E92Q + T97A + N155H; E92Q + Y143G; Y143R; and G140S + Q148H, respectively), and 5 isolates exhibited no major INSTI RAMs. However, in 4 of these last 5 isolates (numbers 9–12, Table 1), obtained from 3 different patients, we evidenced an unreported insertion of 5 AAs at position 231 of the C-terminal domain of HIV-2 integrase (herein called 231INS), corresponding to a repetition of upstream AAs.

Regarding the unique isolate without RAM or insertion, no change in  $IC_{50}$  was observed, for all INSTI. Different resistance

profiles were observed for the 5 isolates harboring INSTI RAMs (Figure 1). Regarding the 148 resistance pathway, the double mutant G140S + Q148H showed a high level of resistance to CAB, DTG, EVG, and RAL (>300-fold change in  $IC_{50}$ ) and, to a lesser extent, to BIC (32-fold increase). Regarding the 143 resistance pathway, the single Y143R mutation impacted susceptibility to RAL only (10-fold increase) and the double mutant T97A + Y143G combination exhibited an even lower susceptibility to RAL (275-fold increase). Susceptibility to other INSTIs was unchanged for these 2 mutants (Table 1). The double mutant E92Q + T97A showed a 49-fold and >300-fold change in  $IC_{50}$  for RAL and EVG, respectively, whereas DTG and CAB were less impacted (8- and 5-fold change, respectively) and BIC remained active (1.6-fold change). The isolate harboring N155H, in addition to E92Q and T97A, had a similar phenotypic susceptibility to RAL, EVG, and DTG, but had an increased  $IC_{50}$  for BIC and CAB (8-fold and 71-fold change, respectively).

All 4 isolates with 231INS showed a reduced susceptibility to RAL (from 56- to 150-fold) and to EVG (from 8- to 149-fold). They also exhibited a reduced susceptibility to DTG (from 3.3- to 13-fold) and to CAB (from 5- to 79-fold). Two isolates remained susceptible to BIC ( $IC_{50}$  fold changes of 0.2 and 0.6

Downloaded from https://academic.oup.com/cid/advance-article-abstract/doi/10.1093/cid/cy940/5153362 by INSERM user on 02 April 2019

whereas the other 2 isolates, obtained from the same patient, the first at VF of a first RAL-based regimen and the second at VF of a DTG-based regimen 4 years later, showed a slight increase in  $IC_{50}$  to BIC (5.5- and 2.9-fold change, respectively).

#### Phenotypic Inhibitory Quotients

On all available samples, patients had adequate trough plasma concentrations (ie, above 15 and 64 ng/mL for RAL and DTG, respectively). We determined the PIQ, which is the ratio of trough plasma concentration to  $IC_{50}$  (Table 2). Among the 6 patients treated by RAL, plasma samples were available only for patients with a virus harboring 231INS. For these patients, PIQ of RAL was low (median, 1.1 [range, 0.94–1.56]), emphasizing the low susceptibility to RAL of viruses harboring this insertion. On the contrary, patients treated by DTG conserved high PIQ despite the presence of Y143R, E92Q+T97A+N155H, or 231INS mutations (median, 186 [range, 75–5420]). PIQ could not be calculated for the patient infected by the double mutant G140S+Q148H due to an  $IC_{50}$  >1000 nM for DTG. Of note, patients treated by DTG exhibited high DTG trough plasma concentrations, due to an intake of 50 mg of DTG twice a day, boosted by atazanavir.

#### Description of Patients Infected With an HIV-2 Isolate Harboring an Insertion in the Integrase Gene

In our HIV-2 genotypic database, in which viral sequences of patients followed in the ANRS HIV-2 cohort are compiled, 99 integrase sequences were obtained from patients failing an INSTI-based regimen; 231INS was identified in viruses from 6 patients (1 in group A, 5 in group B, including the 3 described in the phenotypic assays) (Table 3). No other INSTI RAM was detected in these 6 viruses. One patient was HIV-1 and HIV-2 dually infected with an undetectable HIV-1 plasma VL throughout his follow-up (Table 3).

For the 5 HIV-2–monoinfected patients, longitudinal samples, collected prior to and during INSTI-based regimen, were retrieved. Integrase sequencing and pharmacological assays were retrospectively performed on samples with detectable HIV-2

plasma VL. None of them presented this insertion motif at initiation of their RAL-based regimen. Insertion was detected a median of 11 months (range, 6–27 months) after initiation of RAL-based therapy, and the median HIV-2 plasma VL at time of 231INS detection was 7980 copies/mL (range, 370–65 600 copies/mL) (Figure 2). All of those patients were ARV-experienced with previous VFs and displayed multiresistant viruses with RAMs in reverse transcriptase (n = 6, with K65R and M184V in 2 and 3 patients, respectively) and/or in protease (n = 5, with 4 harboring the 2 major mutations I50V and I54M) before initiating their RAL-based regimen. This was confirmed by a low GSS (median, 1.5 [range, 1.0–2.5]), reflecting suboptimal ARV therapy. Of note, all patients had adequate RAL plasma concentrations at visits preceding the emergence of this insertion (Figure 2).

The insertion was highly conserved among the 6 viruses, notably regarding the last 2 residues: glycine (G) and arginine (R) or lysine (K) (Figure 3B). The 15-bp insertion was similar to the preceding 15 nucleotides (codons 227–231) in 2 cases and differed by only 1 or 2 nucleotides in 2 other cases (Figure 3C). For the 2 remaining viruses, the repetition pattern was less marked; only the last 6 nucleotides of the insert were similar to those at codons 230 and 231. Retrospective sequencing of available plasma samples revealed that 231INS evolved over time. Indeed, 1 patient exhibited a virus with a transient 2-AA (G-K) insertion 2 years before the emergence of the complete 5-AA insertion (Figure 3B). Moreover, 1 patient presented an R to K substitution on the last AA, while another switched from an Y-R-E-G-R to a G-Y-R-G-R insertion (Figure 3B).

#### DISCUSSION

In this work, we confirmed that HIV-2 isolates obtained from INSTI-naïve patients were susceptible to the 5 available INSTIs [4, 24]. As expected, presence of INSTI RAMs impacted the susceptibility to INSTI of HIV-2 viruses. For RAL, EVG, and DTG, phenotypic susceptibilities were consistent with previous studies, as well as with the European algorithm for HIV-2 genotype resistance interpretation [5, 8, 25]. The  $IC_{50}$  fold

**Table 2. Trough Plasma Concentrations and Phenotypic Inhibitory Quotients of Integrase Strand Transfer Inhibitors**

Isolate No.	Mutation Profile	INSTI at Time of Isolation	INSTI at Time of Drug Measurements	INSTI $IC_{50}$ , nM	INSTI Trough Plasma Concentration, nM, Median (SD)	Phenotypic Inhibitory Quotient, Median (SD)
4	Y143R	RAL	DTG	1.8	9865 (2821)	5420 (1550)
7	E92Q+T97A+N155H	RAL	DTG	21.2	3941 (387)	186 (18)
8	G140S+Q148H	DTG	DTG	>1000	2457 (655)	NA
9	S-R-E-G-K at codon 231	RAL	RAL	102.0	113 (40)	1.11 (0.4)
10	Y-R-E-G-R at codon 231	RAL	RAL	111.0	173 (70)	1.56 (0.6)
11	S-R-E-G-R at codon 231	RAL	RAL	146.0	137 (16)	0.94 (0.1)
12	S-R-E-G-R at codon 231	DTG	DTG	475	3548 (666)	75 (14)

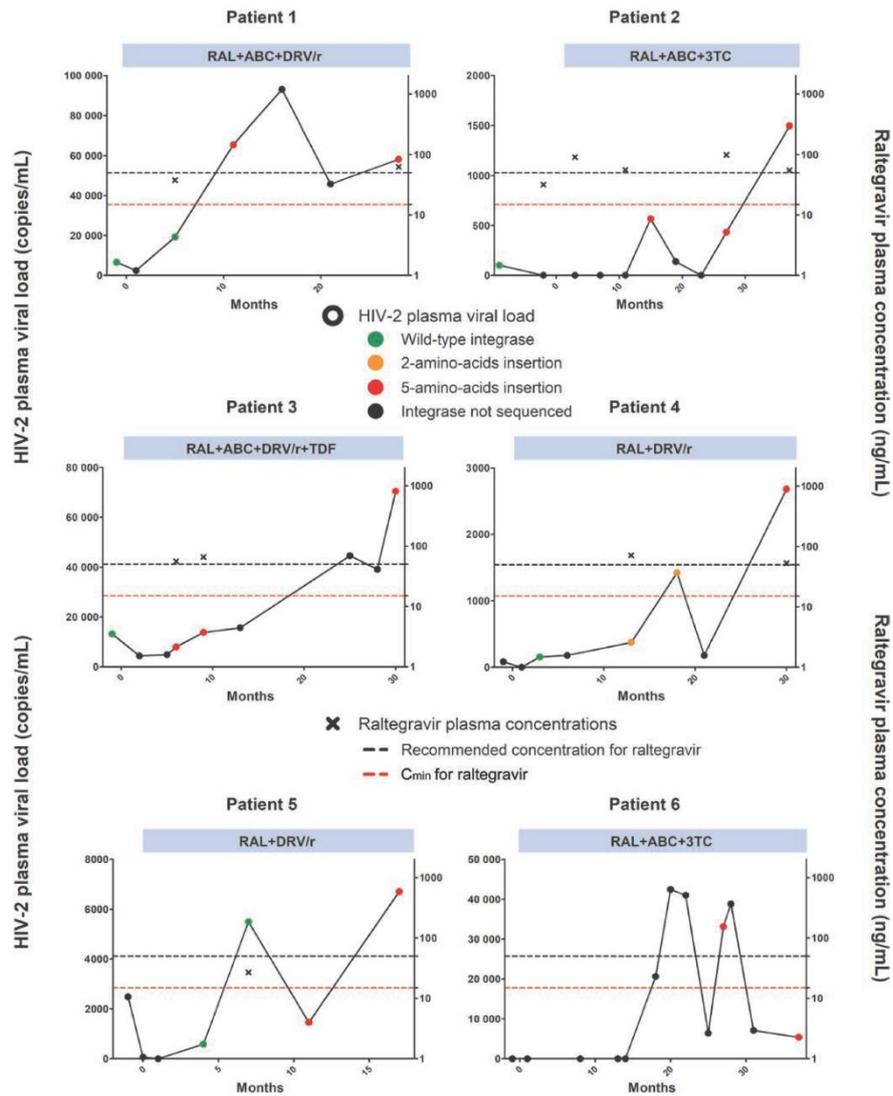
For integrase strand transfer inhibitor (INSTI)-experienced patients, phenotypic inhibitory quotients were obtained by dividing INSTI trough plasma concentrations by the 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ). For patients 3, 5, and 6, no plasma sample was available for drug measurement. Isolates 4 and 7 were obtained from patients failing a RAL-based regimen who were then switched to DTG-based therapy; thus, only DTG concentrations could be measured on available samples.

Abbreviations: DTG, dolutegravir; E, glutamate; G, glycine;  $IC_{50}$ , 50% inhibitory concentration; INSTI, integrase strand transfer inhibitor; K, lysine; NA, not available; R, arginine; RAL, raltegravir; S, serine; SD, standard deviation; Y, tyrosine.

**Table 3. Description of Patients With an Insertion in Human Immunodeficiency Virus Type 2 Integrase**

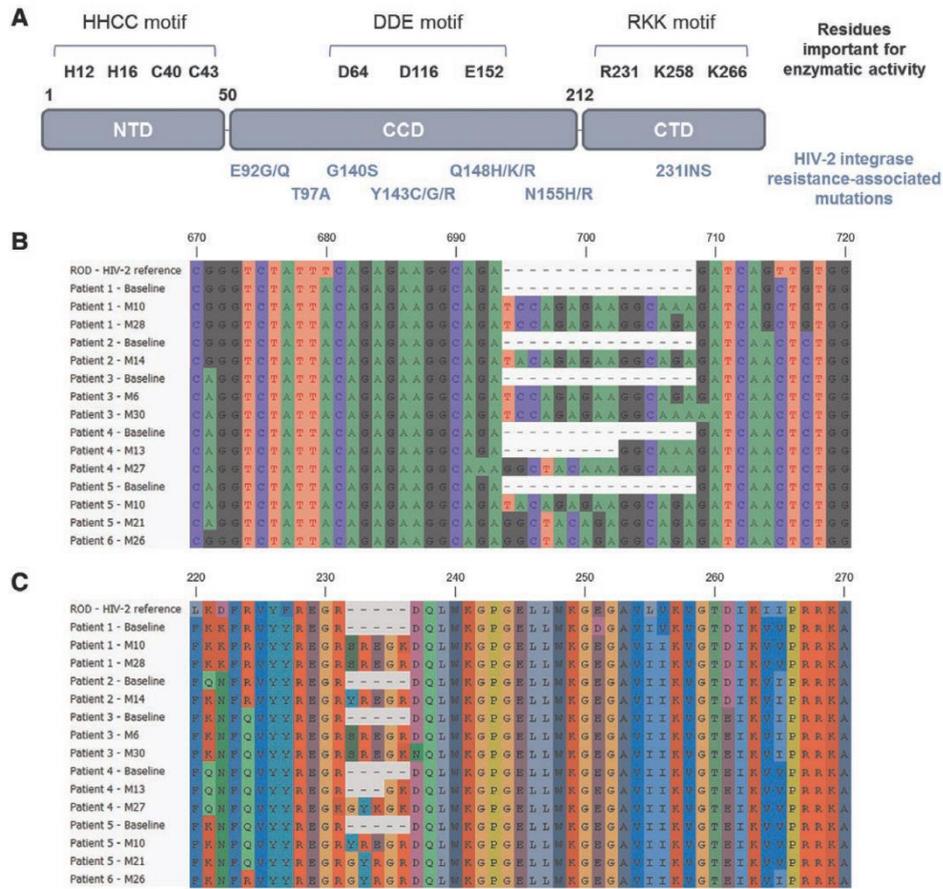
Characteristic	Patient					
	1	2	3	4	5	6
Isolate no. in PBMC phenotypic susceptibility assay <sup>a</sup>	9	10	11/12	ND	ND	ND
HIV-2 group	A	B	B	B	B	B
Age, y	56	58	42	52	28	59
Sex	Male	Male	Male	Male	Male	Female
Time since diagnosis, y	5	7	17	22	28	7
Antiretroviral therapy	RAL+ABC+DRV/r	RAL+ABC+3TC	RAL+ABC+DRV/r+TDF	RAL+DRV/r	RAL+DRV/r	RAL+ABC+3TC
Months since initiation of an INSTI-based regimen	10	14	6	13	10	26
HIV-2 plasma viral load, copies/mL	65600	570	7980	370	2680	33 100
Insertion profile at codon 231 of HIV-2 integrase	S-R-E-G-K	Y-R-E-G-R	S-R-E-G-R	G-K	G-Y-K-G-K	G-Y-R-G-R
Cumulative genotype	M184V+T215Y	M184V+T215Y	K65R+T69S	K65R	K65R	K70N+V111I+M184V
GSS, including RAL	15	15	2.5	None	150V	V47A+I50V+L90M
RAL trough plasma concentrations at previous visit, ng/mL	38	56	56	268	163	27

A 5-amino-acid insertion at codon 231 (231INS) of the HIV-2 integrase region was observed in 6 patients: 1 of them (patient 4) exhibited a transient 2-amino-acid insertion 2 years before selecting the complete 5-amino-acid insertion. Patients' characteristics at time of first detection of insertion are depicted in this table. The RT, protease, and integrase regions were sequenced on samples collected prior to and during INSTI-based regimens. Resistance-associated mutations (RAMs) depicted in this table correspond to all mutations observed in RT and protease before the emergence of 231INS. GSS was computed using RAMs observed on the cumulative genotype, according to the HIV-2 algorithm [5]. Abbreviations: 3TC, lamivudine; ABC, abacavir; DRV/r, ritonavir-boosted darunavir; E, glutamate; G, glycine; GSS, genotypic susceptibility score; HIV-2, Human Immunodeficiency Virus type 2; INSTI, integrase strand transfer inhibitor; K, lysine; NA, not available; ND, not done; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; R, arginine; RAL, raltegravir; RT, reverse transcriptase; S, serine; TDF, tenofovir disoproxil fumarate; Y, tyrosine. <sup>a</sup>isolate number corresponds to the one used in Table 1 and Figure 1.



**Figure 2.** Virological and pharmacological follow-up of patients prior to and after selecting an insertion in human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) integrase. For each patient, we represented the evolution of HIV-2 plasma viral load and raltegravir (RAL) trough concentrations during the months preceding and following the initiation of a RAL-based regimen. Viral loads and RAL concentrations are represented with black circles and crosses, respectively. We retrospectively sequenced integrase regions on available samples (colored circles). Circles are colored in green when HIV-2 integrase was wild-type (neither resistance-associated mutation nor insertion), in orange when a 2-amino-acid insertion emerged, and in red when the complete 5-amino-acid insertion was detected. For each patient, antiretroviral therapy at the time of 231 insertion selection is indicated. The patient number corresponds to numbers defined in Table 3. Of note, the HIV-1/HIV-2-coinfected patient had an undetectable HIV-1 plasma viral load throughout his follow-up. Abbreviations: 3TC, lamivudine; ABC, abacavir;  $C_{min}$ , minimal concentration; DRV/r, ritonavir-boosted darunavir; HIV-2, Human Immunodeficiency Virus type 2; RAL, raltegravir; TDF, tenofovir disoproxil fumarate.

Downloaded from https://academic.oup.com/cid/advance-article-abstract/doi/10.1093/cid/ciy940/5153362 by INSERM user on 02 April 2019



**Figure 3.** Sequences of wild-type and insert-containing human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) integrase. **A**, Schematic representation of HIV-2 integrase. Three domains are defined in HIV integrase: N-terminal domain (NTD; codons 1–50), catalytic core domain (CCD; codons 51–212), and C-terminal domain (CTD; codon 213 to the end). Three important amino-acid motifs for integrase activity are described: HHCC in NTD, DDE in CCD, and RKK in CTD. The HHCC motif is implied in Zn<sup>2+</sup>-binding and multimerization; the DDE motif is the catalytic core of the enzyme, implied in the 3'-processing and strand transfer activities; and the RKK motif plays a role in nonspecific DNA binding [24, 35]. **B**, Alignment of amino-acid sequences at baseline and at time of virological failure. Codons 220–270 of HIV-2 integrase of the 6 viruses, as well as ROD, the HIV-2 reference strain, are aligned. **C**, Alignment of nucleotide sequences at baseline and at time of virological failure. Nucleotides 673–723 (ie, codons 225–241) of HIV-2 integrase of the 6 HIV-2 isolates, as well as ROD, are aligned. For **B** and **C**, each sequence is labeled with the patient number, using the numbers defined in Table 3, and is annotated either "Baseline" or "Mx," depending on whether the sequence was obtained at baseline or at virological failure, X months after initiating the raltegravir-based regimen. Abbreviations: CCD, catalytic core domain; CTD, C-terminal domain; HIV-2, human immunodeficiency virus type 2; NTD, N-terminal domain.

changes to RAL, EVG, and DTG were higher for viruses bearing the combinations E92Q + T97A, E92Q + T97A + N155H, and G140S + Q148H, in accordance with the literature [8, 25].

We also assessed susceptibility of integrase-mutated isolates to the 2 more recent integrase inhibitors, BIC and CAB. To date, no data are available for HIV-2 susceptibility to BIC, and only 1 study has explored susceptibility to CAB [26]. On most of the isolates tested in this study, CAB exhibited similar efficacy as DTG. Isolates

harboring the Y143R and T97A + Y143G mutations were susceptible to CAB, while the isolates harboring the E92Q + T97A and G140S + Q148H mutations were moderately and highly resistant to CAB, respectively. However, IC<sub>50</sub> fold changes were higher for CAB than DTG for the triple mutant E92Q + T97A + N155H. This lower susceptibility to CAB of some integrase-mutated isolates is not surprising as CAB has not been designed to be active on such viruses but to have an extended half-life, making it suitable for

long-acting regimens [27, 28]. A reduced susceptibility to CAB of HIV-1 mutants such as G140S+Q148H/R was recently reported [27, 29–31]. Moreover, our results regarding CAB were similar to those obtained by Smith et al, who also reported a reduced efficiency of CAB against HIV-2 isolates harboring N155H or G140S+Q148H mutations [26]. We also found a reduced susceptibility for an HIV-2 isolate bearing E92Q+T97A, consistent with the  $IC_{50}$  measured for DTG but higher than that observed by Smith and colleagues [9].

BIC is the latest INSTI, recently approved by the US Food and Drug Administration. BIC has been designed to efficiently inhibit HIV integrase mutants that are resistant to DTG [17, 30, 32]. As described for HIV-1, BIC was the most potent INSTI on HIV-2 viruses bearing INSTI RAMs. In our study,  $IC_{50}$  were only increased for 2 integrase-mutated isolates (E92Q+T97A+N155H and G140S+Q148H). For the triple mutant E92Q+T97A+N155H,  $IC_{50}$  fold changes were similar for BIC and DTG. To note, BIC had the lowest  $IC_{50}$  on the double mutant G140S+Q148H, although the fold change remained high, thus limiting its use in clinical practice against G140S+Q148H mutant viruses.

We also report a novel pathway of resistance to INSTI in HIV-2: a 5-AA insertion in the HIV-2 integrase C-terminal domain, at codon 231, also called 231INS. The emergence of this insertion occurred rapidly at VF of a RAL-based regimen, a median of 10 months after initiating this regimen. Interestingly, none of the viruses with this insertion exhibited other INSTI RAMs. This insertion may be an alternative resistance pathway limiting the selection of major INSTI RAMs.

The selection of this insertion may have been facilitated by sub-optimal ARV therapies prescribed to those patients, RAL being the sole fully active agent of the ARV combination in some patients. To date, this mutation has not been identified in HIV-2-infected patients treated by other INSTI, but this may be due to several confounding factors. Selection of this insertion could be facilitated in patients failing a regimen comprising an INSTI with a low genetic barrier (EVG and RAL) rather than one with a high genetic barrier (DTG, CAB, and BIC). We have not observed this insertion in patients failing an EVG-based regimen, despite its low genetic barrier, but EVG is not recommended for the treatment of HIV-2-infected patients in France [33]. Regarding the 3 other INSTIs, a DTG-based regimen has only been available recently for HIV-2-infected patients, whereas CAB and BIC are not yet available for HIV-2-infected patients. Thus, we cannot rule out that insertions in HIV-2 integrase could also emerge under those drugs.

This insertion occurred on one of the codons composing the RKK motif (R231, K258, and K264), which plays a role in DNA binding [24, 34, 35] and is highly conserved among HIV-2 and HIV-1 viruses. It has been reported that the HIV-1 integrase R231A mutant had a halved DNA binding activity, compared to the wild-type HIV-1 integrase, but also a halved 3'-processing activity [36]. These findings suggest that the RKK motif

is crucial for different enzymatic activities of HIV integrase, which thus could be impacted by the 231INS [36].

This resistance profile reminds insertions observed at codon 69 in HIV-1 reverse transcriptase (RT69) in the early 1990s, at VF of regimens including 1 or 2 nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) [37–39]. Inserts ranged from 1 to 11 codons, and susceptibility to most NRTIs was impacted. Regarding RT69 insertions, the prevalence of insert-containing HIV-1 strains (around 2.0%) was lower than other major reverse transcriptase RAMs [37]. In our study, prevalence of 231INS was estimated at 6.1% among the 99 patients failing an INSTI-based regimen but remained less frequent than other major INSTI RAMs (Y143C/G/R, G140S, Q148H/R, N155H, E92Q, and T97A). Winters et al also pointed out that 2-AA insertions frequently consisted of a repetition of the 6-bp of codons 68 and 69 [37]. We also observed this repeating nucleotide pattern in HIV-2 integrase; 4 patients presented a 5-AA insertion with 2 nucleotides or less differing from those at codons 228–231 of their wild-type integrase. In some patients, 231INS pattern evolved over time, with recent sequences being more different from the upstream nucleotides than the first insertion observed.

Interestingly, HIV-2 virus of 1 patient exhibited a transient G-K insertion at codon 231, on 2 samples, before selecting the complete 5-AA insertion. These 2 codons are the most conserved among the 6 viruses harboring the complete 5-AA insertion. The second-to-last AA is always a glycine (G) and the last one is either a lysine (K) or an arginine (R). Thus, we hypothesized that this insertion could be achieved in 2 steps, first the insertion of residues G and K/R, followed by the insertion of 3 additional AAs. Whether resistance to INSTI can be achieved with the 2-AA insertion remains to be explored. Moreover, biochemical analyses are required to determine the impact of those 2 insertion profiles on integrase structure and/or activity. In vitro experiments are also needed to characterize the viral fitness of these mutant viruses.

This work also underlines the importance of universal access to HIV-2 resistance testing to limit the expansion of drug-resistant viruses, as recently recommended [40]. Furthermore, HIV-2-infected patients experiencing VF under INSTI-based regimens, especially those with multidrug-resistant viruses with very limited therapeutic options, should benefit from attentive clinical, pharmacological, and virological monitoring. These data also highlight a crucial need for new ARV therapies for HIV-2-infected patients, to tackle the HIV-2 epidemic.

#### Notes

**Acknowledgments.** The authors thank all of the patients and the clinical and virological investigators involved in the Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis CO5 human immunodeficiency virus type 2 cohort. Bictegravir was provided by Gilead Sciences for this study. Dolutegravir, elvitegravir, and raltegravir have been previously obtained from ViiV Healthcare, Gilead Sciences, and Merck, respectively.

**Financial support.** This work was supported by the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM)/French National

Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS). A grant of the Assistance Publique–Hôpitaux de Paris supported Q. L. H.

**Potential conflicts of interest.** C. C. has received honoraria and travel grants from Gilead Sciences, Merck Sharp & Dohme (MSD), ViiV Healthcare, and Janssen-Cilag. D. D. has received honoraria and travel grants from Gilead Sciences, Bristol-Myers Squibb, ViiV Healthcare, and Janssen-Cilag. M. L. has received nonfinancial support for travel from Janssen-Cilag and ViiV Healthcare. G. P. has received travel grants, consultancy fees, honoraria, or study grants from various pharmaceutical companies including Gilead Sciences, Merck, Janssen, and ViiV Healthcare. S. M. has received grants from MSD and nonfinancial support from Gilead. All other authors report no potential conflicts. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

## References

- Raugi DN, Smith RA, Gottlieb GS; University of Washington-Dakar HIV-2 Study Group. Four amino acid changes in HIV-2 protease confer class-wide sensitivity to protease inhibitors. *J Virol* **2016**; 90:1062–9.
- Witvrouw M, Pannecouque C, Switzer WM, Folks TM, De Clercq E, Heneine W. Susceptibility of HIV-2, SIV and SHIV to various anti-HIV-1 compounds: implications for treatment and postexposure prophylaxis. *Antivir Ther* **2004**; 9:57–65.
- Borrego P, Calado R, Marcelino JM, et al. Baseline susceptibility of primary HIV-2 to entry inhibitors. *Antivir Ther* **2012**; 17:565–70.
- Desbois D, Roquebert B, Peytavin G, et al; French ANRS HIV-2 Cohort (ANRS CO 05 VIH-2). In vitro phenotypic susceptibility of human immunodeficiency virus type 2 clinical isolates to protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52:1545–8.
- Charpentier C, Camacho R, Ruelle J, et al. HIV-2EU-supporting standardized HIV-2 drug-resistance interpretation in Europe: an update. *Clin Infect Dis* **2015**; 61:1346–7.
- Gottlieb GS, Badiane NM, Hawes SE, et al; University of Washington-Dakar HIV-2 Study Group. Emergence of multiclass drug-resistance in HIV-2 in antiretroviral-treated individuals in Senegal: implications for HIV-2 treatment in resource-limited West Africa. *Clin Infect Dis* **2009**; 48:476–83.
- Descamps D, Damond F, Matheron S, et al; French ANRS HIV-2 Cohort Study Group. High frequency of selection of K65R and Q151M mutations in HIV-2 infected patients receiving nucleoside reverse transcriptase inhibitors containing regimen. *J Med Virol* **2004**; 74:197–201.
- Smith RA, Raugi DN, Kiviat NB, et al; University of Washington-Dakar HIV-2 Study Group. Phenotypic susceptibility of HIV-2 to raltegravir: integrase mutations Q148R and N155H confer raltegravir resistance. *AIDS* **2011**; 25:2235–41.
- Smith RA, Raugi DN, Pan C, et al. In vitro activity of dolutegravir against wild-type and integrase inhibitor-resistant HIV-2. *Retrovirology* **2015**; 12. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4328052/>. Accessed 30 March 2018.
- Descamps D, Peytavin G, Visseaux B, et al. Dolutegravir in HIV-2-infected patients with resistant virus to first-line integrase inhibitors from the French named patient program. *Clin Infect Dis* **2015**; 60:1521–7.
- Matheron S, Descamps D, Gallien S, et al. First-line raltegravir/emtricitabine/tenofovir combination in human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection: a phase 2, noncomparative trial (ANRS 159 HIV-2). *Clin Infect Dis* **2018**; 67:1161–67.
- Ba S, Raugi DN, Smith RA, et al; University of Washington-Dakar HIV-2 Study Group. A trial of a single-tablet regimen of elvitegravir, cobicistat, emtricitabine, and tenofovir disoproxil fumarate for the initial treatment of human immunodeficiency virus type 2 infection in a resource-limited setting: 48-week results from Senegal, West Africa. *Clin Infect Dis* **2018**; 67:1588–94.
- Le Hingrat Q, Perrier M, Collin G, et al. Efficiency of HIV-2 cultures from clinical isolates is enhanced after purification by anti-CD44 microbeads. *J Virol Methods* **2018**; 257:12–5.
- Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **1986**; 233:343–6.
- Wain-Hobson S, Vartanian JP, Henry M, et al. LAV revisited: origins of the early HIV-1 isolates from Institut Pasteur. *Science* **1991**; 252:961–5.
- Brun-Vézinet F, Ingrand D, Deforges L, et al. HIV-1 sensitivity to zidovudine: a consensus culture technique validated by genotypic analysis of the reverse transcriptase. *J Virol Methods* **1992**; 37:177–88.
- Tsiang M, Jones GS, Goldsmith J, et al. Antiviral activity of bictegravir (GS-9883), a novel potent HIV-1 integrase strand transfer inhibitor with an improved resistance profile. *Antimicrob Agents Chemother* **2016**; 60:7086–97.
- Avettand-Fenoel V, Damond F, Gueudin M, et al; ANRS-CO5 HIV-2 and the ANRS-AC11 Quantification Working Group. New sensitive one-step real-time duplex PCR method for group A and B HIV-2 RNA load. *J Clin Microbiol* **2014**; 52:3017–22.
- Charpentier C, Eholié S, Anglaret X, et al; IeDEA West Africa Collaboration. Genotypic resistance profiles of HIV-2-treated patients in West Africa. *AIDS* **2014**; 28:1161–9.
- Jung BH, Rezk NL, Bridges AS, Corbett AH, Kashuba AD. Simultaneous determination of 17 antiretroviral drugs in human plasma for quantitative analysis with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* **2007**; 21:1095–104.
- Markowitz M, Morales-Ramirez JO, Nguyen BY, et al. Antiretroviral activity, pharmacokinetics, and tolerability of MK-0518, a novel inhibitor of HIV-1 integrase, dosed as monotherapy for 10 days in treatment-naïve HIV-1-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2006**; 43:509–15.
- Elliot F, Amara A, Jackson A, et al. Dolutegravir and elvitegravir plasma concentrations following cessation of drug intake. *J Antimicrob Chemother* **2016**; 71:1031–6.
- Laethem KV, Luca AD, Antinori A, Cingolani A, Perno CF, Vandamme A-M. A genotypic drug resistance interpretation algorithm that significantly predicts therapy response in HIV-1-infected patients. *Antivir Ther* **2002**; 7:123–9.
- Roquebert B, Damond F, Collin G, et al; French ANRS HIV-2 Cohort (ANRS CO 05 VIH-2). 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.
- Ni XJ, Delelis O, Charpentier C, et al. G140S/Q148R and N155H mutations render HIV-2 integrase resistant to raltegravir whereas Y143C does not. *Retrovirology* **2011**; 8:68.
- Smith RA, Wu VH, Zavala CG, et al. In vitro antiviral activity of cabotegravir against HIV-2. *Antimicrob Agents Chemother* **2018**; 62. doi:10.1128/AAC.01299-18.
- Margolis DA, Brinson CC, Smith GHR, et al; LAI116482 Study Team. Cabotegravir plus rilpivirine, once a day, after induction with cabotegravir plus nucleoside reverse transcriptase inhibitors in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection (LATTE): a randomised, phase 2b, dose-ranging trial. *Lancet Infect Dis* **2015**; 15:1145–55.
- Margolis DA, Gonzalez-Garcia J, Stellbrink HJ, et al. Long-acting intramuscular cabotegravir and rilpivirine in adults with HIV-1 infection (LATTE-2): 96-week results of a randomised, open-label, phase 2b, non-inferiority trial. *Lancet* **2017**; 390:1499–510.
- Yoshinaga T, Kobayashi M, Seki T, et al. Antiviral characteristics of GSK1265744, an HIV integrase inhibitor dosed orally or by long-acting injection. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**; 59:397–406.
- Hassounah SA, Alikhani A, Oliveira M, et al. Antiviral activity of bictegravir and cabotegravir against integrase inhibitor resistant SIMmac239 and HIV-1. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**; 61:e01695–17.
- Yoshinaga T, Seki T, Miki S, et al. Novel secondary mutations C56S and G149A confer resistance to HIV-1 integrase strand transfer inhibitors. *Antiviral Res* **2018**; 152:1–9.
- Smith SJ, Zhao XZ, Burke TR, Hughes SH. Efficacies of cabotegravir and bictegravir against drug-resistant HIV-1 integrase mutants. *Retrovirology* **2018**; 15. doi:10.1186/s12977-018-0420-7.
- Morlat P. French HIV Experts Group. Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH. Sous la direction du Pr Philippe Morlat et sous l'égide du CNS et de l'ANRS. Paris: 2013. Available at: <https://cns.sante.fr/actualites/prise-en-charge-du-vih-recommandations-du-groupe-dexperts/>. Accessed 8 April 2018.
- 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.
- Eijkelenboom AP, Sprangers R, Hård K, et al. Refined solution structure of the C-terminal DNA-binding domain of human immunodeficiency virus-1 integrase. *Proteins* **1999**; 36:556–64.
- Lutzke RAP, Plasterk RHA. Structure-based mutational analysis of the C-terminal DNA-binding domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase: critical residues for protein oligomerization and DNA binding. *J Virol* **1998**; 72:4841–4848.
- Winters MA, Cooley KL, Girard YA, et al. A 6-basepair insert in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1 confers resistance to multiple nucleoside inhibitors. *J Clin Invest* **1998**; 102:1769–75.
- Masquelier B, Race E, Tamalet C, et al; ANRS AC11 Resistance Study Group. French Agence Nationale de Recherches sur le SIDA. Genotypic and phenotypic resistance patterns of human immunodeficiency virus type 1 variants with insertions or deletions in the reverse transcriptase (RT): multicenter study of patients treated with RT inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45:1836–42.
- Larder BA, Bloor S, Kemp SD, et al. A family of insertion mutations between codons 67 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer multinucleoside analog resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**; 43:1961–7.

40. Gottlieb GS, Raugi DN, Smith RA. 90-90-90 for HIV-2? Ending the HIV-2 epidemic by enhancing care and clinical management of patients infected with HIV-2. *Lancet HIV* 2018; 5:e390-9.
41. Charpentier C, Larrouy L, Collin G, et al; French ANRS HIV-2 Cohort (ANRS CO5 VIH-2). In-vitro phenotypic susceptibility of HIV-2 clinical isolates to the integrase inhibitor S/GSK1349572. *AIDS* 2010; 24:2753-5.

## APPENDIX

### ANRS CO5 HIV-2 cohort.

*Scientific Committee:* S. Matheron (coordinating investigator), V. Appay (immunologist), B. Autran (immunologist), A. Besseghir (statistician), F. Brun-Vezinet Françoise (virologist), V. Petrov Sanchez (Sponsor Institute of Health and Medical Research [INSERM]-Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis [ANRS]), G. Chêne (methodologist), F. Collin (Project Leader), R. Cheyrier (immunologist), F. Damond (virologist), D. Descamps (virologist), L. Marchand (sponsor INSERM-ANRS), F. Simon (virologist).

*Methodological coordination:* G. Chêne, F. Collin (INSERM U1219, Bordeaux).

*Data management and statistical analysis:* N. Chaghil, V. Conte, A. Ozanne, L. Pinoges.

*Clinical investigators:* Pr Meyohas (Centre Hospitalier Universitaire [CHU] St Antoine, Paris); Pr Salmon (CHU Cochin, Paris); Pr Rami (CHU Lariboisière, Paris); Pr Pialoux (CHU Tenon, Paris); Pr Matheron (CHU Bichat-Claude Bernard, Paris); Dr Tubiana (CHU Pitié Salpêtrière, Paris); Dr De Truchis (Raymond Poincaré, Garches); Dr Khuong-Josses (Centre Hospitalier [CH] Delafontaine, Saint Denis); Dr Derradji (Paul Brousse, Villejuif); Dr Troisvallet (CH de Gonesse, Gonesse); Dr Timsit (CHU Saint Louis, Paris); Dr Jeantils (CH Jean Verdier, Bondy); Pr Patey (CH de Villeneuve Saint Georges, Villeneuve Saint Georges); Pr Goujard (CHU Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre); Dr Gérard (CHU Saint Louis, Paris); Dr Mortier (CHU Louis Mourier, Colombes); Dr Froguel (Lagny – Marne la Vallée, Jossigny); Dr Welker (CH de Saint Germain en Laye, St Germain en Laye); Dr Daneluzzi (CH Max Fourestier, Nanterre); Dr Genet (CH Victor Dupouy, Argenteuil); Dr Leprêtre (CH d'Eaubonne-Montmorency, Eaubonne); Dr Zucman (CH Foch, Suresnes); Dr Force (Institut Franco-Britannique, Levallois Perret); Dr Coutellier-Simon (CHU Pitié Salpêtrière, Paris); Dr Deleuze (CHU Cochin, Paris); Pr Weiss (CHU Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris); Dr Garrait (Centre Hospitalier Intercommunal [CHI] de Créteil, Créteil); Dr Masson Colin (CH de Poissy, Poissy); Dr Blum (CH René Dubos, Pontoise); Pr Lelièvre (CHU Henri Mondor, Créteil); Dr Dulioust (Centre Médico – Chirurgical de Bligny, Briis sous Forge); Dr Perrone (CH François Quesnay, Mantes la jolie); Dr Winter (CHI André Grégoire, Montreuil); Dr La Torre (CH de l'agglomération Montargé, Montargis); Pr Molina (CHU Saint Louis, Paris); Dr Brunet (CH Arpajon, Arpajon); Dr Devidas (CH Sud Francilien, Corbeil Essonnes); Pr Rouveix (CHU Ambroise Paré, Boulogne Billancourt); Dr Kernbaum (Hôpital Américain de Paris, Neuilly-sur-Seine); Dr Duvivier (Institut Pasteur, Paris); Dr Bouldouyre (CH Roger Balanger, Aulnay-sous-Bois);

Dr Bodard (Institut Mutualiste Montsouris, Paris); Dr Imbert (Hôpital Bégin, Saint Mandé); Pr Boué (CHU Antoine Bécère, Clamart); Dr Uludag (CHU Beaujon, Clichy); Dr Chaix (Hôpital de Longjumeau, Longjumeau); Pr Bouchaud (Hôpital Avicenne, Avicenne); Pr Viard (CHU Hôtel Dieu, Paris); Pr Duval (CHU Bichat-Claude Bernard, Paris); Dr Greder-Belan (CH André Mignot, Versailles); Dr Grégoire (René Arbelletier, Coulommiers); Dr Beck-Wirt (CH de Mulhouse, Mulhouse); Pr Raffi (CHU Hôtel-Dieu, Nantes); Dr Drobacheff (CHU Minjoz, Besançon); Dr Allègre (CH du Pays d'Aix, Aix en Provence); Pr Verdon (Côte de Nacre, Caen); Dr Poizot-Martin (CH Régional, Marseille); Dr Daniel (CHU de Saint Brieu, Saint Brieu); Dr Machado (CH de Compiègne, Compiègne); Pr Marchou (CHU Purpan, Toulouse); Pr Bernard (CHU Bretonneau, Tours); Dr Debab (CHU Charles Nicolle, Rouen); Dr Leclercq (CHU Michallon, Grenoble); Dr Julien (CH Jacques Cœur, Bourges); Dr Moreau (Hôpital Nord, Marseille); Dr Arvieux (CHU Pontchaillou, Rennes); Dr Michaud (CH de Saint Nazaire, Saint Nazaire); Dr Makhloufi (CHU Edouard Herriot, Lyon); Dr Lemoal (CHU Jean Bernard, Poitiers); Dr Arzac (Centre Hospitalier Régional d'Orléans, Orléans); Dr Lafeuillade (CH Sainte Musse, Toulon); Dr Martha (CH William Morey, Chalon-sur-Saône); Dr Perré (CH de La Roche sur Yon, La Roche sur Yon); Dr Ajana (CH Gustave Dron, Tourcoing); Pr Morlat (Hôpital Saint-André, Bordeaux); Dr Brottier – Mansini (Hôpital de la Rochelle, La Rochelle); Pr Dupon (CHU Pellegrin, Bordeaux); Pr Pellegrin (CHU Haut-Lévêque, Pessac); Dr Montagne (Hôpital de Cannes, Cannes); Pr May (CHU de Nancy Brabois, Vandoeuvre les Nancy); Dr Wille (CH de la Côte basque, Bayonne); Dr Douadi (CH de Saint Quentin, St Quentin); Pr Reynes (CHU Montpellier, Montpellier); Pr Schmit (CHU d'Amiens – Hôpital Nord, Amiens); Dr Rouger (CH Robert Debré, Reims); Dr Poinsignon (CH Prosper Chubert, Vannes); Dr Jacomet (CHU de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand); Pr Piroth (Hôpital du Bocage, Dijon); Dr Rosenthal (CH de l'Archet, Nice); Dr Garipuy (CH Joseph Ducuing, Toulouse); Dr Riché (CH d'Angoulême, Angoulême); Dr PrevotEAU du Clary (Hôpital la Grave, Toulouse); Dr Naqvi (CH de l'Archet, Nice); Dr Gaillat (CH Annecy-Genévois, Annecy); Dr Rey, (Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg); Dr Abino (Hôpital Eugénie, Ajaccio); Pr Mercié (Hôpital St André, Bordeaux); Pr Roger (CH de Draguignan, Draguignan); Dr Aïssi (CH Dr Schaffner, Lens); Dr Chennebault (CHU d'Angers, Angers); Dr Liné (CH de Soissons, Soissons); Dr Randrianasolo (CH Chaumont, Chaumont); Dr Merle (CH de Vesoul, Vesoul); Dr Granet (CH de Dignes Les Bains, Dignes Les Bains); Dr Caunègre (CH de Dax, Dax); Dr Cotte (CHU La Croix Rousse, Lyon); Dr Boileau (CH du Pays de Molaix, Molaix); Dr Perfézou (CH Laennec, Quimper); Dr Lefebvre (Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg); Dr Talarmin (CH Laennec, Quimper); Dr Chirouze (CHU Minjoz, Besançon); Dr Pavel (CH de Troyes, Troyes); Dr Ponceau (CH de Valence, Valence); Pr Sotto (CHU de Nîmes, Nîmes); Dr Vandendriessche (CH du Havre, Le Havre); Dr Darasteau (CH de Chartres, Chartres).

Downloaded from https://academic.oup.com/cid/advance-article-abstract/doi/10.1093/cid/ciy940/5153362 by INSERM user on 02 April 2019

### 3. Troisième article

**Impact des insertions dans le gène de l'intégrase du VIH-2  
sur la capacité répliquative, la structure protéique  
et la sensibilité phénotypique aux inhibiteurs d'intégrase  
(article en cours de rédaction)**

**Contexte :**

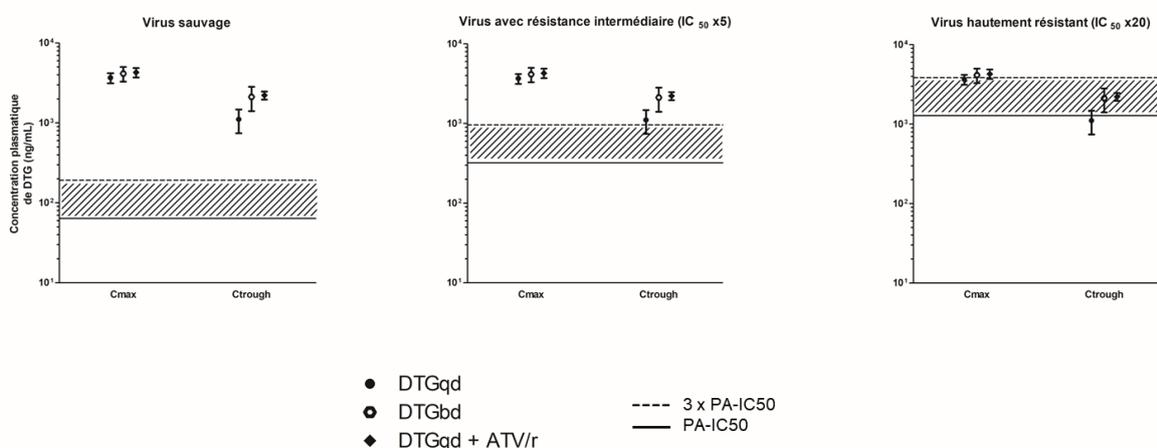
Ayant observé un nouveau profil de résistance aux inhibiteurs d'intégrase, via l'insertion de 5 acides aminés après le codon 231, et étant confrontés à plusieurs cas d'impasses thérapeutiques chez des PVVIH-2 présentant des virus avec des résistances à toutes les classes d'antirétroviraux, nous avons souhaité étudier en détail ces résistances, leur impact sur la sensibilité aux inhibiteurs d'intégrase, ainsi que sur la capacité répliquative de ces virus mutants.

Il est crucial de connaître précisément le niveau de résistance induit par les différents profils de mutations, notamment ceux peu ou prou décrits dans la littérature. En effet, selon l'ampleur de l'augmentation de la  $CI_{50}$ , différentes stratégies d'adaptation thérapeutique pourront être adoptées : 1) changer certaines molécules de la trithérapie pour d'autres molécules demeurant pleinement actives sur les virus mutés du patient, 2) augmenter les posologies de certains médicaments ou passer d'une à deux prises par jour, ou 3) proposer des traitements dits « de sauvetage » aux patients infectés par des virus multi-résistants, c'est-à-dire porteurs de mutations vis-à-vis de plusieurs classes d'antirétroviraux.

Du fait de la sélection rapide de mutations de résistance chez les PVVIH-2, dont certaines entraînant des résistances croisées à plusieurs molécules, les options thérapeutiques sont rapidement limitées chez les PVVIH-2 en échec virologique. Les deux dernières options sont donc régulièrement envisagées. Ainsi, une mutation entraînant une faible augmentation de la  $CI_{50}$  incite à ne pas utiliser cette molécule chez un patient pour lequel d'autres options thérapeutiques sont disponibles mais elle pourra être prescrite aux patients infectés par des virus multi-résistants, en augmentant les doses afin d'augmenter les concentrations plasmatiques et de conserver une concentration résiduelle au moins 3 fois supérieure à la  $CI_{50}$  ajustée aux protéines plasmatiques. C'est une stratégie notamment utilisée avec les inhibiteurs d'intégrase pour lesquels les concentrations maximales et résiduelles peuvent être augmentées

en passant à une prise bi-quotidienne de dolutegravir. L'autre possibilité pour augmenter les concentrations de dolutegravir ou de bictégravir est de co-administrer de l'atazanavir, un inhibiteur de protéase qui est inefficace sur le VIH-2 mais va augmenter les concentrations de l'inhibiteur d'intégrase en inhibant UGT1A1 et CYP3A qui métabolisent dolutegravir et bictégravir (Gallant et al., 2017; Song et al., 2011) (Figure 23).

Les thérapies de « sauvetage » vont classiquement associer à une trithérapie, dont l'efficacité toute seule est insuffisante, à d'autres molécules divergeant par leurs mécanismes d'action (foscarnet en cure d'induction puis d'entretien, ibalizumab, etc.)



**FIGURE 23 : RATIONNEL DERRIERE LE DOUBLEMENT DE DOSE D'UN INHIBITEUR D'INTEGRASE OU LA CO-ADMINISTRATION D'ATAZANAVIR**

*Abréviations : ATV/r : atazanavir boosté par ritonavir ; Cmax : concentration au pic ; Ctrough : concentration résiduelle ; DTG : dolutegravir ; qd : quotidien ; bd : biquotidien ; PA-IC<sub>50</sub> : CI<sub>50</sub> ajustée aux protéines plasmatiques (soit 64ng/mL pour le dolutegravir sur un VIH-1 sauvage) et 3 x PA-IC<sub>50</sub> (seuil communément admis comme limite inférieure pour la Ctrough).*

*Les valeurs utilisées pour les concentrations plasmatiques de DTG sont celles rapportées par les essais SPRING-1 et SPRING-2, soit une concentration minimale à 3670 ng/mL et une concentration résiduelle à 1110 ng/mL (coefficient de variation de 20 et 46% respectivement) pour le DTG en prise quotidienne et une concentration maximale à 4150 ng/mL et une concentration résiduelle à 2120 ng/mL (coefficient de variation de 29 et 47%, respectivement) (van Lunzen et al., 2012; Raffi et al., 2013). Les valeurs utilisées pour les concentrations plasmatiques de DTG en association avec ATV/r sont celles rapportées par Song et al., 2011.*

## **Objectif :**

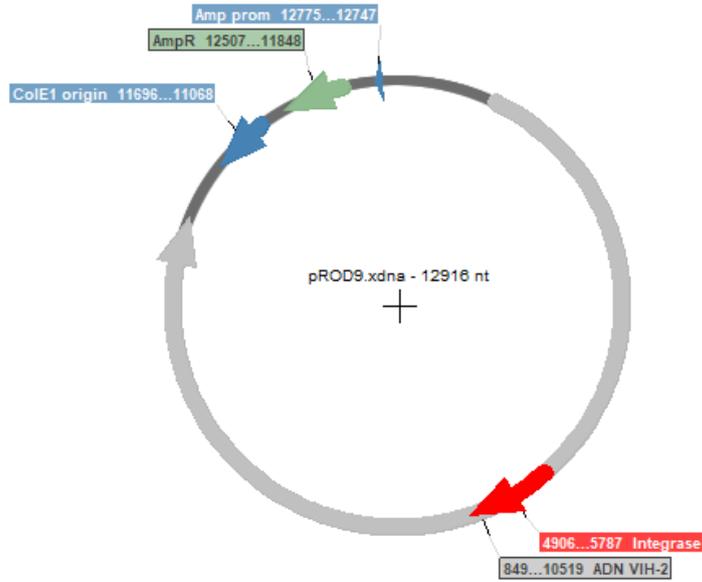
Ce travail vise à appréhender l'impact des mutations de résistances dans le gène de l'intégrase sur : 1) le niveau de réplication virale, 2) la résistance aux différents inhibiteurs d'intégrase, et 3) la structure prédite de ces protéines. De plus, ce travail a pour but de cartographier les mutations de résistance aux inhibiteurs de transfert de brin de l'intégrase chez les personnes infectées par le VIH-2, via une étude rétrospective des génotypes de résistance effectués au laboratoire de virologie de l'hôpital Bichat-Claude Bernard.

## **Matériel et méthodes :**

Tout d'abord, l'identification de l'ensemble des séquences VIH-2 disponibles sur la base de données Smartgene® du laboratoire de virologie de l'hôpital Bichat-Claude Bernard a été réalisée. Seules les séquences des gènes de la protéase, de la transcriptase inverse, de l'intégrase et de la gp105 des 102 patients actuellement traités, ou ayant reçus par le passé, par inhibiteur d'intégrase ont été sélectionnées. Pour les patients dont certains gènes n'avaient pas été amplifiés (soit par défaut d'amplification, soit car cela n'avait jamais été tenté), un séquençage des gènes de la RT, protéase et de la gp105 a été réalisé. La présence de mutations de résistance dans ces séquences a été interprétée à l'aide de l'algorithme ANRS v29 de novembre 2018 (Annexe 2).

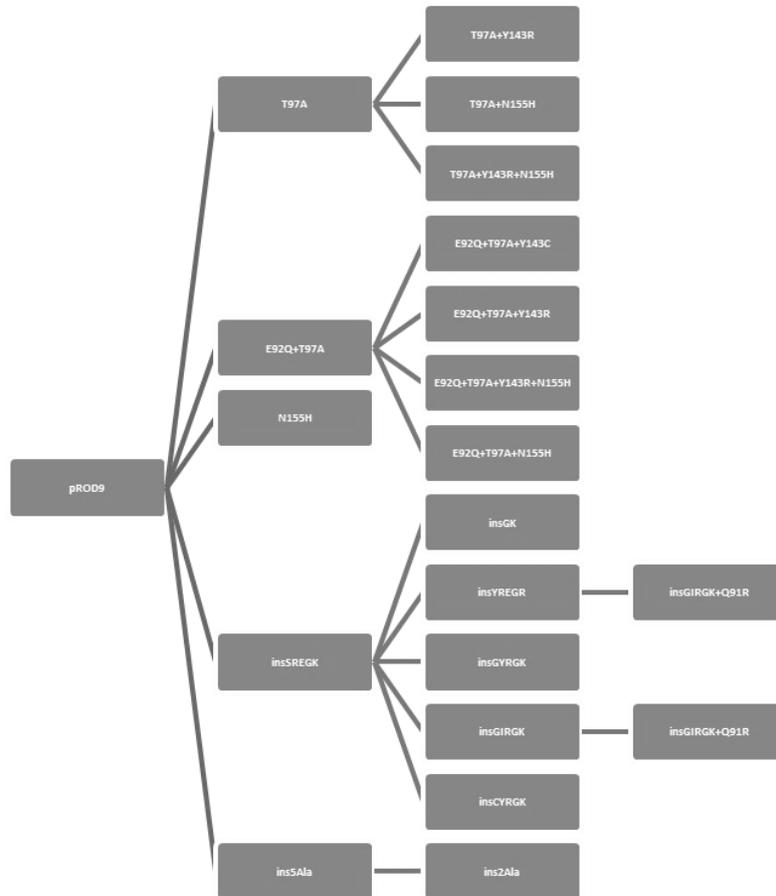
Les profils de résistance observés dans l'intégrase ont été comparés à ceux décrits dans la littérature, afin d'identifier quels mutants n'avaient pas ou peu été étudiés, et donc pour lesquels il est nécessaire d'obtenir des données. Ces mutants d'intérêt ont été obtenus par mutagenèse dirigée sur le plasmide pROD9, plasmide comprenant le génome infectieux du VIH-2, dérivé de la souche de référence « ROD » appartenant au groupe A, ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline (Figure 24).

La mutagenèse dirigée a été réalisée avec le kit Q5® Site-Directed Mutagenesis (New England Biolabs), en suivant les recommandations du fabricant, excepté une modification du protocole de digestion du plasmide parental (digestion réalisée à 37°C pendant 30 minutes pour améliorer sa dégradation). Les plasmides mutés ont été générés par une ou plusieurs réactions de mutagenèse dirigée. En effet, certains mutants, cumulant 2 à 4 substitutions, ne pouvaient être générés en une seule mutagenèse dirigée (Figure 25).



**FIGURE 24 : CARTE DU PLASMIDE PROD9**

*Abréviations : ADN VIH-2 : génome complet de la souche de référence du groupe A du VIH-2, « ROD » ; Amp prom : promoteur du gène de résistance à l'ampicilline ; AmpR : gène de résistance à l'ampicilline ; et ColE1 origin : origine de réplication.*



**FIGURE 25 : CONSTRUCTION DES MUTANTS VIH-2**

Les amorces utilisées pour construire les différents mutants sont détaillées dans le Tableau 4, avec la température d'amplification utilisée pour chaque couple d'amorces. Le programme de mutagenèse dirigée était le suivant : dénaturation à 98°C pendant 30 secondes, puis 25 cycles avec 10 secondes à 98°C (dénaturation), 30 secondes à X°C (hybridation) et 7 minutes à 72°C (élongation), et enfin une extension à 72°C pendant deux minutes, avec X, la température d'amplification spécifique du couple d'amorces.

Mutant	Plasmide parental	Amorce sens	Amorce anti-sens	Ta
T97A	pROD9	agacaagcaGCACTCTTCTATTGAAAC	tctgattcCTGTGGGATGACTTCTGC	59°C
E92Q+T97A	pROD9	agacaagcaGCACTCTTCTATTGAAAC	tctgactgCTGTGGGATGACTTCTGC	59°C
N155H	pROD9	agtagtagaagcaatgacCACCATCTAAAAA ACCAAATAAG	ccttgctctgtggattgtaAGGTACTCCAAA GGATTG	59°C
T97A+Y143R	T97A	agtagtagaagcaatgacCACCATCTAAAAA ACCAAATAAG	ccttgctctgtggatttctAGGTACTCCAAAG GATTG	59°C
T97A+N155H	T97A	agtagtagaagcaatgacCACCATCTAAAAA ACCAAATAAG	ccttgctctgtggattgtaAGGTACTCCAAA GGATTG	59°C
T97A+Y143R+N155H	T97A	agtagtagaagcaatgacCACCATCTAAAAA ACCAAATAAG	ccttgctctgtggatttctAGGTACTCCAAAG GATTG	59°C
E92Q+T97A+Y143R	E92Q+T97A	agtagtagaagcaatgacCACCATCTAAAAA ACCAAATAAG	ccttgctctgtggatttctAGGTACTCCAAAG GATTG	59°C
E92Q+T97A+Y143C	E92Q+T97A	agtagtagaagcaatgacCACCATCTAAAAA ACCAAATAAG	ccttgctctgtggattacaAGGTACTCCAAA GGATTG	59°C
E92Q+T97A+N155H	E92Q+T97A	agtagtagaagcaatgacCACCATCTAAAAA ACCAAATAAG	ccttgctctgtggattgtaAGGTACTCCAAA GGATTG	59°C
E92Q+T97A+Y143R +N155H	E92Q+T97A	agtagtagaagcaatgacCACCATCTAAAAA ACCAAATAAG	ccttgctctgtggatttctAGGTACTCCAAAG GATTG	59°C
insGYK GK	pROD9	aggcaaaGATCAGTTGTGGAAAGGAC	tcttgaTCTGCCTTCTCTGAAATAG	59°C
insGK	insGYK GK	GGCAAAGATCAGTTGTGG	TCTGCCTTCTCTGAAATAG	59°C
insYREGR	insGYK GK	aggcagaGATCAGTTGTGGAAAGGAC	tcttgaTCTGCCTTCTCTGAAATAG	59°C
insSREGK	insGYK GK	aggcaaaGATCAGTTGTGGAAAGGAC	tcttgaTCTGCCTTCTCTGAAATAG	59°C
insGIRGK	insGYK GK	aggcaaaGATCAGTTGTGGAAAGGAC	ctgatccTCTGCCTTCTCTGAAATAG	59°C
insGIRGK+91R	insGIRGK	AGTCATCCCacggGAATCAGGAA	TCTGCTTCTATAAATCCACTTGC	64°C
insYREGR+91R	insYREGR	AGTCATCCCacggGAATCAGGAA	TCTGCTTCTATAAATCCACTTGC	64°C
ins5Ala	pROD9	ggccgctGATCAGTTGTGGAAAGGAC	gctgcagcTCTGCCTTCTCTGAAATAG	59°C
ins2Ala	ins5Ala	GCCGCTGATCAGTTGTGG	TCTGCCTTCTCTGAAATAGACC	64°C

**TABLEAU 4 : LISTE DES AMORCES UTILISEES POUR LA MUTAGENESE DIRIGEE**

Les nucléotides en majuscule dans les amorces correspondent aux nucléotides identiques à ceux du plasmide parental, les nucléotides en minuscule aux séquences nucléotidiques comprenant les substitutions ou insertions à générer.

Des bactéries NEB 5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency) Cells ® (New England Biolabs) ont été transformées avec les plasmides mutants par choc thermique à 42°C pendant 30 secondes, refroidies sur glace pendant 5 minutes puis diluées dans 950 µL de milieu SOC

et incubées pendant 60 minutes à 37°C, sous agitation permanente à 250 rotations par minute. Cela permet une multiplication bactérienne et la production de la pénicillinase codée par le gène de résistance à l'ampicilline. Cent microlitres de cette suspension bactérienne a été étalé sur des géloses réalisées avec du milieu LB (bouillon lysogène) additionné de 100 µg/mL d'ampicilline et d'agar, permettant de sélectionner les bactéries exprimant cette pénicillinase, soit celles porteuses du plasmide pROD9. Les séquences de l'intégrase ont été vérifiées sur les colonies d'*Escherichia coli* poussant sur la gélose LB-ampicilline, avant amplification des clones bactériens dans un milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline.

Pour chaque mutant, l'ADN plasmidique a été extrait à partir de 150 mL de culture d'un clone bactérien porteur du plasmide ROD muté, avec le kit HiSpeed Midi Prep® (QIAGEN). La quantité d'ADN plasmidique extrait était mesurée à l'aide du kit QuBit dsDNA High Sensitivity Assay® (ThermoFisher).

Les virus mutés ont été produits par transfection de cellules 293T. Cette lignée était maintenue par culture dans du milieu Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) additionné de 10% de sérum de veau fœtal et d'1% de pénicilline et streptomycine (appelé milieu complet), à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Vingt-quatre heures avant la transfection, 5.10<sup>5</sup> cellules 293T étaient déposées dans chaque puits d'une plaque 6-puits, dans un volume d'1 mL de milieu complet.

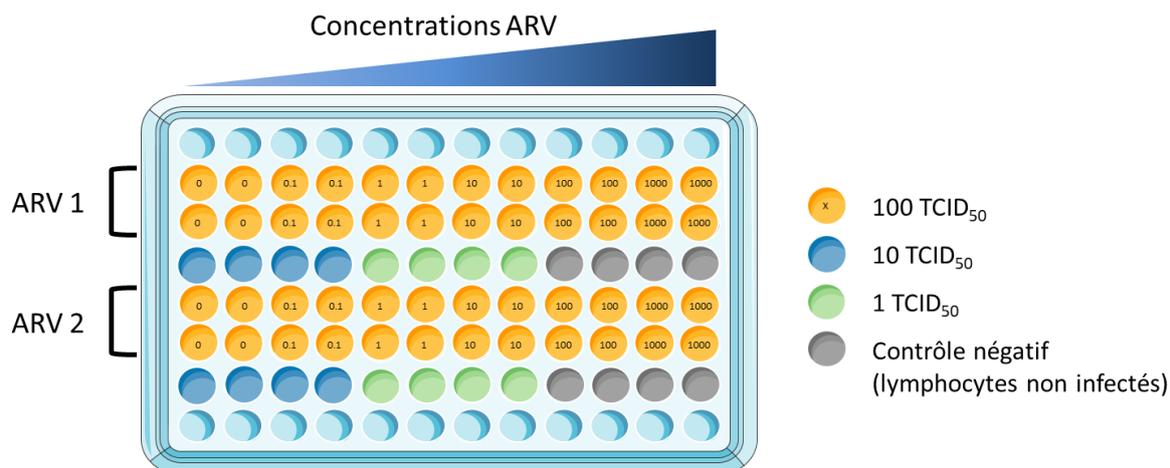
Le lendemain, si les cellules ont atteint au moins 80% de confluence, 250 µL du milieu complet était retiré de chaque puits. Un complexe ADN plasmidique/Lipofectamine 2000® était préparé, comme recommandé par le fabricant, avec 4 µg d'ADN plasmidique, du milieu de culture pauvre en protéines, Opti-MEM, et 8 µL de Lipofectamine 2000® (Roche). Les complexes ADN plasmidiques/Lipofectamine 20000® étaient alors déposés sur les cellules 293T en goutte à goutte et les cultures étaient remises à l'étuve, à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub>.

A 48 heures post-transfection, le surnageant était récupéré, centrifugé à 500g pendant 10 minutes pour séparer les cellules du surnageant, puis filtré à travers un filtre avec des pores de 0.45 µm. Les stocks viraux étaient immédiatement congelés à -80°C en plusieurs aliquotes, afin de limiter les cycles ultérieurs de congélation et décongélation qui peuvent faire chuter drastiquement les titres viraux. Une quantification du stock viral était réalisée par une mesure de la charge virale VIH-2, à l'aide du kit Generic HIV-2 Charge virale® (Biocentric, Bandol, France), après extraction automatisée des acides nucléiques totaux à l'aide du kit MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit® (Roche).

Une amplification du stock viral a été réalisée par culture pendant 5 à 7 jours avec des lymphocytes activés de donneur non infecté. Sur le surnageant de ces lymphocytes, la charge virale VIH-2 a été réalisée, ainsi que le séquençage du gène de l'intégrase pour vérifier l'absence de sélection de mutations autres que celles introduites par la mutagenèse dirigée.

Enfin, la capacité répliquative du virus a été étudiée en mesurant l'évolution de la charge virale VIH-2 à J3, J7 et J14 dans le surnageant de cultures infectées par les différents mutants VIH-2 (quantité de cellules). Pour chaque mutant, 3 infections de  $10^5$  PBMC de deux donneurs non infectés avec  $10^6$  copies de VIH-2.

La sensibilité phénotypique aux inhibiteurs d'intégrase a pu être déterminée pour les mutants ayant une répllication virale suffisante. Les phénotypes de résistance de certains de ces mutants ont été réalisés par la technique ANRS de culture sur CSMP (Brun-Vézinet et al., 1992) (Figure 26). Il a été décidé de ne tester que les 4 inhibiteurs d'intégrase suivants : RAL, DTG, CAB et BIC. En effet, l'EVG ayant une barrière génétique faible, son utilisation est très limitée chez les patients infectés par des virus résistants aux inhibiteurs d'intégrase. Nous avons testé le RAL afin de pouvoir comparer la potentielle différence d'impact des mutations sur la susceptibilité aux INSTI de 1<sup>ère</sup> et de 2<sup>e</sup> génération. De plus, du fait de résistances croisées au RAL et à l'EVG, les niveaux de résistance au RAL et à l'EVG sont très proches. Les  $CI_{50}$  obtenues ont été comparées à celles obtenues avec deux souches de référence, BRU pour le VIH-1 et ROD pour le VIH-2, deux virus dits « sauvages », c'est-à-dire non porteurs de mutations de résistance sur le gène de l'intégrase. Un index de résistance, ou « fold-change », peut alors être calculé en faisant le rapport de la  $CI_{50}$  de la souche mutée sur la  $CI_{50}$  de la souche sauvage.



**FIGURE 26 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN PHENOTYPE DE RESISTANCE DU VIH PAR LA METHODE DE L'ANRS.**

Au 3<sup>e</sup> ou au 4<sup>e</sup> jour post-infection, la charge virale est déterminée sur le surnageant des puits infectés avec 100 TCID<sub>50</sub>. La susceptibilité phénotypique est déterminée au 3<sup>e</sup> ou au 4<sup>e</sup> jour post-infection en calculant la CI<sub>50</sub>, soit la concentration d'ARV inhibant 50% de la réplication virale. Les puits infectés avec 10 et 1 TCID<sub>50</sub> permettent de valider le phénotype de résistance.

Abréviations : ARV : Antirétroviral, et TCID<sub>50</sub> : « Median Tissue Culture Infectious Dose », soit la quantité de virus telle que les cellules d'un puits sur deux seront infectés par le virus.

Enfin, les structures des intégrases de la souche ROD et des mutants 231ins ont été prédites à l'aide d'un logiciel se basant sur l'homologie des séquences protéiques, I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Roy et al., 2010; Yang et al., 2015). Ce logiciel aligne la séquence d'acides aminés de la protéine d'intérêt face à un ensemble de modèles structuraux (des protéines dont la structure a déjà été déterminée par cristallographie) puis, pour les zones où aucun alignement n'a été concluant, le logiciel réalise de la prédiction *ab initio*, en se servant des contraintes physiques à respecter lors du repliement de la protéine, notamment les liaisons hydrogène. Ce logiciel n'est pas adapté à l'étude de mutations ponctuelles mais convient pour une prédiction des changements induits par des insertions et/ou des délétions.

Trois protéines de la Protein DataBank (PDB) furent identifiées comme des modèles structuraux pour les intégrases du VIH-2 : l'intasome du MMTV (« Murine Mammary Tumor Virus »; identifiant PDB: 3JCA), l'intasome du PFV (« Prototype Foamy Virus »; identifiant PDB: 3L2R) et un fragment de deux domaines (NTD et CCD) de l'intégrase du VIH-2 en complexe avec la protéine cellulaire LEDGF (identifiant PDB: 3F9K) (Ballandras-Colas et al., 2016; Hare et al., 2009, 2010).

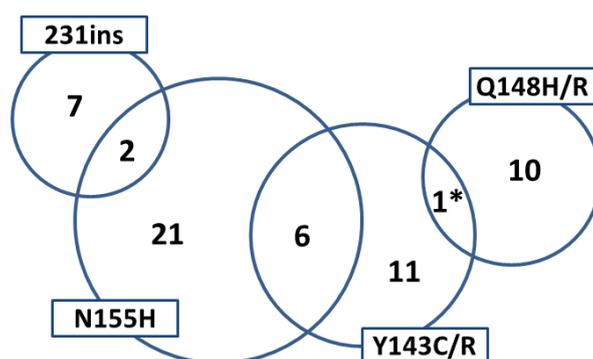
Pour chaque protéine, le modèle avec le plus haut « C-score » a été retenu et la qualité de ce modèle a été évaluée à l'aide du « TM-score », la topologie globale de la structure prédite étant considérée comme correcte si le « TM-score » est supérieur à 0,5 (Xu and Zhang, 2010). La qualité du meilleur modèle prédit était ensuite améliorée à l'aide du serveur ModRefiner (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ModRefiner/>). Enfin, la structure tridimensionnelle prédite des protéines mutées était visualisée à l'aide du logiciel PyMol (<https://pymol.org/>) et comparée à la structure prédite de l'intégrase de la souche ROD du VIH-2.

## Résultats :

### 1) Caractéristiques des patients

Les génotypes de résistance de 102 patients ont été analysés. Ces génotypes ont été réalisés sur des plasmas prélevés chez des patients en échec virologique, avec un historique de traitement par INSTI. Les virus de 57 présentaient des mutations de résistance dans le gène de l'intégrase (56%) à l'échec, 32 du groupe B, 24 du groupe A et 1 du groupe H (Tableau 5).

Les mutations de résistance aux INSTI semblent exclusives (Figure 27). Il est en effet rare de voir plus d'une des trois voies classiquement décrites de résistance aux INSTI dans un même virus, à l'exception de la coexistence des mutations aux codons 143 et 155. Ce caractère quasi-exclusif est également observé avec le nouveau profil de résistance, 231INS, à l'exception de mutations T97A+N155H chez deux patients présentant une insertion partielle de 2 et 3 acides aminés (Figure 27).



**FIGURE 27 : REPARTITION DES PROFILS DE MUTATIONS AUX INHIBITEURS D'INTEGRASE CHEZ LES PATIENTS INFECTES PAR LE VIH-2.**

*A noter que pour le patient dont l'historique cumulé de génotypes de résistance rapporte les mutations Y143G et Q148R, ces mutations n'ont pas été observées sur le même prélèvement mais à un an d'écart, suggérant l'existence de deux sous-populations virales, l'une porteuse de la mutation Y143G, l'autre de la mutation Q148R en association à la mutation G140S.*

Les gènes de la protéase, de la transcriptase inverse et de la gp105 ont pu être séquencés pour 54 (95%), 53 (93%) et 43 (75%) virus de ces 57 patients, respectivement. Ces patients étaient fréquemment porteurs de virus multi-résistants. En effet, seulement 5 virus sur 54 (9%) étaient sauvages dans le gène de la protéase, tandis que des mutations de résistance dans le gène de la RT étaient identifiées dans les 53 virus séquencés (Tableau 5). Trente-trois virus possédaient une mutation K65R et 43 présentaient la mutation M184V, dont 24 en association avec la K65R (24/53 ; 45%), ce qui rend ces virus doublement mutés résistants à l'ensemble des INTI, en dehors de la zidovudine. Parmi les 51 virus pour lesquels les 3 gènes (protéase, transcriptase inverse et intégrase) ont pu être séquencés, 47 (92%) présentaient des mutations de résistance dans les 3 gènes.

En ce qui concerne le tropisme, 34 virus étaient identifiés comme des virus de tropisme X4 et 9 de tropisme R5, d'après la séquence de la boucle V3 de la gp105.

	INSTI	IP	INTI	Tropisme	Groupe
Mutations au codon 143	97A-143A	50V-54M-84V-90M	65R-69S-111I-184V	X4	A
	97A-143C/G	47A-82F	111I-184V	NA	H
	97A-143C/R	50V-54M	65R-111I	ND	B
	97A-143G/C	47A-50V	65R-67N-111I-184V	X4	A
	97A-143R	47A-84V-90M	184V	X4	A
	97A-143R	50V-54M	65R-111I-184V	R5	B
	92Q-97A-143C	54M-84V	65R-69S-111I-184V-215T	X4	B
	92Q-97A-143C	54M-84V	65R-67N-215Y	X4	B
	92Q-97A-143C/R	50V	65R-111I	NA	B
	97A-143C/G-155S	47A-50V-82F-90M	65R-67N-111I-115F-151M-184V	R5	A
97A-143R-155S	50V	184V	X4	B	
Mutations au codon 155	155H	NA	NA	ND	A
	155H	54M-84V	111I-184V	R5	B
	155H	82F-84V-90M	184V-215F	R5	A
	155H	54M-82F-90M	65R-67N-70R-111I-151M-184V	X4	A
	92Q-97A-155S	50V	65R-184V	X4	A
	92Q-155H	47A-54M-82F-90M-99F	65R-111I-151M-184V	X4	A
	97A-155H	50V	184V	ND	B
	97A-155H	47A-84V-90M	65R-111I-184V	X4	A
	97A-155H	47A-50V	NA	X4	B
	92Q-97A-155H	47A-50V-54M-82F	65R-184V	R5	A
	92Q-97A-155H	47A-84V-99F	M184V	R5	A
	92Q-97A-155H	WT	65R-69S-184V	X4	A
	92Q-97A-155H	54M-90M	184V-215Y	X4	B
	92Q-97A-155H	54M-84V	111I-184V	X4	B
	92Q-97A-155H	NA	65R-69S-115F-184V	X4	B
	92Q-97A-155H	47A-54M	NA	NA	B
	92Q-97A-155H	47A	65R-184V	ND	B
	92Q-97A-155H	54M-82F-90M	65R-70R-111I-151M-184V	X4	A
	92Q-97A-155H	50V-90M	65R-111I-184V	X4	B
	92Q-97A-155H	NA	65R-111I-184V	X4	A
Mutations aux codons 143 et 155	92Q-143C-155H	47A-50V-54M-84V-90M	65R-115F-69S-70R-184V	X4	B
	92Q-143C-155H	54M-84V-90M	115F-184V-215Y	R5	A
	92Q-97A-143C-155H	50V-54M	65R-111I-184V	X4	B
	92Q-97A-143R-155H	50V-84V	65R-69S-184V	X4	B
	92Q-97A-143R-155H	47A-50V-90M	65R-151M-184V	X4	B
	92Q-97A-143R-155H	47A-50V-84V-90M	70N-111I-184V-215F	X4	B
Mutations au codon 148	97A-140S-148H	50V-84V	184V	X4	B
	140A-148K	WT	111I-184V	ND	A
	140S-148H	NA	184V	NA	A
	140S-148H	50V-54M	65R-111I-151M	X4	A
	140S-148H/K/R	54M-82F-90M	65R-69S-111I-151M	ND	A
	140S-148H/R	47A-54M-82F-84V-90M	65R-69S-111I-184V	X4	A
	140S-148H/R	50V-90M	65R-184V	NA	A
	140S-148K/R	50V	65R-111I-151M-184V	X4	B
	140S-148R	WT	65R-215S	X4	B
	148K	WT	65R	ND	B
Autres associations	92Q-97A-140S-143C/G-148R	47A	65R-184V	X4	B
	97A-155H-231INS <sup>1</sup>	WT	NA	ND	B
	97A-155H-231INS <sup>2</sup>	47A-90M	65R-69S-111I	X4	B
Insertions après le codon 231	231INS <sup>3</sup>	50V	184V-215Y	X4	B
	231INS <sup>3</sup>	50V	65R	X4	B
	231INS <sup>3</sup>	50V-54M	215L-215F	NA	B
	231INS <sup>3</sup>	50V-54M-84V	184V-215Y	R5	B
	231INS <sup>1</sup>	54M-82F-84V-90M	67N-70N-184V-215Y	X4	A
	231INS <sup>3</sup>	50V-54M	184V-215F	R5	A
	231INS <sup>3</sup>	47A-50V-90M	70N-111I-184V	X4	B

**TABLEAU 5 : PROFILS DE RESISTANCE DES 57 PATIENTS INFECTES PAR LE VIH-2, PORTEURS DE MUTATIONS DE RESISTANCE DANS LE GENE DE L'INTEGRASE.**

<sup>1</sup> : insertion de deux acides aminés ; <sup>2</sup> : insertion de trois acides aminés, <sup>3</sup> : insertion de cinq acides aminés

Abréviations : INSTI : inhibiteur de transfert de brin de l'intégrase ; INTI : inhibiteur nucléotidique de la transcriptase inverse ; IP : inhibiteur de protéase ; NA : non amplifiable ; ND : « not done » (non réalisé) ; R5 : tropisme CCR5 ; WT : « wild-type » (gène sauvage, c'est-à-dire absence de mutation de résistance connue) et X4 : tropisme CXCR4.

## 2) Choix des mutants VIH-2

Nous avons confronté les profils génotypiques de résistance observés dans notre cohorte à ceux déjà étudiés dans la littérature et nous avons donc décidé de construire une base de mutants permettant de compléter les données existantes sur la sensibilité aux inhibiteurs d'intégrase. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur les profils de mutations présents dans notre base de données, non explorés dans l'étude de Smith et al., 2019, soit :

- Mutations au codon 143 : T97A+Y143R, E92Q+T97A+Y143C et E92Q+T97A+Y143R.
- Mutations au codon 155, associées ou non à une mutation au codon 143 : N155H, T97A+N155H, E92Q+T97A+N155H, T97A+Y143R+N155H et E92Q+T97A+Y143R+N155H, ainsi que les mutants T97A et E92Q+T97A pour interpréter l'effet de l'addition de la substitution N155H sur ces deux mutants.
- Insertions au codon 231 : les motifs observés *in vivo* (insGK, insGIRGK, insGYKGGK, insSREGK, insYREGR), ainsi que trois insertions servant de contrôle pour les expériences ultérieures (insCYRGK, ins2A et ins5A). De plus, la substitution Q91R a été rajouté sur deux mutants : insYREGR et insGIRGK.

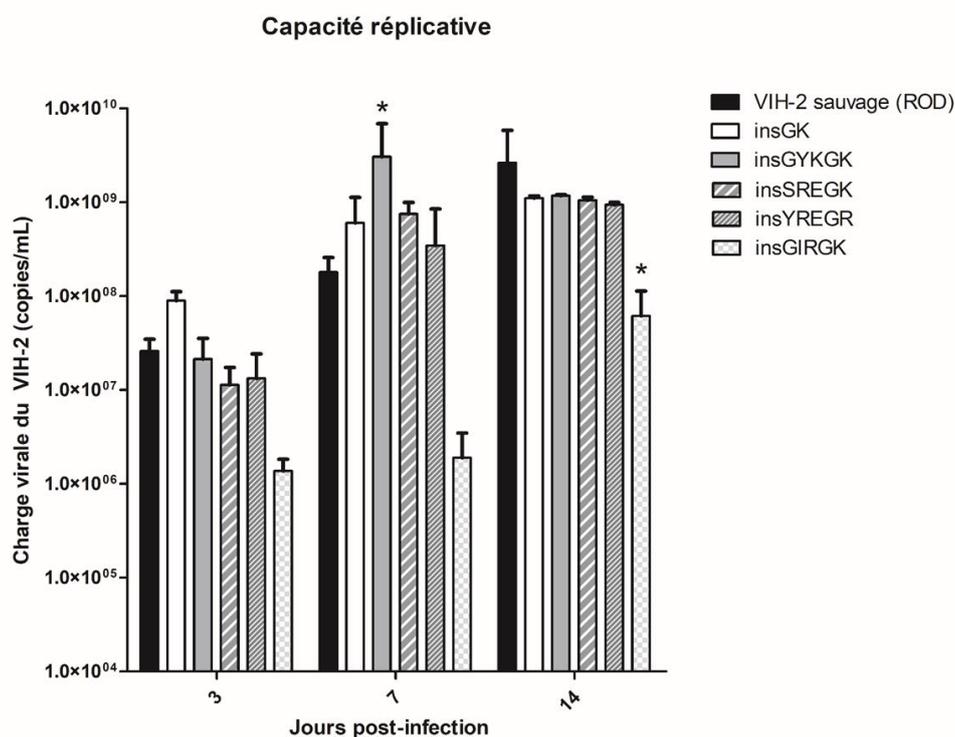
Nous avons choisi de ne pas générer de mutants aux codons Q148 et G140 car ces mutants sont déjà bien décrits dans la littérature, ces doubles mutants présentant une résistance de haut niveau à tous les INSTI. Les patients infectés par des virus porteurs de mutations au codon 148 (associées ou non à des mutations au codon 140) ne sont donc pas de bons candidats pour des traitements de sauvetage comprenant des inhibiteurs d'intégrase, même en passant à une prise biquotidienne.

Tous ces mutants ont pu être construits et la présence des mutations introduites a été vérifiée par séquençage des virus obtenus par transfection des cellules 293T. Nous avons également obtenu sur une colonie un mutant non attendu, une insertion CYRGK, que nous avons inclus aux mutants à tester, pour étudier l'impact de modifications des acides aminés dans l'insertion.

### 3) Capacité réplivative

Il a été observé que les virus porteurs d'une mutation 143C/R étaient faiblement réplivatifs, empêchant la réalisation de phénotypes de résistance, du fait de leur faible infectivité et/ou de leur capacité réplivative réduite (données non montrées).

L'étude de la capacité réplivative des virus porteurs de 231INS n'a pas mis en évidence de moindre réplivation de ces virus ; à l'exception du mutant insGIRGK dont le titre viral était plus faible que celui du virus ROD sauvage à J14 (Figure 28). Le virus insGYKGGK était, lui, plus réplivatif que le virus ROD sauvage à J7 mais cette différence n'était pas retrouvée à J14.

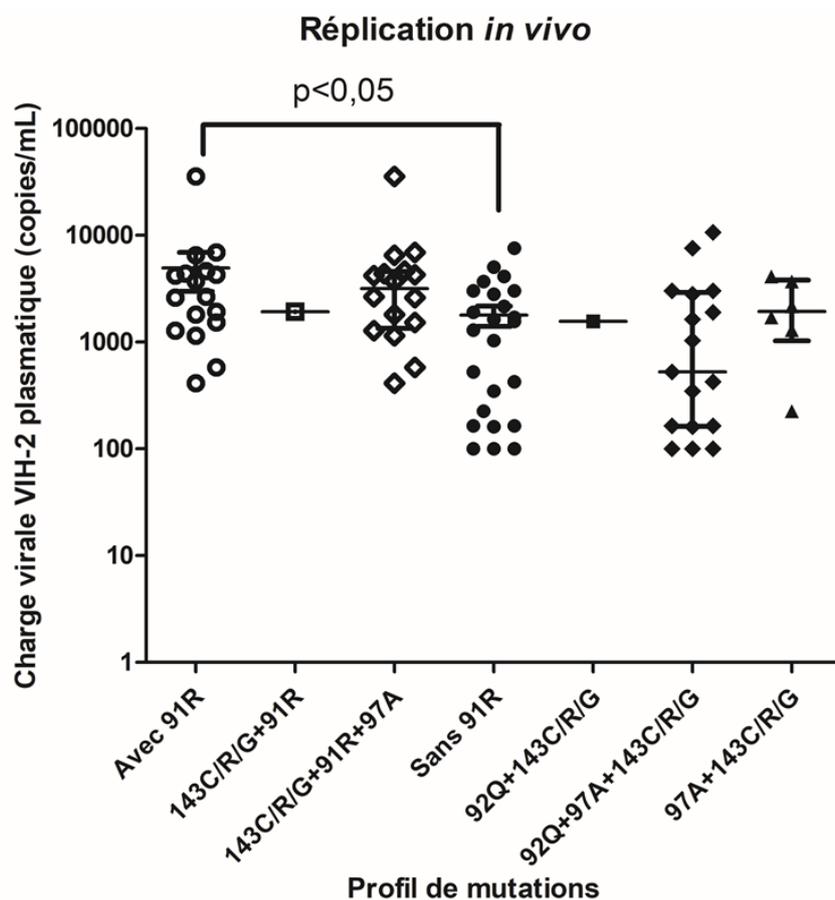


**FIGURE 28 : CAPACITE REPLICATIVE DES VIH-2 PORTEURS DE MUTATIONS 231INS.**

La capacité réplivative a été déterminée à J3, J7 et J14 sur des surnageants de lymphocytes de donneur infecté. Les médianes et déviations standards représentées ci-dessus correspondent aux résultats de 3 infections différentes. La différence de

réplication par rapport au virus sauvage a été déterminée par un test ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Tukey, les différences significatives ( $p < 0,05$ ) sont signalées avec un astérisque.

Pour restaurer la capacité répliquative des mutants comportant la substitution Y143C/R ou porteurs des insertions insGIRGK et insYREGR, il a été décidé de rajouter la mutation Q91R dans l'intégrase, par analogie avec ce qui a été réalisé par l'équipe de Smith qui avait également observé une très faible répliquative des mutants Y143C/R, empêchant la réalisation de phénotypes de résistance (Smith et al., 2019). Cette mutation 91R a été observée *in vivo* chez certains patients et semble être associée, chez les patients de la cohorte ANRS CO5 VIH-2, à des charges virales plasmatiques légèrement plus élevées ( $p=0,015$ ) (Figure 29). L'impact exact de cette mutation sur la sensibilité aux inhibiteurs d'intégrase et sur la répliquative virale reste à déterminer, via l'étude du simple mutant Q91R.



**FIGURE 29 : CHARGE VIRALE VIH-2 PLASMATIQUE DES PATIENTS SELON LA PRESENCE OU NON DE LA MUTATION Q91R DANS L'INTEGRASE**

## 4) Phénotypes de résistance aux inhibiteurs d'intégrase

Des phénotypes de résistance ont pu être réalisés sur les virus avec une réplication virale suffisante, soit les mutants avec une insertion après le codon 231, et les mutants dits « classiques » (T97A, E92Q+T97A, N155H, T97A+N155H, E92Q+T97A+N155H).

Le bictégravir reste notamment actif sur les mutants T97A, E92Q+T97A, N155H, T97A+N155H, E92Q+T97A+N155H, avec  $CI_{50}$  entre 0,8 et 4,2 nM (Tableau 6). La présence d'une mutation N155H n'impactait pas la sensibilité au DTG mais l'addition de la mutation T97A, en association ou non avec l'E92Q, le rendait résistant. Concernant les insertions, l'insertion de 2 acides aminés, GK, restait sensible au BIC et au DTG, alors que les  $CI_{50}$  au RAL et au CAB étaient fortement augmentés, d'un facteur 72 et 21, respectivement. Pour les insertions de 5 acides aminés, le virus était résistant au RAL et au CAB mais également au DTG, sauf pour le profil d'insertion SREGK qui était intermédiaire pour le DTG. La sensibilité au bictégravir était variable selon les profils (Tableau 6).

Souche	$CI_{50}$ (en nM) [FC]			
	Bictégravir	Cabotégravir	Dolutégravir	Raltégravir
<b>BRU (VIH-1)</b>	1,6	0,6	1,0	3,0
<b>ROD</b>	3,0	3,3	2,9	2,4
<b>T97A</b>	4,2 (1,4)	6,6 (2)	3,3 (1,1)	2 (0,8)
<b>E92Q+T97A</b>	2,0 (0,7)	248 (75)	NR	NR
<b>T97A+N155H</b>	0,9 (0,3)	51 (15)	64 (22)	48 (20)
<b>E92Q+T97A+N155H</b>	0,8 (0,3)	29 (8,8)	33 (11)	15 (6,3)
<b>N155H</b>	1,7 (0,6)	42 (13)	1.11 (0,4)	24 (10)
<b>insGK</b>	3,5 (1,2)	68 (21)	4.5 (1,6)	172 (72)
<b>insGYKGGK</b>	118 (39)	139 (42)	78 (27)	NR
<b>insSREGK</b>	25 (8,3)	70 (21)	14 (4,8)	39 (16)
<b>insCYRGGK</b>	8,6 (2,9)	224 (68)	85 (29)	120 (50)

**TABLEAU 6 :  $CI_{50}$  DES VIRUS MUTANTS CONSTRUITS PAR MUTAGENESE DIRIGEE**

Une résistance à l'INSTI testé est définie par un index de résistance supérieur à 3, c'est-à-dire une augmentation d'un facteur supérieur à 3 de la  $CI_{50}$  du mutant par rapport à la  $CI_{50}$  du virus sauvage ROD. Les cases sont colorées en fonction de l'index de résistance (sauvage : FC < 3, intermédiaire : FC entre 3 et 10 ; résistant : FC > 10).

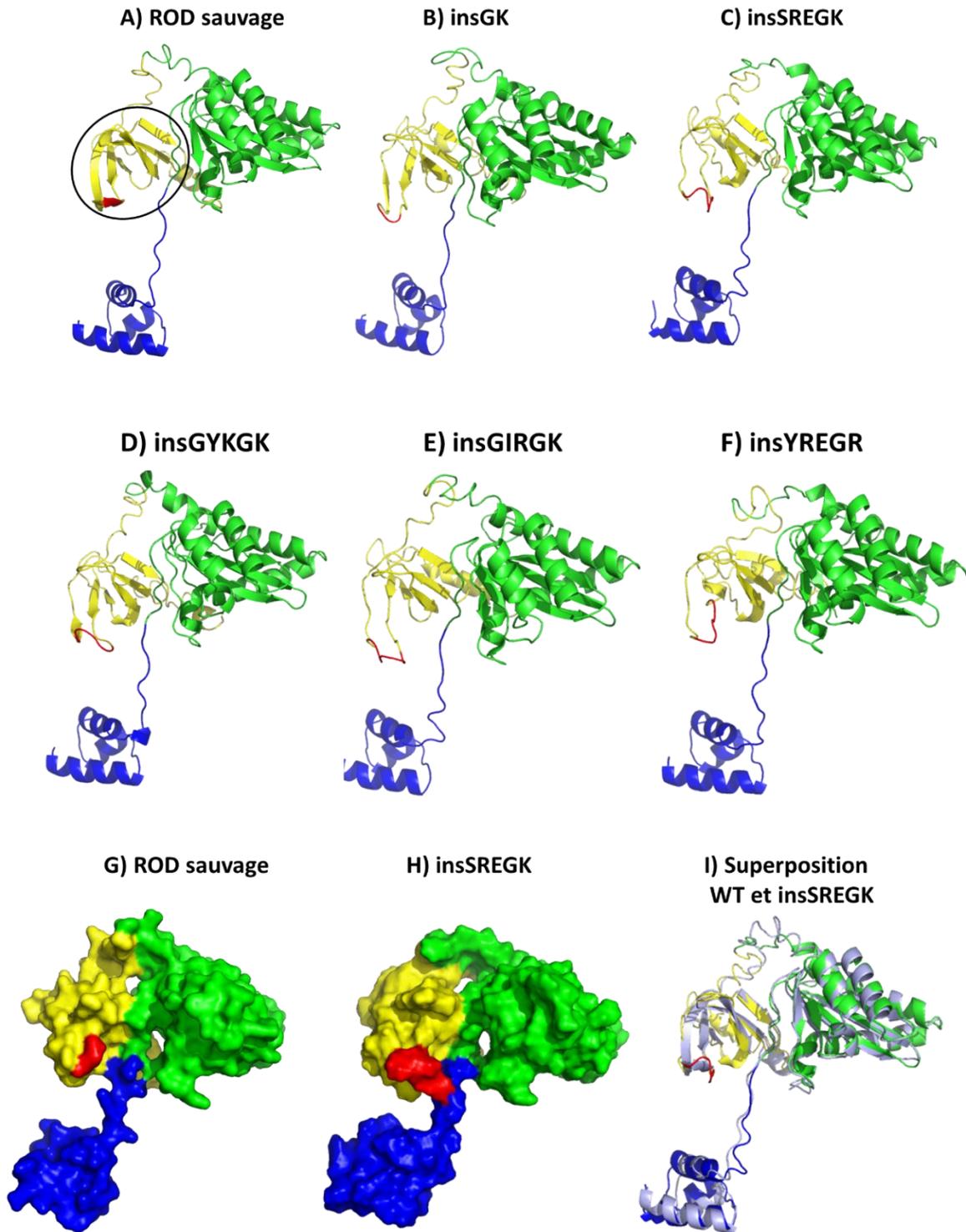
Abréviations : FC : « fold-change » ou index de résistance ; NR : non réalisé

## 5) Modélisation des protéines mutées

Les structures prédites de l'intégrase sauvage de ROD et des intégrases porteuses de la mutation 231ins ont été comparées visuellement. Pour les domaines NTD et CCD, les structures étaient similaires entre la protéine sauvage et les protéines mutants

Le repliement du domaine C-terminal de l'intégrase des VIH est celui d'un domaine SH3, c'est-à-dire un tonneau bêta composé de 5 à 6 brins bêta anti-parallèles. La structure prédite pour l'intégrase de ROD est bien celle d'un tonneau bêta avec 5 brin bêta anti-parallèles (Figure 30-A).

Ce tonneau bêta est toujours présent dans la structure prédite pour l'intégrase avec une insertion de 2 acides aminés, insGK (Figure 30-B) mais, lorsque 5 acides aminés sont insérés après le codon 231, le tonneau bêta n'est plus observé, les acides aminés de la région 225-241 ne se repliant plus en feuillet bêta comme dans la protéine sauvage (Figure 30-C, D, E et F). Dans les structures prédites pour les intégrases avec une insertion de 5 acides aminés, cette insertion semble former une protubérance, à la surface de la protéine (Figure 30-G, H et I).



**FIGURE 30 : STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES PREDITES DES INTEGRASES DU VIH-2**

Les structures prédites des intégrases du VIH-2 par le logiciel I-TASSER ont été représentées en mode « cartoon » (A à F) et en mode « surface » (G et H). Une superposition des structures de l'intégrase sauvage (en gris) et de l'intégrase porteuse de l'insertion SREGK a également été réalisée (I). Dans toutes les images, les régions colorées en bleu, vert et jaune correspondent au domaine N-terminal, au cœur catalytique et au domaine C-terminal de l'intégrase. La région colorée en rouge correspond au codon arginine en position 231 pour l'intégrase sauvage et aux différentes insertions pour les autres images. La zone entourée dans l'image A) correspond au tonneau bêta composé de 2 feuillets bêta.

## Conclusion :

Un grand nombre de patients infectés par des virus multi-résistants a été identifié au sein de la cohorte française. Ceci est préoccupant car les options thérapeutiques sont limitées pour traiter les infections par le VIH-2, d'autant plus en cas de résistances aux antirétroviraux.

Cette observation d'un grand nombre de virus multi-résistants n'est pas isolée. Une étude récente a rapporté la prévalence des mutations de résistances aux INSTI chez les PVVIH-2 en Espagne (Requena et al., 2019). La répartition des mutations dans leur cohorte est similaire à celle observée dans la cohorte française, avec 12 virus sur 15 porteurs de mutations de résistance dans l'intégrase : N155H (n=5), Q148H/R (n=3), Y143C/G (n=3) et R263K (n=1). Ces 12 virus étaient, en plus, porteurs de mutations de résistance aux IP et aux INTI dans 10 et 11 cas, respectivement. De plus, en réinterprétant leurs séquences, ils ont identifié un virus porteur de l'insertion 231ins chez un patient ayant répliqué sous RAL et sous DTG.

Ce profil, initialement décrit par notre équipe chez 6 patients, a également été identifié chez des macaques infectés par le SIVmac251, un virus proche du VIH-2, et traités par monothérapie de dolutégravir (Van Rompay et al., 2018). Dans notre cohorte, nous avons identifié quatre nouveaux patients dont les virus étaient porteurs de la mutation 231ins, avec des insertions de longueurs différentes : 2 (n=3) et 3 (n=1) acides aminés. Depuis la fin de cette étude rétrospective, un nouveau patient avec un virus porteur d'une insertion de 5 acides aminés a été identifié.

Ces résultats préliminaires nous ont permis d'observer que ces insertions après le codon 231 n'impactaient pas négativement la réplication virale, en dehors du profil GIRGK, contrairement aux mutations N155H, Y143C/R ou Q148H (Smith et al., 2012). La capacité répliquative des mutants avec la substitution Q91R reste à déterminer. Si cette mutation permet de restaurer tout ou partie de la capacité répliquative du virus, il serait intéressant de la rajouter sur nos mutants Y143C/R qui ont une capacité répliquative très réduite.

Les premiers résultats des phénotypes de résistance sont cohérents avec ce qui a été observé précédemment sur des isolats cliniques pour les mutants 231ins et sur des virus mutants générés par mutagenèse dirigée pour les autres mutants (Le Hingrat et al., 2018b; Smith et al., 2018, 2019). Ainsi, la mutation N155H n'impacte la sensibilité au DTG que si elle est associée à la T97A et/ou à la E92Q.

Il est intéressant de noter que, peu importe le motif de l'insertion de 5 acides aminés, le virus est totalement résistant au CAB et au RAL, et un niveau de résistance intermédiaire ou élevée pour le DTG. De nouveau, la sensibilité au BIC dépendait du motif de l'insertion. Le virus porteur de l'insertion SREGK présentait une résistance intermédiaire au BIC et au DTG (augmentation des  $CI_{50}$  d'un facteur 5 et 8, respectivement), comme cela avait été déterminé sur les isolats cliniques porteurs de cette insertion (Le Hingrat et al., 2018b).

Le virus porteur de l'insertion de deux acides aminés, GK, présentait un profil de résistance intermédiaire. Il était résistant au RAL et au CAB, mais conservait sa susceptibilité au BIC et au DTG. Chez un patient, l'insertion de deux acides aminés a précédé l'acquisition de l'insertion complète de 5 acides aminés. Il semble important d'identifier rapidement les patients dont le virus présente une insertion de deux acides aminés. En effet, si l'insertion est détectée alors qu'elle n'est encore que partielle (deux acides aminés), un changement d'INSTI pourrait permettre de contrôler la réplication virale et d'empêcher la sélection de l'insertion de 5 acides aminés, et l'augmentation du niveau de résistance induite par cette plus grande insertion.

Afin d'identifier si le type de résidus présents dans l'insertion est important pour la diminution de la sensibilité aux INSTI, mais également pour la capacité répliquative et l'activité enzymatique de l'enzyme, nous avons construit deux mutants supplémentaires : ins2Ala et ins5Ala, des virus dérivés de ROD porteurs d'une insertion après le codon 231 composée de 2 et 5 alanines, respectivement. Ces deux virus mutés restent à étudier.

L'insertion de 5 acides aminés semble modifier la structure de la protéine, avec la perte de l'un des deux feuillets bêta et la présence de l'insertion à la surface de l'intégrase dans les différentes structures prédites pour nos mutants 231ins. Il a été décrit que le codon 231, l'un des 3 codons du motif RKK, pouvait participer à la fixation de l'ADN de la cellule hôte (Lataillade et al., 2007; Roquebert et al., 2008). Cette modification structurale suggère que les insertions doivent modifier l'activité de l'intégrase, comme observé dans le VIH-1 avec le mutant R231A (Lutzke and Plasterk, 1998).

Une étude plus fine de l'impact de ces mutations sur l'activité enzymatique de la protéine est indispensable. Pour cela, une collaboration est en cours avec l'équipe du Dr O. Delelis à l'ENS Cachan afin de déterminer les activités de 3' processing et de transfert de brin de ces intégrases mutées.

## 4. Quatrième article

**Impact des mutations dans la région Long Terminal Repeat  
du VIH-2 sur l'activité transcriptionnelle  
(article soumis)**

**Genetic variability of HIV-2 Long Terminal Repeat region  
between HIV-2 groups impacts transcriptional activity**

Quentin Le Hingrat, Benoit Visseaux, Mélanie Bertine, Lise Chauveau, Olivier Schwartz,  
Fidéline Collin, Florence Damond, Sophie Matheron, Diane Descamps  
and Charlotte Charpentier, on behalf the ANRS HIV-2 CO5 Cohort

### **Contexte :**

L'importance de la région LTR et de sa variabilité dans la transcription de l'ADN du VIH a été régulièrement décrite. Des différences notables dans les séquences des LTR des sous-types du VIH-1 sont observées, ainsi le nombre de sites de fixation de NFκB varie de 1 à 3 selon les sous-types du VIH-1 (Krebs et al., 2001). Des différences ont également été observées dans les LTR des virus d'un même patient, selon le prélèvement à partir duquel le virus a été isolé (liquide céphalo-rachidien, plasma, etc.) (Ross et al., 2001).

Plusieurs études sur le LTR du VIH-2 ont été menées mais il s'agissait toujours de travaux réalisés sur les LTR de VIH-2 du groupe A, le groupe prédominant à l'échelle mondiale (Arya and Mohr, 1994; Markovitz et al., 1992). En France, l'épidémie du VIH-2 est davantage partagée entre les groupes A et B, du fait notamment des échanges démographiques avec la Côte d'Ivoire, pays où la majorité des infections par le VIH-2 sont dues au groupe B et au sous-type A2 du groupe A.

Les dernières études publiées ont montré que le niveau de réservoir cellulaire du VIH-2 était légèrement inférieur à celui du VIH-1 chez les patients naïfs d'ARV (Bertine et al., 2015). Une équipe a récemment observé une association entre la variabilité nucléotidique du LTR du VIH-1 et le niveau du réservoir cellulaire (Alteri et al., 2015), tandis qu'une autre équipe a démontré que des variations nucléotidiques mineures dans les sites de fixation de Sp1 peuvent entraîner de fortes modifications de l'activité transcriptionnelle (Qu et al., 2016).

## **Objectif :**

Nous avons souhaité mesurer la diversité de la région LTR chez les PVVIH-2, dans les provirus de patients naïfs d'antirétroviraux.

De plus, nous avons voulu déterminer si la variabilité observée dans cette région LTR était associée à des différences dans la taille du réservoir viral de ces patients et/ou à des différences dans l'activité transcriptionnelle de ces LTR.

## **Matériel et méthodes :**

Les régions LTR des provirus ont été séquencées à partir des CSMP de patients d'ARV inclus dans la cohorte ANRS CO5 VIH-2. La variabilité génétique de ces séquences a été évaluée à l'aide du logiciel MEGA7, en calculant la distance génétique moyenne (Kumar et al., 2016). La présence de sites de fixation de facteurs de transcription a été vérifiée à l'aide de 2 logiciels, MatInspector® (Genomatix, Allemagne) et PROMO (Cartharius et al., 2005; Farré et al., 2003).

En parallèle, l'ADN total du VIH-2 a été quantifié sur les mêmes CSMP. Les mesures des lymphocytes T CD4+ et les charges virales plasmatiques des patients étaient également disponibles.

L'activité transcriptionnelle de 5 LTR a été déterminée grâce à des plasmides exprimant le gène de la luciférase, sous le contrôle de ces LTR. Le niveau de transcription virale a été déterminée sur deux lignées cellulaires : HEK293T et Jurkat clone 20. Différentes conditions ont été testées : plasmide LTR-Luc seul (correspondant à l'activité transcriptionnelle basale), plasmide LTR-Luc co-transfecté avec plasmide codant pour la protéine virale Tat du VIH-2 et/ou activation des cellules par de la PMA, permettant de mesurer le niveau de transactivation induit par Tat et par l'activation cellulaire, respectivement.

## **Résultats :**

Les régions LTR de 66 patients ont pu être séquencées. La distribution des groupes viraux était la suivante : 27 virus du groupe A (41%), 38 du groupe B (58%) et un recombinant A/B (1%). La distance génétique moyenne au sein de la région LTR était plus faible pour les séquences du groupe A (13,2%) que pour celles du groupe B (15,0% ;  $p=0,02$ ). La variabilité de la région LTR était principalement due à des variations dans la sous-région U3 (18,6% de

distance génétique, contre 5,1% pour la sous-région R+U5 ;  $p < 1.10^{-4}$ ), et plus particulièrement dans une sous-région de U3 appelée « régulatrice » qui comprend les sites de fixation des FT cellulaires (nucléotides 374 à 508 de la souche ROD). Enfin, sept séquences provirales (9%) étaient hypermutées par APOBEC, 3 du groupe A (11%) et 4 du groupe B (11%).

Le réservoir viral dans les CSMP a été quantifié par une PCR de l'ADN total du VIH-2. Seulement 24 patients présentaient un réservoir au-dessus de la limite de quantification, avec une médiane de  $2,04 \log_{10}$  copies/ $10^6$  CSMP (36%), tandis que 40 patients présentaient un réservoir détectable et non quantifiable (61%). Pour les deux derniers patients, le réservoir n'était pas détectable, de manière répétée. Le réservoir viral était plus fréquemment quantifiable pour les patients infectés par un virus du groupe A que chez ceux infectés par un virus du groupe B (67% versus 16%,  $p < 0,001$ ). Parmi les patients avec un réservoir quantifiable, la taille du réservoir était plus élevée pour les patients infectés par un virus du groupe A que pour ceux infectés par un virus du groupe B ( $2,11$  et  $1,75 \log_{10}$  copies/ $10^6$  CSMP, respectivement ;  $p = 0,03$ ).

Enfin, nous avons observé que la perte du site de fixation Sp1.I entraînait une diminution de moitié du niveau basal de transcription dans les cellules Jurkat, tandis que dans les cellules HEK293T, une diminution de moitié était observée dans la réponse à la transactivation par la protéine virale Tat. Dans les cellules Jurkat, nous avons observé une moindre activité transcriptionnelle après activation cellulaire par PMA pour tous les LTR du groupe B. Cela est dû à la perte du site de fixation de pets, comme mis en évidence par la diminution d'un facteur 10 du niveau de transcription après activation cellulaire après substitution du site de fixation de pets dans une séquence du groupe A par la séquence tronquée du groupe B.

### **Conclusion :**

A travers cette première étude des séquences LTR d'un grand nombre de patients naïfs d'ARV, incluant des virus des deux groupes épidémiques, nous avons mis en évidence une forte variabilité de la région LTR. La variabilité est plus importante parmi les virus du groupe B, notamment du fait de nombreuses insertions et délétions. De plus, ces virus du groupe B présentent tous une délétion de plusieurs nucléotides au niveau de la sous-région PuB1-pets, causant la perte du site de fixation pets. Quatre provirus du groupe B présentaient également une délétion du premier site de fixation de Sp1, un FT ubiquitaire.

En utilisant un modèle de transfection de plasmide exprimant le gène de la luciférase sous le contrôle de la région LTR, nous avons pu mettre en évidence l'impact de ces variations dans les séquences LTR sur le niveau de transcription virale. Ainsi, la substitution de la région PuB1-pets du VIH-2 de groupe A par la séquence plus courte correspondante du groupe B entraînait une moindre réponse à l'activation cellulaire par PMA. Cela est cohérent avec une précédente étude qui observait une activation de la transcription virale 3 fois plus faible, après stimulation par PHA et PMA, pour les plasmides exprimant la chloramphénicol acétyltransférase sous le contrôle d'un LTR présentant une délétion d'un des sites de fixation de FT (PuB1, pets, PuB2 ou NF $\kappa$ B) (Hannibal et al., 1994). Cette importance du site pets dans la réponse à la transactivation cellulaire a également été rapportée dans d'autres études (Markovitz et al., 1992). Cette observation est renforcée par le fait que cette diminution de la réponse à l'activation cellulaire est retrouvée à un niveau similaire pour le plasmide comprenant le LTR du recombinant A/B, isolé d'un patient, et ayant également une délétion du site de fixation pets.

La perte du premier site de fixation de Sp1 impacte moins l'activité transcriptionnelle des LTR. Dans les cellules HEK293T, cela réduit le niveau de transactivation par la protéine virale Tat, tandis que dans les cellules Jurkat clone 20, le niveau de réponse à la transactivation par Tat n'est pas modifié mais l'activité transcriptionnelle basale est diminuée de moitié. Des précédents travaux ont montré que Sp1 jouait un rôle dans le niveau basal de transcription virale mais également que la présence de 3 sites intacts de fixation de Sp1 était nécessaire pour une transactivation efficace du LTR par Tat (Pagtakhan and Tong-Starksen, 1997).

En parallèle, le réservoir proviral a été quantifié dans les CSMP de ces patients. La proportion de patients avec un réservoir viral quantifiable était plus faible chez ceux infectés par un virus du groupe B. Malgré l'identification de nombreuses insertions et délétions, aucune n'était associée à une différence dans le niveau du réservoir cellulaire. Cela peut s'expliquer par deux phénomènes : 1) la majorité de ces insertions et délétions n'était retrouvée que chez un seul patient, limitant la puissance statistique de nos analyses, et 2) le niveau faible du réservoir proviral chez de nombreux patients.

La réponse limitée des LTR du groupe B à l'activation cellulaire pourrait expliquer la taille limitée des réservoirs viraux chez les patients infectés par les virus de ce groupe. En effet, une plus faible transcription virale après activation cellulaire pourrait entraîner une moindre production de virus et donc pourrait limiter l'infection de nouvelles cellules et l'expansion du réservoir.

Bien que des différences dans le niveau de réservoir viral et dans l'activité transcriptionnelle aient été observées, les patients infectés par des virus du groupe B ne diffèrent pas de ceux infectés par des virus du groupe A, tant au niveau de leur charge virale plasmatique que de leur taux de cellules CD4. Il est possible que l'activité transcriptionnelle plus faible des VIH-2 du groupe B après activation cellulaire soit compensée par une autre protéine virale ou une autre région génomique, ou bien que l'impact de cette activité transcriptionnelle diminuée ne soit visible que sur le long terme. L'effet de ces mutations dans le LTR sur l'activité transcriptionnelle devra être confirmé sur des modèles cellulaires, avec tentatives de réactivation de provirus mutés.

1 **Genetic variability of Long Terminal Repeat region**  
2 **between HIV-2 groups impacts transcriptional**  
3 **activity**

4 Quentin Le Hingrat<sup>a,b#</sup>, Benoit Visseaux<sup>a,b</sup>, Mélanie Bertine<sup>a,b</sup>, Lise Chauveau<sup>c</sup>, Olivier  
5 Schwartz<sup>c</sup>, Fidéline Collin<sup>d</sup>, Florence Damond<sup>a,b</sup>, Sophie Matheron<sup>a,e</sup>, Diane Descamps<sup>a,b</sup>,  
6 Charlotte Charpentier<sup>a,b</sup>, on behalf the ANRS HIV-2 CO5 Cohort

7 a IAME, UMR 1137, INSERM, Université Paris Diderot, Paris, France

8 b Laboratoire de virologie, Hôpital Bichat, AP-HP, Paris, France

9 c Unité Virus et Immunité, Institut Pasteur, Paris, France

10 d ISPED, UMR 897, INSERM, Université Bordeaux, Epidémiologie-Biostatistique, Bordeaux,  
11 France

12 e Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Bichat, AP-HP, Paris, France

13

14 # Corresponding author: Quentin Le Hingrat; E-mail adress: [quentin.lehingrat@aphp.fr](mailto:quentin.lehingrat@aphp.fr)

15 Chauveau Lise is now in a post-doctoral situation in Radcliffe Department of Medicine,  
16 University of Oxford, Oxford, United Kingdom.

17

18 Main text word count: 4,975

19

**Abstract**

20 HIV-2 Long Terminal Repeat (LTR) region contains several transcription factors (TF) binding  
21 sites. Efficient LTR transactivation by cellular TF and viral proteins is crucial for HIV-2  
22 reactivation and viral production. Proviral LTR sequences of 66 antiretroviral-naïve HIV-2-  
23 infected patients included in the French ANRS HIV-2 CO5 cohort were sequenced. A high  
24 genetic variability within HIV-2 LTR was observed, particularly in the U3 sub-region, the sub-  
25 region encompassing most known TF binding sites. Genetic variability was significantly  
26 higher in HIV-2 group B than in group A viruses. Notably, all group B viruses lacked the pets  
27 binding site and 4 group B sequences (11 %) also presented a complete deletion of the first  
28 Sp1 binding site. The lack of a pets binding site was responsible for a lowered transcriptional  
29 activity in activated T lymphocytes, while deletion of the first Sp1 binding site lowered basal  
30 or Tat-mediated transcriptional activities, depending on the cell line. Interestingly, HIV-2  
31 cellular reservoir was less frequently quantifiable in patients infected by group B viruses and,  
32 when quantifiable, reservoirs were significantly smaller than in patients infected by group A  
33 viruses. Our findings suggest that mutations observed *in vivo* in HIV-2 LTR sequences are  
34 associated with differences in transcriptional activity and may explain the low viral reservoir  
35 in patients infected by HIV-2 group B viruses, providing a new insight into the reduced  
36 pathogenicity of HIV-2 infection.

37

38 Abstract word count: 222

2

39

### **Importance**

40 Over 1 million patients are infected with HIV-2, which is often described as an attenuated  
41 retroviral infection. Patients have frequently undetectable viremia and evolve at a slower  
42 rate towards AIDS than HIV-1-infected patients. Several studies have reported a smaller viral  
43 reservoir in Peripheral Blood Mononuclear Cells in HIV-2-infected patients, compared to HIV-  
44 1-infected patients, while others have found similar size of reservoirs but a reduced number  
45 of cell-associated RNA, suggesting that there might be a block in HIV-2 transcription. Recent  
46 studies have found associations between mutations within HIV-1 LTR and reduced  
47 transcriptional activities. Until now, mutations within the HIV-2 LTR region have scarcely  
48 been studied. We conduct this research to identify if such mutations exist in HIV-2 LTR, and  
49 their potential association with viral reservoir and transcriptional activity. Our study  
50 indicates that transcription of HIV-2 group B proviruses may be impaired, which might  
51 explain the low viral reservoir observed in patients.

52

53 Importance section word count: 150

54

## Introduction

55 AIDS epidemic is due to two different lentiviruses: Human Immunodeficiency Virus type 1  
56 (HIV-1) and HIV-2 (1, 2). HIV-1 is responsible for more than 99% of all HIV infections. HIV-2  
57 infections are mainly encountered in West African countries and in countries with historical  
58 and economic links with those countries, notably Portugal and France (3, 4). HIV-1 and HIV-2  
59 genomes differ at nucleotide level by 40 to 60% according to the genomic region (5). HIV-2 is  
60 often considered as an attenuated model of HIV infection. Indeed, patients infected with  
61 HIV-2 progress more slowly toward AIDS (6, 7, 7) and present a slower decline of CD4 cell  
62 count (8). HIV-2 plasma viral loads (VL) are frequently undetectable in the absence of  
63 antiretroviral treatment (9, 10) and transmission rates are lower than for HIV-1, either by  
64 sexual (11) or maternal transmission (12).

65 HIV-2 is divided into 9 groups but only groups A and B have spread (4, 13). Over 90% of  
66 world-wide HIV-2 infections are caused by group A viruses, while group B viruses account for  
67 less than 10% of HIV-2 infections (14). HIV-2 groups A and B differ by their geographical  
68 distributions, group A has spread from Guinea-Bissau to other West African countries, while  
69 group B is mainly localized in Ivory Coast, Ghana and Burkina Faso (3, 14).

70 Previous studies have assessed HIV-2 DNA reservoir in Peripheral Blood Mononuclear Cells  
71 (PBMC) in Western African countries and reported similar size of cellular reservoirs to HIV-1  
72 but lower level of cell-associated RNA (8, 15–17). High HIV-2 DNA levels correlated strongly  
73 with high HIV-2 RNA levels and low CD4 cell count (8, 15, 16). Lower cellular HIV-2 reservoirs  
74 were described in other studies, that included patients with undetectable HIV-2 plasma VL  
75 and higher CD4 cell count (9, 18).

76 The Long Terminal Repeat (LTR) region plays a major role in HIV-2 transcription and  
77 reactivation. LTR is subdivided in 3 regions: U3, R and U5. LTR transcriptional activity is

4

78 enhanced by different cellular transcription factors (TFs), including Elf-1, Sp1 and NFκB (19–  
79 21), and by the viral protein Tat (22). A limited sub-region of the LTR, herein named  
80 “regulatory” sub-region, encompasses all known cellular TF binding sites (23, 24). Four  
81 binding sites are crucial for LTR transactivation in response to cellular activation: a NFκB  
82 binding site, two purine-rich binding sites, PuB1 and Pub2, that binds proteins of the *ETS*  
83 family like Elf-1, and a peri-*ETS* (pets) binding site located between PuB1 and PuB2 (25, 26).  
84 The expression level of some TFs is modulated by the cellular activation status, such as  
85 upregulation of Elf-1 in activated T cells (26). The three Sp1 binding sites have been linked to  
86 the basal activity of the LTR promoter and to the response to transactivation by Tat (27).  
87 The early LTR transactivation leads to the production of multi-spliced viral RNAs which are  
88 exported from the nucleus and translated into regulatory proteins, including Tat which is  
89 imported in the nucleus where it binds to TAR, the Tat-Activated Region, and exponentially  
90 increases LTR transactivation (28). Proviral DNA transcription then switches to a production  
91 of unspliced and incompletely spliced viral RNAs, enabling viral production (29).  
92 HIV-2 LTR genetic diversity, especially on TFs binding sites, may alter its ability to be  
93 efficiently activated by cellular TFs and/or by Tat (30, 31). This could also impact the  
94 reactivation of HIV-2 reservoir, as shown with HIV-1 (31). Until now, only two studies have  
95 been conducted on HIV-2 LTRs and both focused on group A viruses (21, 24). This is  
96 explained by the low number of group B infections worldwide. However, in the French HIV-2  
97 ANRS CO5 cohort, group B infections are more frequent, representing around 30% of HIV-2-  
98 infected individuals (32). Furthermore, in our cohort, first data on HIV-2 DNA level showed  
99 that patients exhibited smaller HIV-2 cellular reservoirs (33, 34) than in previous studies (8,  
100 15, 16). We wondered if HIV-2 cellular reservoir could be linked to LTR transcriptional  
101 activity and if genetic diversity within LTR had an impact on its transcriptional activity.

102 The aim of this study was to assess genetic diversity within HIV-2 LTR, as well as  
103 transcriptional activity of HIV-2 LTR, and their potential association with the size of HIV-2  
104 cellular reservoir in a population of antiretroviral-naïve HIV-2-infected patients.

105

## Results

### 106 Patients' characteristics

107 LTR region has been sequenced in 66 patients out of 102 with available PBMC (65%).  
108 Phylogenetic analysis showed the following distribution among HIV-2 groups: 27 A (41%), 38  
109 B (58%), and one recombinant A/B (1%) (Fig 1-A). Among group A, 19 sequences belonged to  
110 subtype A1 and 8 to subtype A2. We combined subtypes A1 and A2 viruses in our analyses,  
111 as their respective numbers were too small. The recombinant A/B clustered with group B  
112 sequences for nucleotides 120 to 320, and with group A sequences for the rest of its LTR.  
113 Patients infected by HIV-2 group A and B viruses did not differ in their clinical, biological and  
114 immunological characteristics, as depicted in Table 1. Only nine patients (14%) had a RNA  
115 plasma VL above 40 copies/mL (c/mL), 4 were infected with a group A virus (median=68  
116 c/mL), 4 with a group B virus (median=78 c/mL) and 1 with the recombinant virus (VL=829  
117 c/mL) (Table 1).

118

### 119 Analysis of LTR genetic variability

120 Mean LTR genetic distance was significantly lower in group A sequences (13.2%) than in  
121 group B sequences (15.0%;  $p=0.02$ ; Fig 1-B). Taken altogether, HIV-2 groups A and B  
122 sequences showed a significantly higher mean genetic distance in the U3 sub-region than in  
123 the R+U5 sub-region (18.6% versus 5.1%;  $p<1.10^{-4}$ ). We also compared variability in 2 specific  
124 sub-regions of U3, nucleotides 19 to 373 (corresponding to the beginning of U3) and  
125 nucleotides 374 to 508, the latter being the "regulatory" sub-region (Fig 2-A and B).  
126 Interestingly, HIV-2 group B viruses exhibited an increased genetic variability in this  
127 "regulatory" sub-region (19.0% versus 10.5% in group A;  $p<1.10^{-4}$ ; Fig 1-B).

7

128 Seven sequences (9%) were found to be APOBEC-induced hypermutated, equally distributed  
129 between the two viral groups (3 viruses belonging to group A (11%) and 4 to group B (11%))  
130 (Fig 1-A).

131

### 132 **Assessment of HIV-2 total DNA**

133 Overall, HIV-2 total DNA was above the LOQ in only 24 patients (36%), with a median of 2.04  
134  $\log_{10} c/10^6$  PBMC (IQR=1.81-2.15; Fig 3). HIV-2 total DNA was detectable under the LOQ in 40  
135 patients (61%) and undetectable for the remaining 2 patients (3%). The proportion of  
136 patients with quantifiable reservoir was significantly higher in patients infected with HIV-2  
137 group A than with group B (67% and 16%, respectively;  $p < 0.001$ ) (Table 1). Among patients  
138 with a quantifiable cellular reservoir, HIV-2 total DNA levels were significantly higher in  
139 group A infected patients than in group B (2.11  $\log_{10} c/10^6$  PBMC (IQR=1.94-2.16) versus 1.75  
140  $\log_{10} c/10^6$  PBMC (IQR=1.68-1.81);  $p=0.03$ ) (Fig 3-A).

141 When patients were stratified regarding CD4 cell count, patients with CD4 cells below  
142  $500/\text{mm}^3$  had more frequently a quantifiable cellular reservoir than those with CD4 cells  
143 above  $500/\text{mm}^3$  (54% versus 32%; Fig 3-B and C), although the difference was not  
144 statistically significant ( $p=0.20$ ). Nevertheless, when patients with a CD4 cell count below  
145  $500/\text{mm}^3$  had a quantifiable reservoir, it was significantly larger than for patients with a CD4  
146 cell count above  $500/\text{mm}^3$  (2.17  $\log_{10} c/10^6$  PBMC (IQR=2.11-2.44) versus 1.94  $\log_{10} c/10^6$   
147 PBMC (IQR=1.78-2.12);  $p=0.02$ ; Fig 3-C).

	All HIV-2 (n=66)	Group A HIV-2 (n=27)	Group B HIV-2 (n=38)	p-value	HIV-2 A/B recombinant (n=1)
Age (years), median (IQR)	51 (47-55)	53 (47-56)	50 (46-54)	0.19	47
Women, n (%)	45 (68%)	17 (63%)	28 (74%)	0.42	0 (0%)
West African origin, n (%)	60 (91%)	23 (85%)	36 (95%)	0.22	1 (100%)
Heterosexual transmission, n (%)	57 (86%)	24 (89%)	32 (84%)	0.72	1 (100%)
Time since HIV diagnosis (years), median (IQR) (n=56)	12 (8-17)	11 (5-17)	12 (9-17)	0.50	NA
CDC clinical stage A, n (%)	65 (98%)	27 (100%)	37 (97%)	1	1 (100%)
CD4 cell count/mm <sup>3</sup> , median (IQR)	754 (540-882)	662 (485-892)	791 (581-878)	0.34	797
Patients with plasma VL > 40 c/mL, n (%)	9 (14%)	4 (15%)	4 (11%)	0.71	1 (100%)
Median plasma VL (IQR) in patients with quantifiable viremia, c/mL	80 (74-124)	68 (52-92)	78 (69-92)	0.71	829
Patients with quantifiable HIV-2 total DNA, n (%)	24 (36%)	18 (67%)	6 (16%)	<1.10 <sup>-4</sup>	0 (0%)
Median cellular reservoir size (IQR) in patients with quantifiable HIV-2 total DNA, log <sub>10</sub> c/10 <sup>6</sup> PBMC	2.04 (1.81-2.15)	2.11 (1.94-2.16)	1.75 (1.68-1.81)	0.03	NA
Patients with detectable but unquantifiable HIV-2 total DNA, n (%)	40 (61%)	8 (30%)	31 (81%)	<1.10 <sup>-4</sup>	1 (100%)
Patients with undetectable HIV-2 total DNA, n (%)	2 (3%)	1 (3%)	1 (3%)	1	0 (0%)

148

149 **Table 1: Demographic, immunological and biological characteristics of HIV-2-infected patients included in this study.**

150 p-values of comparisons of groups A and B were calculated with Fisher's exact tests or Mann-Whitney tests.

151 (With IQR: InterQuartile Range; NA: Not applicable; PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells and VL: Viral Load).

9

152 **Association between mutations in LTR sequences and HIV-2 total DNA level**

153 Mutations within the LTR were frequently observed, especially in the “regulatory” sub-  
154 region of group B viruses. Sequences and *in silico* analyses revealed that PuB2, peri-κB, Sp1  
155 and TATAA box binding sites were conserved (Fig 1-A). Interestingly, a short deletion in the  
156 region encompassing PuB1 and pets binding sites was observed in all group B LTR sequences  
157 (Fig 2). Those sequences conserved the core motif of PuB1 binding site (AGGAA), and *in silico*  
158 analyses confirmed that PuB1 binding site was still present. However, the deletion caused  
159 the loss of the pets binding site (Fig 2). All group B viruses also presented an insertion  
160 between PuB2 and peri-κB binding sites (Fig 2). Its significance could not be determined  
161 through *in silico* analyses.

162 Fifteen group B viruses out of 38 (39%) presented another insertion or deletion in TF binding  
163 sites: insertion in PuB1 (n=7), in pets (n=2) or deletion of the first Sp1 binding site (n=4) (Fig  
164 2). These mutations were uncommon among group A viruses (2/27; 7%).

165 Almost all mutations in LTR sequences were only observed in one proviral sequence, and no  
166 statistical association was found between certain mutations and HIV-2 cellular reservoir  
167 level. The only mutation that was repeatedly observed is the complete deletion of the first  
168 Sp1 binding site (Sp1.I) in 4 group B viruses (n=4/38; 11%) (Fig 2). Although the four patients  
169 presented low reservoirs (1 with  $1.67 \log_{10} c/10^6$  PBMC, 2 with an HIV-2 DNA below the LOQ  
170 and 1 with undetectable HIV-2 DNA), the difference was not statistically significant.

**171 Transcriptional activities of HIV-2 LTR**

172 We compared transcriptional activities, using plasmids derived from two HIV-2 strains,  
173 « ROD » and « EHO », the references for groups A and B, respectively. Different plasmids  
174 were constructed: (i) ROD-LTR plasmid, (ii) EHO-LTR, (iii)  $\Delta$ Sp1-LTR, corresponding to the LTR  
175 of « EHO » lacking Sp1.I binding site and (iv) Rec-LTR, which corresponds to the A/B  
176 recombinant LTR identified (Fig 4). We also constructed VAR-LTR, a chimeric LTR composed  
177 of « ROD » LTR, except for the PuB1/pets sub-region which was replaced by the shorter  
178 corresponding sequence of « EHO » LTR lacking pets binding site(Fig 4-A).

179 Plasmids were transfected in HEK293T cells to assess basal transcriptional activity of those  
180 promoters. Basal transcriptional activities of EHO-LTR and  $\Delta$ Sp1-LTR were halved compared  
181 to ROD-LTR ( $p=0.02$ , for both), whereas Rec-LTR was 2-fold higher than ROD-LTR ( $p<0.001$ )  
182 (Fig 4-B). Co-transfection with increasing amounts of HIV-2 Tat plasmid (pTat) showed a  
183 dose-response effect of LTR transactivation by Tat (Fig 4-B). When co-transfected with a high  
184 dose of Tat-encoding plasmid (5 ng), transcriptional activity of  $\Delta$ Sp1-LTR remained 2-fold  
185 lower than that of ROD-LTR and EHO-LTR ( $p=0.02$ ). Under the same conditions,  
186 transcriptional activities of EHO-LTR and Rec-LTR were not significantly different from ROD-  
187 LTR (Fig 4-B).

188 Transient transfection experiments were also performed on Jurkat cells to assess both basal  
189 transcriptional activity and transcriptional activity after cellular activation and/or Tat  
190 transactivation. Basal transcriptional activity of  $\Delta$ Sp1-LTR was 2-fold lower than ROD-LTR  
191 ( $p<0.01$ ), while, EHO-LTR, Rec-LTR and VAR-LTR had similar basal transcriptional activities  
192 than ROD-LTR ( $p=1, 0.79$  and  $0.43$ , respectively) (Fig 4-C). LTR transcriptional activity in  
193 Jurkat cells was also positively correlated to the quantity of pTat transfected (data not  
194 shown). Co-transfection with 5 ng of pTat transactivated all LTRs by 3 to 10-fold (Fig 4-C).

195 Fold-increases of transcriptional activities after Tat transactivation were similar to those  
196 observed in HEK293T cells for all plasmids (Fig 4-B and C). As observed in HEK293T cells,  
197  $\Delta$ Sp1-LTR exhibited the lowest Tat-mediated transcriptional activity, but the difference was  
198 not significant in Jurkat cells.

199 After cellular activation by phorbol myristate acetate (PMA), transcriptional activities were  
200 enhanced for all LTRs, and ROD-LTR exhibited a significantly higher activity than all other  
201 LTRs: 10-fold higher than  $\Delta$ Sp1-LTR and 4 to 5-fold more than EHO-LTR, Rec-LTR and VAR-LTR  
202 ( $p < 0.001$ ; Fig 4-C). No significant difference in the response to cellular activation was  
203 observed between EHO-LTR,  $\Delta$ Sp1-LTR, Rec-LTR and VAR-LTR.

204 Transcriptional activities were also determined in Jurkat cells co-transfected with pTat, and  
205 then activated by PMA (Fig 4-C). Under these conditions, transcriptional activity of ROD-LTR  
206 was multiplied by a factor 97 and that of Rec-LTR by a factor 49 ( $p = 0.14$ ), while  
207 transcriptional activities of EHO-LTR,  $\Delta$ Sp1-LTR and VAR-LTR were only enhanced by a factor  
208 23 to 30 (Fig 4-C).

209

## Discussion

210 This is the first analysis of a large number of HIV-2 LTR proviral sequences, obtained from  
211 antiretroviral-naïve (ARV-naïve) patients and including viruses belonging to both HIV-2  
212 epidemic groups. Until now, all studies investigated only LTR HIV-2 group A (19, 21, 24). We  
213 observed that HIV-2 group B LTR displayed a higher variability and a lower response to  
214 cellular activation.

215 In our study, distribution between groups A and B differs from what was previously observed  
216 in France (32). In 2001, 30% of patients were infected with HIV-2 group B in 2001, compared  
217 to 58% in the present study. However, this increase in the prevalence of group B viruses is  
218 consistent with other phylogenetic studies carried out in the French ANRS HIV-2 CO5 cohort  
219 and with the birthplace of enrolled patients (35). Most of them were born in West African  
220 countries known to have a high prevalence of HIV-2 group B infections (i.e. Mali, Ivory Coast)  
221 (4).

222 In our study, only a small proportion of patients (36%) had a quantifiable HIV-2 total DNA  
223 level. This differs from previous studies (33, 36) but populations were distinct in terms of: (i)  
224 CD4 cell count, (ii) percentage of patients with a detectable plasma VL, (iii) therapeutic  
225 status, thus hampering comparisons. Damond et al. reported that 79% of patients had a  
226 detectable HIV-2 total DNA level but patients were at more advanced stages of the disease:  
227 55% of them had plasma VL above 100 c/mL (versus only 4.5% in our study) and 86% of them  
228 had CD4 level under 500/mm<sup>3</sup> (versus 20% in our study) (36). Furthermore, half of them  
229 received antiretroviral therapy (36). Similarly, Bertine and al. reported that 88% of patients  
230 had quantifiable reservoirs but they were mainly infected with group A viruses (61% versus  
231 41%), had frequently a plasma VL above 100 c/mL (26% versus 4.5%) and a lower CD4 cell  
232 count (median of 521 versus 754/mm<sup>3</sup>) (33). Interestingly, in our study, the proportion of

13

233 quantifiable cellular reservoirs varied between both groups: 67% of HIV-2 group-A infected  
234 patients versus 16% of HIV-2 group B-infected patients. As in previous studies (15, 34, 36),  
235 an inverse association between HIV-2 total DNA level and CD4 cell count was found, when  
236 stratifying patients according to their CD4 cell count: below or above 500 CD4/mm<sup>3</sup>.

237 Regarding HIV-2 LTR variability, we reported a high variability in the “regulatory” sub-region  
238 encompassing most of the known TFs binding sites, as it has been described in HIV-1 (37).  
239 Our study provides insights on group-specific differences in HIV-2 LTR. LTR genetic variability  
240 was greater in group B than in group A viruses, partly due to the numerous short deletions  
241 and insertions in group B sequences.

242 Variability among HIV-2 group A LTR sequences was previously reported (38). Berry et al.  
243 showed that some patients infected by HIV-2 group A viruses harbored deletions or  
244 insertions in proviral DNA sequences, and that the PuB1-pets sub-region may serve to  
245 discriminate between HIV-2 groups A and B sequences but did not investigate the  
246 consequence of this inter-group difference (38). We observed that PuB2, peri-κB, NFκB and  
247 Sp1 binding sites were conserved among LTR sequences with few group-specific variations,  
248 as described in different HIV-1 subtypes (30, 39). PuB1 binding site was still identified by *in*  
249 *silico* analyses, while pets binding site was not present in any group B sequences.

250 One frequent mutation profile was observed, the complete deletion of the first binding site  
251 of Sp1 in 11% of group B sequences, but it was not significantly linked to a change in the  
252 cellular reservoir level. Other insertions/deletions were observed within the LTR region,  
253 especially in the “regulatory” sub-region, but they were unique, thus we could have lacked  
254 the statistical power to prove their impact on the level of the cellular reservoir.

255 To determine the impact of genetic variability in specific HIV-2 LTR sub-regions on  
256 transcriptional activity, we characterized the *in vitro* transcriptional activity of five LTRs of  
257 interest, in HEK293T and Jurkat cells. HEK293T cells were transfected to assess basal  
258 transcriptional activity and response to Tat transactivation, while Jurkat cell enabled to  
259 determine the impact of cellular activation on LTR transcriptional activity.

260 At basal level, in Jurkat cells,  $\Delta$ Sp1-LTR expressed a transcriptional activity reduced by half  
261 compared to EHO-LTR. Previous works have suggested that the widely-expressed  
262 transcription factor Sp1 may be responsible for the basal transcriptional activity of HIV LTRs  
263 (40–42). Our findings in Jurkat cells are consistent with this hypothesis, as the loss of one  
264 Sp1 binding site impacts basal transcriptional activity. However, in HEK293T cells, EHO-LTR  
265 and  $\Delta$ Sp1-LTR exhibited a similar basal transcriptional activity. This may be explained by  
266 differences in the level of expression of Sp1 or in other cellular TFs between those two cell  
267 lines. When transactivated by pTat, all LTRs displayed similar levels of transcriptional  
268 activities, except  $\Delta$ Sp1-LTR which was 2-fold lower than ROD-LTR, in both HEK293T and  
269 Jurkat cells. However, the difference was significant only in HEK293T cells. In this cell line,  
270  $\Delta$ Sp1-LTR was also significantly less transactivated than EHO-LTR when cells were co-  
271 transfected by a high dose of pTat. These results are in favor of a limited impact of the loss  
272 of the first Sp1 binding site on the intensity of Tat-mediated LTR transactivation. This is  
273 consistent with the mechanism of LTR transactivation by Tat. It has been previously shown  
274 that, in addition to binding to TAR (28), Tat requires the presence of 3 intact Sp1 binding  
275 sites to efficiently transactivate HIV-2 LTR (27).

276 When activation of Jurkat cells was induced by PMA, which activates T cells by its action on  
277 protein kinase C, transcriptional activities of all LTR were increased but at diverse levels.

278 Cellular transactivation was higher for ROD-LTR than for all others LTR. As the sole difference

279 between ROD-LTR and VAR-LTR is the substitution of the PuB1/pets sub-region, this points  
280 out to the role of this sub-region, and notably the loss of the pets binding site, in the  
281 decreased response to cellular activation of group B LTR in activated Jurkat cells. This is  
282 consistent with previous studies that reported that activated T cells, including Jurkat cells,  
283 expressed the Elf-1 protein, the only cellular TF known to bind to PuB1, PuB2 and pets (26,  
284 43). Moreover, it has been reported that the deletion of a single binding site, among PuB1,  
285 PuB2, pets or NFκB, is sufficient to severely impair the response to cellular activation (19).  
286 The recombinant A/B also lacked the pets binding site and it also exhibited a reduced  
287 response to cellular activation.

288 PMA and Tat exert an additive effect on the transactivation of LTR in Jurkat cells.  
289 Transcriptional activities of the five promoters were increased by 20 to 100-fold when  
290 activated by both PMA and Tat. However, co-transfection with pTat was not sufficient to  
291 overcome the difference observed between group A and group B LTRs after cellular  
292 activation. This limited response of group B LTRs to cellular activation may block or limit the  
293 switch from an early phase to a productive phase of infection (29, 44). This may partly  
294 explain the smaller size of HIV-2 cellular reservoir observed in patients infected by HIV-2  
295 group B in our study, as lower transactivation could lead to lower number of newly infected  
296 cells and thus limit the expansion of the cellular reservoir.

297 Differences in LTR responses to activation have also been described for HIV-1 subtypes, such  
298 as an increased response to cellular activation of B' and C subtypes compared to the  
299 recombinant form CRF01\_AE (30, 31). Qu and colleagues reported that subtype-specific  
300 genetic diversity in the sub-region encompassing TFs binding sites in HIV-1 LTR  
301 (nucleotides -138 to 0) can have a large impact on their transcriptional activities (31).

302 This study presents some limitations. LTR transcriptional activities were determined in two  
303 different cellular models, HEK293T and Jurkat cells, but not in primary cells that may express  
304 TFs at different levels (25, 45). Although differences were observed on transcriptional  
305 activity between HIV-2 group A and B viruses, patients differed solely by their proviral load.  
306 Plasma VL and CD4 cell count were similar for both groups. Whether the lower  
307 transcriptional activity of HIV-2 group B is compensated by another viral protein or the  
308 impact on patients can only be observed with long-term follow-up remains to be  
309 determined.

310 We observed 3 main differences between HIV-2 group A and B viruses: i) a greater diversity  
311 within the “regulatory” sub-region in group B sequences, ii) a smaller cellular reservoir in  
312 patients infected with HIV-2 group B viruses and iii) a reduced PMA-activated transcriptional  
313 activity of group B LTR. Furthermore, deletion of one of the binding sites of Sp1 observed in  
314 11% of group B sequences impaired either basal or Tat-mediated transcriptional activities,  
315 depending on the cell line. Sequences analyses and transfection experiments highlighted the  
316 importance of Sp1 binding sites in the response of the HIV-2 group A LTR to cellular  
317 activation.

318 To our knowledge, this is the first study to reveal notable differences in LTR transactivation  
319 between HIV-2 group A and group B viruses. Our results suggest that reactivation of latent  
320 proviruses may be impaired in patients infected with an HIV-2 group B virus, lacking the Sp1  
321 binding site and/or harboring a deletion of the first Sp1 binding site. These results should be  
322 verified by further *in vitro* experiments, especially reaction of LTR-mutated HIV-2 proviruses.

323

## Methods

### 324 Patients

325 All antiretroviral-naïve patients included in the French ANRS HIV-2 CO5 cohort, for whom  
326 whole blood samples were obtained between January 2015 and February 2016, were  
327 included in this study. Plasma and PBMC were collected using Ficoll Lymphocyte Separation  
328 Medium® (Eurobio, Courtaboeuf, France) and stored at -80°C until DNA extraction.

329

### 330 HIV-2 LTR sequencing

331 DNA was extracted from PBMC using QIA Symphony SP® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden,  
332 Germany), according to the manufacturer's instructions. The 3' HIV-2 LTR region was  
333 amplified in a two-step Polymerase Chain Reaction (PCR). PCR primers used were the  
334 following: 3LTR-F1 (5'-GGGCTATAGGCCWGTWTTCTCYTCCC-3', T<sub>m</sub>=68.8°C), 3LTR-R1 (5'-  
335 AAGGGTCCTAACAGACCAGG-3', T<sub>m</sub>=59.4°C), 3LTR-F2 (5'-GGGGACTGGAAGGGMTGTWTTAYA-  
336 3', T<sub>m</sub>=62.7°C), 3LTR-R2 (5'-GACCAGGCGGCGACTAGG-3', T<sub>m</sub>=62,8°C). 3LTR-F1 primer was  
337 first described by Machuca et al. (46). The nested-PCR product encompassed almost the  
338 whole LTR region (nucleotides 9499 to 10275 of the reference strain BEN, accession number  
339 on GenBank: M30502), only lacking the last 60 nucleotides of U5, that are highly conserved  
340 in HIV-2. First-round PCR was performed with 10 µl of extracted DNA and 40 µl of a mix  
341 composed of 5 µl of buffer, 5 µl of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µl of a mix of desoxynucleotide tri-phosphate  
342 (dNTPs) at 2.5mM, 2 µl of 3LTR-F1 and 4 µl of 3LTR-R1 primers at 10 µM, 0.25 µl of Taq Gold  
343 polymerase® (ThermoFisher, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 24 µl of DNase-  
344 free water. The following PCR program was used: 12 minutes at 94°C, then 40 amplification  
345 cycles (94°C for 30 seconds, 50°C for 30 seconds and 72°C for 2 minutes), and finally 72°C for  
346 7 minutes. Nested-PCR was performed on 5 µl of first-round PCR products diluted into 5 µl of

18

347 DNase-free water and added to the same mix as described before, except 2 µl of 3LTR-F2  
348 and 4 µl of 3LTR-R2 primers at 10 µM replaced 3LTR-F1 and 3LTR-R1 primers. The same  
349 amplification program was used, except hybridation temperature was set to 55°C. Nested  
350 PCR products were analyzed with a capillary electrophoresis automat, Caliper Labchip GX®  
351 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), to verify amplification. Sequencing reactions were run  
352 using ABI Prism Big Dye Terminator kit®, with the 3LTR-F2 and 3LTR-R2 primers, on an  
353 automated sequencer (ABI Prism 3130 XL, Applied Biosystems). LTR sequences were  
354 analyzed using Geneious® v9.0 (Brisbane, Australia), and aligned using both ClustalW® and  
355 manual editing.

356

#### 357 **HIV-2 total DNA quantification**

358 Real-time PCR of the human albumin gene (47) was performed on total DNA extracted from  
359 PBMC, to determine the number of cells per sample, as previously described (44).  
360 Quantification of total HIV-2 DNA was performed using an in-house real time PCR assay with  
361 a threshold of 6 copies per PCR. Samples with a signal below this LOQ were defined as  
362 detectable. HIV-2 total DNA in PBMC was expressed in copies of HIV-2 DNA/10<sup>6</sup> PBMC. This  
363 assay was developed by the ANRS AC11 Quantification Group (pending patent  
364 n°FR1753969).

365

#### 366 **HIV-2 RNA quantification**

367 One mL of supernatant was extracted using MagNAPure with the LC Total Nucleic Acid  
368 Isolation Kit (Roche). HIV-2 RNA plasma VL was determined using Biocentric HIV-2 RNA® kit  
369 (Biocentric, Bandol, France), with a limit of quantification of 40 c/mL (48).

370

371 **Bio-informatic analysis**

372 *Phylogeny and recombination*

373 Recombination within the LTR region was checked using RDP4<sup>®</sup> vBeta 4.97 software (49).  
374 The recombinant A/B identified by RDP4<sup>®</sup> was excluded from further phylogenetic analyses,  
375 as recommended (50). Using 3 reference strains (A.SN.85.ROD.M15390, or « ROD », and  
376 A.DE.x.BEN.M30502, or « BEN », for subtypes A1 and A2 respectively, and  
377 B.Cl.x.EHO.U27200, or « EHO », for group B) and all LTR sequences, a consensus  
378 phylogenetic tree was built by maximum of likelihood method using the PhyML<sup>®</sup> software  
379 v3.1, under a General Time Reversible Model and a Gamma parameter at 4 (51). Robustness  
380 of the tree was assessed by bootstrapping with 1000 replicates. The tree was edited with  
381 FigTree<sup>®</sup> v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

382

383 *Genetic distances calculations*

384 Paired genetic distances were calculated using HyPhy<sup>®</sup> v2.2.4 (52), by computing the pair-  
385 wise distance between each LTR sequence and their group reference (« ROD » for HIV-2  
386 group A and « EHO » for HIV-2 group B). Genetic distances were expressed in percentage of  
387 substitutions per nucleotide. Sequences corresponding to primers were deleted from LTR  
388 sequences in order not to misrepresent genetic variability.

389

390 *Hypermutation analysis*

391 Hypermutation was assessed with the Hypermut2.0<sup>®</sup> software (53), available online  
392 (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HYPERMUT/hypermut.html>). Hypermut2.0<sup>®</sup>  
393 detects hypermutation induced by APOBEC3G or APOBEC3F proteins (54, 55). We used

20

394 prototypic strains « ROD » and « EHO » as references. LTR sequences with a p-value under  
395 0.05 were considered as APOBEC-hypermutated.

396

#### 397 *Research of TF binding sites*

398 LTR sequences were analyzed with MatInspector® v8.3 (Genomatix, Munich, Germany) and  
399 PROMO® v3.0.2 in order to verify the presence of known TF binding sites and to identify  
400 putative TF binding sites (56, 57). Only binding sites of TF belonging to proteins families  
401 known to bind to HIV-1 LTR were included in our analyses (58, 59).

402

#### 403 **Cell lines**

404 HEK293T (ATCC®, CRL-3216™) and Jurkat clone 20 (60) cell lines were provided by the Virus  
405 and Immunity unit, Pasteur Institute. HEK293T cells were cultured with Dulbecco's Modified  
406 Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum and 1% penicillin  
407 and streptomycin. Jurkat cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)  
408 medium supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum and 1% penicillin and streptomycin.

409

#### 410 **LTR transcriptional activity**

411 Transcriptional activities of LTR regions were determined by transfecting cell lines with  
412 plasmids encoding the *Photinus pyralis* luciferase gene under the expression of an HIV-2 LTR  
413 (pLTR-Luc). Expression of luciferase was correlated to promoter's activity, i.e. to LTR  
414 transcriptional activity, and was enhanced by co-transfection of HIV-2 Tat plasmid (pTat)  
415 and/or cellular activation by PMA (Biontex, Munich, Germany). HIV-2 Tat and HIV-2 LTR  
416 sequences were synthesized by Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany), then sub-cloned in  
417 pcDNA3® and pGL4.14[luc2/Hygro]® vectors (Promega, Madison, WI, USA) respectively.

21

418 HEK293T cells were transfected using Metafectene® (Biontexas, Munich, Germany). For each  
419 well, 50 ng of plasmid DNA was mixed in 4 µL of Metafectene® and 46 µL of PBS, then  
420 incubated 15 minutes at room temperature. The mix was added to  $5.10^5$  cells, thoroughly  
421 mixed, then incubated for 15 minutes at room temperature. Transfected cells were diluted  
422 with DMEM medium and  $5.10^4$  cells were seeded per well, in triplicate for all conditions.  
423 After 20 hours of culture at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, 50 µL of Bright Glo Luciferase® (Promega,  
424 Madison, WI, USA) was added to 50 µL of cells. After 150 seconds, complete cell lysis was  
425 achieved, and luciferase activity was assessed using a luminometer. Luciferase index was  
426 calculated by dividing median luciferase activity of each condition by median luciferase  
427 activity for ROD-LTR at basal level.

428 Transcriptional activities were also determined in transfected Jurkat clone 20 cells, using a  
429 DEAE-dextran method adapted from a previous publication (61). Briefly,  $2.10^5$  Jurkat cells  
430 were seeded per well, washed then mixed with 15 µL of a DEAE-dextran/DNA containing  
431 55ng of plasmid DNAs (50 ng of pLTR-Luc and 5 ng of pTat or empty pcDNA3®) for 20  
432 minutes at room temperature. Transfected cells were then diluted with 225 µL of RPMI 1640  
433 medium supplemented with 2% glutamine, 5% fetal calf serum (FCS) (Thermofisher, Gibco,  
434 Waltham, MA, USA) and antibiotics (penicillin and streptomycin) and incubated for 1 hour at  
435 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were washed, and then suspended with 250 µL of RPMI 1640  
436 medium containing 10% FCS and antibiotics. After 22 hours at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, cells were  
437 centrifuged, supernatant was discarded, and the pellet was suspended with 200 µL of RPMI  
438 medium (alone or with 1 µL of a PMA solution in order to obtain a final concentration of  
439 PMA of 100ng/mL).

440 After 8 hours of incubation, the 96-well plate was centrifuged and 150 µL of medium was  
441 removed from each well. A luciferase assay was performed by adding 50 µL of Bright Glo

442 Luciferase® on the remaining 50 µL. Simultaneously, a MTT assay was carried out to verify  
443 cell viability (61). Luciferase activities and MTT values were measured with a luminometer. In  
444 order to assess LTR transcriptional activity, data was normalized with the MTT value, then  
445 divided by ROD-LTR basal activity to obtain a luciferase index.

446 At least three independent transfection experiments were performed in triplicate for both  
447 cell lines.

448

#### 449 **Statistics**

450 One-way ANOVA, post-hoc Tukey, Mann-Whitney and Fisher's exact tests were performed  
451 using R v3.2.4 (<http://www.R-project.org>), with significance level defined as a p-value below  
452 0.05.

453

#### 454 **Ethics statement**

455 The French ANRS CO5 HIV-2 cohort has been approved, accordingly to the French ethic laws.

456 The project has been approved by the local institutional review board CCP IDF XI (Comité de

457 Protection des Personnes, Ile-de-France) on the 24<sup>th</sup> of January 2002. Collection and

458 transmission of patients' data has been approved by the CCTIRS (Comité Consultatif sur le

459 Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé) on the

460 14<sup>th</sup> of November 2002 and by the CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des

461 Libertés) on the 30<sup>th</sup> of December 2002. Written informed consents were obtained from all

462 patients at time of inclusion in the cohort.

463

### **Acknowledgments**

464 We thank all patients, clinical and virological investigators of the French ARNS CO5 HIV-2

465 cohort.

466

## References

- 467 1. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin  
 468 C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. 1983. Isolation of a T-  
 469 lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).  
 470 Science 220:868–871.
- 471 2. Clavel F. 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS.  
 472 Science 233:343–347.
- 473 3. Faria NR, Hodges-Mameletzis I, Silva JC, Rodés B, Erasmus S, Paolucci S, Ruelle J, Pieniazek D,  
 474 Taveira N, Treviño A, Gonçalves MF, Jallow S, Xu L, Camacho RJ, Soriano V, Goubau P, de Sousa  
 475 JD, Vandamme A-M, Suchard MA, Lemey P. 2012. Phylogeographical footprint of colonial  
 476 history in the global dispersal of human immunodeficiency virus type 2 group A. J Gen Virol  
 477 93:889–899.
- 478 4. Lemey P, Pybus OG, Wang B, Saksena NK, Salemi M, Vandamme A-M. 2003. Tracing the origin  
 479 and history of the HIV-2 epidemic. Proc Natl Acad Sci USA 100:6588–6592.
- 480 5. Clavel F, Guyader M, Guétard D, Sallé M, Montagnier L, Alizon M. 1986. Molecular cloning and  
 481 polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. Nature 324:691–695.
- 482 6. Grassly NC, Xiang Z, Ariyoshi K, Aaby P, Jensen H, Schim van der Loeff M, Dias F, Whittle H,  
 483 Breuer J. 1998. Mortality among Human Immunodeficiency Virus Type 2-Positive Villagers in  
 484 Rural Guinea-Bissau Is Correlated with Viral Genotype. J Virol 72:7895–7899.
- 485 7. Esbjörnsson J, Månsson F, Kvist A, da Silva ZJ, Andersson S, Fenyö EM, Isberg P-E, Biague AJ,  
 486 Lindman J, Palm AA, Rowland-Jones SL, Jansson M, Medstrand P, Norrgren H, N’Buna B, Biague  
 487 AJ, Biai A, Camara C, Esbjörnsson J, Jansson M, Karlson S, Lindman J, Medstrand P, Månsson F,  
 488 Norrgren H, Palm AA, Özkaya Sahin G, da Silva ZJ, Wilhelmson S. 2018. Long-term follow-up of

25

- 489 HIV-2-related AIDS and mortality in Guinea-Bissau: a prospective open cohort study. *The Lancet*  
490 HIV.
- 491 8. Gottlieb GS, Sow PS, Hawes SE, Ndoye I, Redman M, Coll-Seck AM, Faye-Niang MA, Diop A,  
492 Kuypers JM, Critchlow CW, Respass R, Mullins JI, Kiviat NB. 2002. Equal plasma viral loads  
493 predict a similar rate of CD4+ T cell decline in human immunodeficiency virus (HIV) type 1- and  
494 HIV-2-infected individuals from Senegal, West Africa. *The Journal of Infectious Diseases*  
495 185:905–914.
- 496 9. Matheron S, Pueyo S, Damond F, Simon F, Leprêtre A, Campa P, Salamon R, Chêne G, Brun-  
497 Vezinet F, Group FH-2 CS, others. 2003. Factors associated with clinical progression in HIV-2  
498 infected-patients: the French ANRS cohort. *Aids* 17:2593–2601.
- 499 10. Popper SJ, Sarr AD, Travers KU, Guèye-Ndiaye A, Mboup S, Essex ME, Kanki PJ. 1999. Lower  
500 human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of  
501 HIV-1 and HIV-2. *J Infect Dis* 180:1116–1121.
- 502 11. Kanki PJ, Travers KU, Mboup S, Hsieh CC, Marlink RG, Gueye-Ndiaye A, Siby T, Thior I,  
503 Hernandez-Avila M, Sankalé JL. 1994. Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet*  
504 343:943–946.
- 505 12. Matheron S, Courpotin C, Simon F, Di Maria H, Balloul H, Bartzack S, Dormont D, Brun Vezinet F,  
506 Saimot AG, Coulaud JP. 1990. Vertical transmission of HIV-2. *Lancet* 335:1103–1104.
- 507 13. Sharp PM, Hahn BH. 2011. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harb Perspect*  
508 *Med* 1:a006841.
- 509 14. Visseaux B, Damond F, Matheron S, Descamps D, Charpentier C. 2016. HIV-2 molecular  
510 epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution* 46:233–240.

- 511 15. Berry N, Ariyoshi K, Jobe O, Ngum PT, Corrah T, Wilkins A, Whittle H, Tedder R. 1994. HIV type 2  
512 proviral load measured by quantitative polymerase chain reaction correlates with CD4+  
513 lymphopenia in HIV type 2-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10:1031–1037.
- 514 16. Popper SJ, Sarr AD, Guèye-Ndiaye A, Mboup S, Essex ME, Kanki PJ. 2000. Low Plasma Human  
515 Immunodeficiency Virus Type 2 Viral Load Is Independent of Proviral Load: Low Virus  
516 Production In Vivo. *J Virol* 74:1554–1557.
- 517 17. MacNeil A, Sarr AD, Sankalé J-L, Meloni ST, Mboup S, Kanki P. 2007. Direct Evidence of Lower  
518 Viral Replication Rates In Vivo in Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Infection than  
519 in HIV-1 Infection. *J Virol* 81:5325–5330.
- 520 18. Gueudin M, Damond F, Braun J, Taïeb A, Lemée V, Plantier J-C, Chêne G, Matheron S, Brun-  
521 Vézinet F, Simon F. 2008. Differences in proviral DNA load between HIV-1- and HIV-2-infected  
522 patients. *AIDS* 22:211–215.
- 523 19. Hannibal MC, Markovitz DM, Nabel GJ. 1994. Multiple cis-acting elements in the human  
524 immunodeficiency virus type 2 enhancer mediate the response to T-cell receptor stimulation by  
525 antigen in a T-cell hybridoma line. *Blood* 83:1839–1846.
- 526 20. Markovitz DM, Hannibal M, Perez VL, Gauntt C, Folks TM, Nabel GJ. 1990. Differential  
527 regulation of human immunodeficiency viruses (HIVs): a specific regulatory element in HIV-2  
528 responds to stimulation of the T-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9098–9102.
- 529 21. Markovitz DM, Smith MJ, Hilfinger J, Hannibal MC, Petryniak B, Nabel GJ. 1992. Activation of  
530 the human immunodeficiency virus type 2 enhancer is dependent on purine box and kappa B  
531 regulatory elements. *J Virol* 66:5479–5484.
- 532 22. Rhim H, Rice AP. 1994. Exon2 of HIV-2 Tat contributes to transactivation of the HIV-2 LTR by  
533 increasing binding affinity to HIV-2 TAR RNA. *Nucleic acids research* 22:4405–4413.

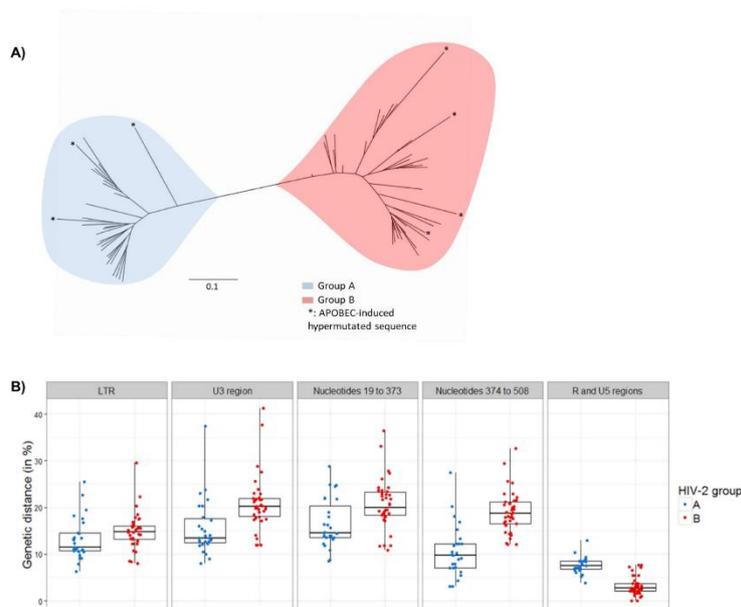
- 534 23. Tong-Starksen SE, Welsh TM, Peterlin BM. 1990. Differences in transcriptional enhancers of  
535 HIV-1 and HIV-2. Response to T cell activation signals. *J Immunol* 145:4348–4354.
- 536 24. Arya SK, Mohr JR. 1994. Conditional regulatory elements of human immunodeficiency virus  
537 type 2 long terminal repeat. *J Gen Virol* 75 ( Pt 9):2253–2260.
- 538 25. Hilfinger JM, Clark N, Smith M, Robinson K, Markovitz DM. 1993. Differential regulation of the  
539 human immunodeficiency virus type 2 enhancer in monocytes at various stages of  
540 differentiation. *J Virol* 67:4448–4453.
- 541 26. Leiden JM, Wang CY, Petryniak B, Markovitz DM, Nabel GJ, Thompson CB. 1992. A novel Ets-  
542 related transcription factor, Elf-1, binds to human immunodeficiency virus type 2 regulatory  
543 elements that are required for inducible trans activation in T cells. *J Virol* 66:5890–5897.
- 544 27. Pagtakhan AS, Tong-Starksen SE. 1997. Interactions between Tat of HIV-2 and transcription  
545 factor Sp1. *Virology* 238:221–230.
- 546 28. García-Martínez LF, Mavankal G, Peters P, Wu-Baer F, Gaynor RB. 1995. Tat functions to  
547 stimulate the elongation properties of transcription complexes paused by the duplicated TAR  
548 RNA element of human immunodeficiency virus 2. *Journal of molecular biology* 254:350–363.
- 549 29. Pollard VW, Malim MH. 1998. The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* 52:491–532.
- 550 30. de Arellano ER, Alcamí J, López M, Soriano V, Holguín A. 2010. Drastic decrease of transcription  
551 activity due to hypermutated long terminal repeat (LTR) region in different HIV-1 subtypes and  
552 recombinants. *Antiviral Res* 88:152–159.
- 553 31. Qu D, Li C, Sang F, Li Q, Jiang Z-Q, Xu L-R, Guo H-J, Zhang C, Wang J-H. 2016. The variances of  
554 Sp1 and NF- $\kappa$ B elements correlate with the greater capacity of Chinese HIV-1 B'-LTR for driving  
555 gene expression. *Sci Rep* 6:34532.

- 556 32. Damond F, Apetrei C, Robertson DL, Souquière S, Leprêtre A, Matheron S, Plantier J, Brun-  
557 Vézinet F, Simon F. 2001. Variability of Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Infecting  
558 Patients Living in France. *Virology* 280:19–30.
- 559 33. Bertine M, Charpentier C, Visseaux B, Storto A, Collin G, Larrouy L, Damond F, Matheron S,  
560 Brun-Vézinet F, Descamps D, ANRS CO5 HIV-2 Cohort. 2015. High level of APOBEC3F/3G editing  
561 in HIV-2 DNA vif and pol sequences from antiretroviral-naive patients. *AIDS* 29:779–784.
- 562 34. Gueudin M, Bénard A, Chêne G, Matheron S, Simon F. 2008. Significant differences in DNA viral  
563 load between HIV-1 and HIV-2 infected patients: *AIDS* 22:1519–1520.
- 564 35. Visseaux B, Charpentier C, Bertine M, Besseghir A, Fagard C, Damond F, Matheron S, Hué S,  
565 Descamps D. 2016. Le groupe A du VIH-2 présente deux génotypes distincts associés à  
566 différentes distributions géographiques. 8e Conférence Internationale Francophone  
567 VIH/hépatites AFRAVIH. Bruxelles, Belgium.
- 568 36. Damond F, Descamps D, Farfara I, Telles JN, Puyeo S, Campa P, Leprêtre A, Matheron S, Brun-  
569 Vézinet F, Simon F. 2001. Quantification of Proviral Load of Human Immunodeficiency Virus  
570 Type 2 Subtypes A and B Using Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 39:4264–4268.
- 571 37. Alteri C, Barbaliscia S, Scutari R, Bertoli A, Fedele V, Carta S, Pollicita M, Montano M,  
572 Maffongelli G, Andreoni M, Ceccherini-Silberstein F, Perno CF, Svicher V. 2015. High LTR genetic  
573 variability affects HIV-DNA levels in patients on suppressive HAART. International HIV Drug  
574 Resistance Workshop. Boston, Massachusetts.
- 575 38. Berry N, Ariyoshi K, Balfe P, Tedder R, Whittle H. 2001. Sequence specificity of the human  
576 immunodeficiency virus type 2 (hiv-2) long terminal repeat u3 region in vivo allows subtyping of  
577 the principal hiv-2 viral subtypes a and b. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17:263–267.

- 578 39. Jeeninga RE, Hoogenkamp M, Armand-Ugon M, de Baar M, Verhoef K, Berkhout B. 2000.  
579 Functional differences between the long terminal repeat transcriptional promoters of human  
580 immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G. *J Virol* 74:3740–3751.
- 581 40. Harrich D, Garcia J, Wu F, Mitsuyasu R, Gonazalez J, Gaynor R. 1989. Role of SP1-binding  
582 domains in in vivo transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1 long  
583 terminal repeat. *Journal of Virology* 63:2585.
- 584 41. Jones KA, Kadonaga JT, Luciw PA, Tjian R. 1986. Activation of the AIDS retrovirus promoter by  
585 the cellular transcription factor, Sp1. *Science* 232:755–759.
- 586 42. Ross EK, Buckler-White AJ, Rabson AB, Englund G, Martin MA. 1991. Contribution of NF-kappa B  
587 and Sp1 binding motifs to the replicative capacity of human immunodeficiency virus type 1:  
588 distinct patterns of viral growth are determined by T-cell types. *Journal of Virology* 65:4350.
- 589 43. Thompson CB, Wang CY, Ho IC, Bohjanen PR, Petryniak B, June CH, Miesfeldt S, Zhang L, Nabel  
590 GJ, Karpinski B, Al E. 1992. cis-acting sequences required for inducible interleukin-2 enhancer  
591 function bind a novel Ets-related protein, Elf-1. *Molecular and Cellular Biology* 12:1043.
- 592 44. Furtado MR, Callaway DS, Phair JP, Kunstman KJ, Stanton JL, Macken CA, Perelson AS, Wolinsky  
593 SM. 1999. Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients  
594 receiving potent antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 340:1614–1622.
- 595 45. Henderson AJ, Zou X, Calame KL. 1995. C/EBP proteins activate transcription from the human  
596 immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in macrophages/monocytes. *Journal of*  
597 *Virology* 69:5337.
- 598 46. Machuca A, Soriano V, Gutierrez M, Holguín A, Aguilera A, Caballero E, Cilla G. 1999. Human  
599 immunodeficiency virus type 2 infection in Spain. The HIV-2 Spanish Study Group. *Intervirology*  
600 42:37–42.

- 601 47. Désiré N, Dehé A, Schneider V, Jacomet C, Goujon C, Girard P-M, Rozenbaum W, Nicolas J-C.  
602 2001. Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proviral Load by a TaqMan Real-  
603 Time PCR Assay. *J Clin Microbiol* 39:1303–1310.
- 604 48. Avettand-Fenoel V, Damond F, Gueudin M, Matheron S, Mélard A, Collin G, Descamps D, Chaix  
605 M-L, Rouzioux C, Plantier J-C, ANRS-CO5 HIV-2 and the ANRS-AC11 Quantification Working  
606 Group. 2014. New sensitive one-step real-time duplex PCR method for group A and B HIV-2  
607 RNA load. *J Clin Microbiol* 52:3017–3022.
- 608 49. Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B. 2015. RDP4: Detection and analysis of  
609 recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1:vev003.
- 610 50. Schierup MH, Hein J. 2000. Consequences of recombination on traditional phylogenetic  
611 analysis. *Genetics* 156:879.
- 612 51. Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms  
613 and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of  
614 PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307–321.
- 615 52. Pond SLK, Frost SDW, Muse SV. 2005. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies.  
616 *Bioinformatics* 21:676–679.
- 617 53. Rose PP, Korber BT. 2000. Detecting hypermutations in viral sequences with an emphasis on G  
618 → A hypermutation. *Bioinformatics* 16:400–401.
- 619 54. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1  
620 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418:646–650.

- 621 55. Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, Neuberger MS, Malim  
622 MH. 2003. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113:803–  
623 809.
- 624 56. Farré D, Roset R, Huerta M, Adsuara JE, Roselló L, Albà MM, Messeguer X. 2003. Identification  
625 of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids*  
626 *Res* 31:3651–3653.
- 627 57. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M,  
628 Werner T. 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor  
629 binding sites. *Bioinformatics* 21:2933–2942.
- 630 58. Pereira LA, Bentley K, Peeters A, Churchill MJ, Deacon NJ. 2000. SURVEY AND SUMMARY A  
631 compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic*  
632 *Acids Res* 28:663–668.
- 633 59. Krebs FC, Hogan TH, Quiterio S, Gartner S, Wigdahl B. 2001. Lentiviral LTR-directed Expression,  
634 Sequence Variation, and Disease Pathogenesis. *HIV Sequence Compendium* 29–70.
- 635 60. The Staphylococcus aureus Enterotoxin B Superantigen Induces Specific T Cell Receptor Down-  
636 regulation by Increasing Its Internalization.
- 637 61. Schwartz O, Virelizier JL, Montagnier L, Hazan U. 1990. A microtransfection method using the  
638 luciferase-encoding reporter gene for the assay of human immunodeficiency virus LTR  
639 promoter activity. *Gene* 88:197–205.
- 640



641

33

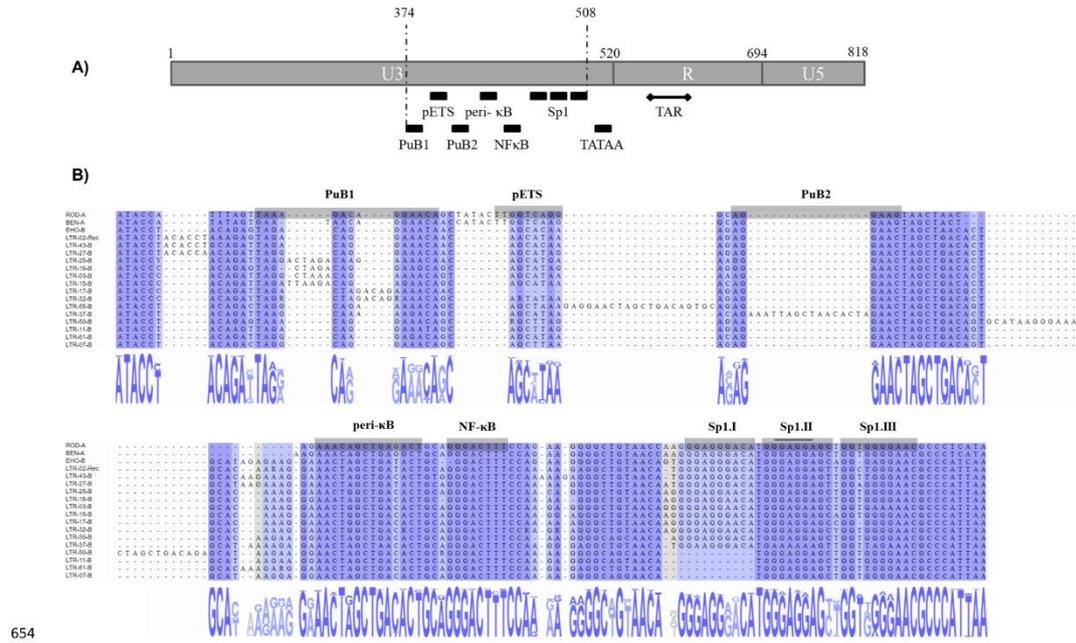
642 **Fig 1: Phylogenetic tree and genetic distances between HIV-2 LTR sequences.**

643 A) This phylogenetic tree was obtained with LTR sequences of 65 patients included in this study and 3 HIV-2 reference strains (« ROD », « BEN »  
 644 and « EHO » for subtypes A1, A2 and group B, respectively). As recommended in phylogenetic analysis, the recombinant A/B sequence was  
 645 excluded from this phylogenetic analysis. The phylogenetic tree was generated with PhyML® using a GTR model with gamma distribution = 4  
 646 and 1000 bootstraps, then edited on FigTree®. Group A sequences are colored in blue, group B in red and APOBEC-induced hypermutated  
 647 sequences are marked with an asterisk. Length of branches is proportional to genetic distances; the length of the scale depicted in this figure is  
 648 equal to 0.10 substitutions per nucleotide.

649 B) Genetic distances in the whole HIV-2 LTR and in different sub-regions. Genetic distances of groups A and B viruses were obtained by  
 650 comparison with their reference strains, « ROD » and « EHO » respectively. Those genetic distances were plotted separately, in blue for group A  
 651 and in red for group B, each circle corresponding to one patient. Box plots represent the median and the interquartile range of genetic  
 652 distances; p-values were calculated with a Mann-Whitney test.

653 Abbreviations: Pub1 and 2: Purine Boxes 1 and 2; pets: peri-ETS; TAR: Tat-Activated Region.

34



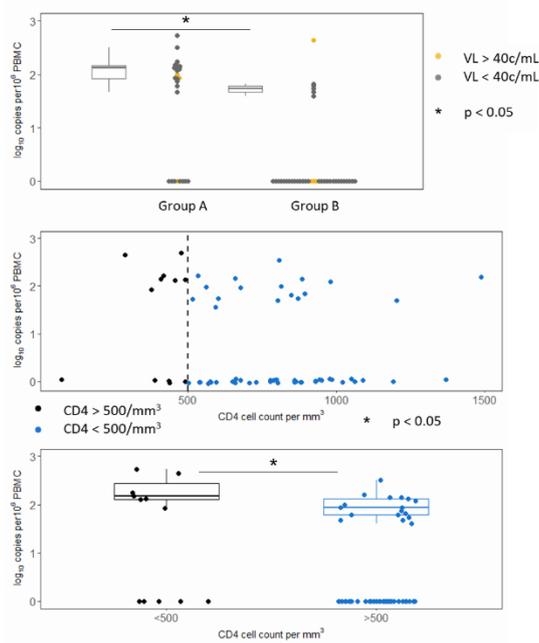
655 **Fig 2: Schematic representation of HIV-2 LTR and alignment of the "regulatory" sub-region of selected HIV-2 group B sequences.**

656 (A) Representation of the HIV-2 LTR with the main TFs binding sites depicted as black boxes. The "regulatory" sub-region corresponds to  
 657 nucleotides 374 to 508 of the « ROD » reference strain. (B) Alignment of the "regulatory" sub-region (nucleotides 374 to 508 of « ROD »  
 658 reference strain). This alignment was composed using sequences from the 2 HIV-2 reference strains (« ROD » and « EHO » for groups A and B,  
 659 respectively) and from the 15 proviruses displaying insertions in this "regulatory" sub-region (14 group B, 1 recombinant A/B). At each position,  
 660 intensity of shading is positively correlated with the degree of conservation among sequences. Known cellular TF binding sites described in  
 661 « ROD » are highlighted in gray, and binding sites of Sp1 are labelled from Sp1.I to Sp1.III.

662 Abbreviations: PuB1 and 2: Purine Boxes 1 and 2; pets: peri-ETS; TAR: Tat-Activated Region

35

36



663

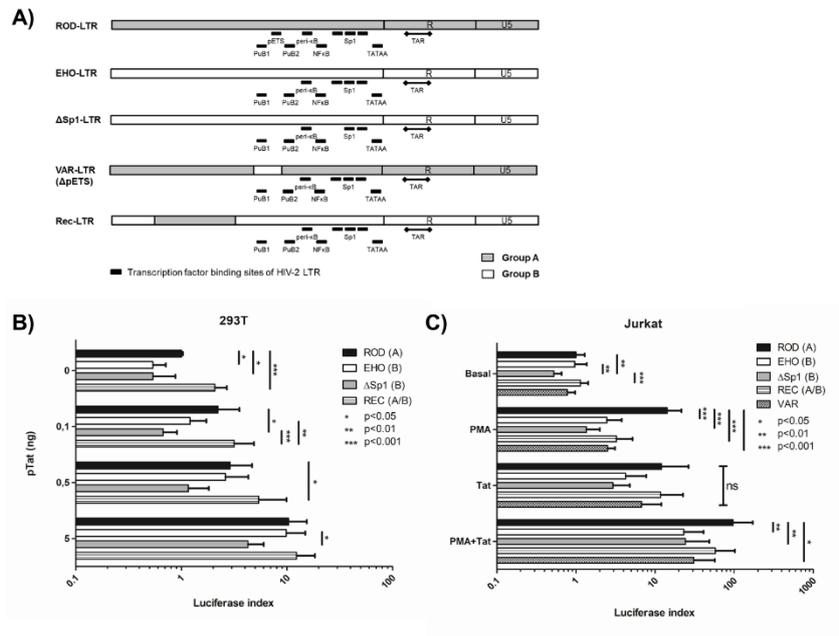
37

664 **Fig 3: HIV-2 cellular reservoir quantification**

665 (A) Quantification of HIV-2 total DNA. HIV-2 cellular reservoir was quantified by an in-house technique and expressed in  $\log_{10}$  copies of HIV-2  
 666 total DNA per  $10^6$  PBMC. HIV-2 reservoir sizes were plotted separately for each viral group, in blue for group A, red for group B and purple for  
 667 the recombinant A/B. Patients with a CD4 cell count over  $500/\text{mm}^3$  are represented with a filled circle and those with a CD4 cell count below  
 668  $500/\text{mm}^3$  with an empty rectangle. Box plots represent the median and the interquartile range of quantifiable HIV-2 cellular reservoirs; p-value  
 669 was calculated with a Mann-Whitney test. (B) HIV-2 reservoir size in function of CD4 cell count. HIV-2 total DNA level of each patient (in  $\log_{10}$   
 670 copies per  $10^6$  PBMC) is expressed in function of CD4 cell count. (C) Comparison of HIV-2 total DNA levels between patients with CD4 cell count  
 671 below or above  $500/\text{mm}^3$ . Patients with a CD4 cell count over  $500/\text{mm}^3$  were depicted with a light-blue circle and those with a CD4 cell  
 672 count below  $500/\text{mm}^3$  with a black circle. Box plots represent the median and the interquartile range of quantifiable HIV-2 cellular reservoirs.  
 673 HIV-2 cellular reservoir sizes were compared using a Mann-Whitney test.

674 For all three figures, an arbitrary level of 1 copy per  $10^6$  PBMC was attributed when HIV-2 total DNA was quantifiable but below the limit of  
 675 quantification (i.e., 6 copies per PCR) and the two patients (1 group A and 1 group B) with an undetectable HIV-2 total DNA level were not  
 676 included in the figures.

38



677

39

678 **Fig 4: Transcriptional activities of HIV-2 LTRs.**

679 (A) Representation of the 5 different pLTR-Luc plasmids used in luciferase assays. Black boxes represent the cellular TF binding sites present in  
 680 each LTR. ROD: complete LTR sequence of the HIV-2 group A strain « ROD », EHO: LTR of the HIV-2 group B strain « EHO »; ΔSp1: LTR of « EHO  
 681 » with deletion of the Sp1.I, as identified in 4 patients; Rec: complete LTR sequence of the identified recombinant A/B; and VAR: chimeric LTR  
 682 constructed by replacing the PuB1/pets sub-region in the « ROD » sequence by the corresponding sequence of “EHO” lacking the pets binding  
 683 site. (B) Luciferase index in HEK293T cells transfected by pLTR-Luc and various amounts of pTat (0, 0.1, 0.5 and 5 ng). Luciferase indexes were  
 684 obtained by dividing luciferase activities by the mean basal luciferase activity of ROD-LTR for each experiment. (C) Luciferase index in Jurkat  
 685 clone 20 cells transfected by pLTR-Luc alone or activated by PMA and/or Tat. For Jurkat experiments, luciferase indexes were obtained by  
 686 dividing the luciferase activity by the value of the MTT assay, then dividing by the value of the basal activity of ROD-LTR for each experiment.  
 687 For B) and C), results (means and standard deviations) were obtained through at least 3 independent experiments, performed in triplicate. For  
 688 each condition, means were compared with a one-way ANOVA test, and p-values were calculated with a post-hoc Tukey test.  
 689 (Abbreviations: pLTR-Luc: plasmids encoding the *Firefly* luciferase gene under the expression of an HIV-2 LTR; pTat: plasmid coding for HIV-2  
 690 Tat; PMA: phorbol myristate acetate; TAR: Tat-activated region).

40

## Discussion

---

La physiopathologie de l'infection par le VIH-2 n'est pas totalement élucidée à ce jour. Plusieurs écueils limitent notre compréhension de la moindre pathogénicité des infections par le VIH-2. En premier lieu, il faut évoquer sa faible réplication virale, limitant le succès des tentatives d'isolement du virus et donc l'appréhension de la diversité moléculaire des VIH-2. De cette plus faible réplication découlent les faibles taux de transmission. L'expansion limitée des cas d'infections par le VIH-2 en dehors de l'Afrique de l'Ouest n'a pas fait du VIH-2 une priorité dans le développement des thérapeutiques antirétrovirales et a également compliqué la mise en place d'essais randomisés (Gottlieb et al., 2008b). De plus, la mesure de la charge virale ne peut pas être utilisée comme seul critère de réponse du traitement antirétroviral.

Dans un premier travail, nous nous sommes focalisés sur l'amélioration des techniques d'isolement des souches virales VIH-2. Disposer de souches virales demeure primordial car cela permet d'étudier les caractéristiques phénotypiques de ces virus, ainsi que la diversité moléculaire et son évolution. A ce jour, l'essentiel des études sur le VIH-2 est mené sur des virus dérivant de ROD, qui est une souche de référence, adaptée au laboratoire, de groupe A. Une fine compréhension des mécanismes à l'origine du meilleur contrôle de l'infection par le VIH-2 ne pourra probablement pas être réalisée en travaillant avec un nombre limité d'isolats, d'autant plus quand la majorité des virus étudiés appartiennent au seul groupe A.

Grâce à la mise au point d'une technique de purification à l'aide de billes paramagnétiques anti-CD44, nous avons pu isoler 17 isolats cliniques de VIH-2 à partir du plasma de patients virémiques (Le Hingrat et al., 2018b). Cette étape de purification est rapide, peu coûteuse et facilement implémentable dans des laboratoires de virologie utilisant la culture cellulaire.

En isolant ces souches, cela nous a permis de compléter notre banque de souches virales avec des virus porteurs de mutations dans différents gènes, mais également d'isoler des virus chez des patients en échec de traitement, chez lesquels aucune mutation de résistance connue n'avait été identifiée.

Les virus isolés dans ce travail appartiennent aux deux groupes endémiques du VIH-2 : les groupes A et B. Des analyses du génome complet par séquençage haut débit sont en cours sur les virus du groupe B. En effet, seulement 7 séquences complètes de virus du groupe B sont

disponibles sur le compendium du laboratoire de Los Alamos, comparé à 30 génomes complets pour les virus du groupe A. De plus, les séquences disponibles pour les virus du groupe B ne représentent pas l'ensemble de la diversité moléculaire de ce groupe. Des travaux préliminaires de phylogénie indiquent qu'il existerait 5 sous-groupes au sein du groupe B (données personnelles non publiées). Pour deux d'entre eux, nous ne disposons pas de génome complet. Des travaux de séquençage de génome complet sont en cours afin de mieux décrire la diversité moléculaire des VIH-2 du groupe B, nécessaire pour identifier d'éventuels recombinants intra-groupe.

Dans un deuxième travail, nous avons caractérisé les phénotypes de résistance aux INSTI de différentes souches du VIH-2. Pour cela, nous avons évalué la sensibilité phénotypique de 12 isolats cliniques obtenus à partir du plasma de patients à l'échec d'un traitement antirétroviral contenant un inhibiteur d'intégrase. Nous avons déterminé pour la première fois la sensibilité au BIC de différents virus mutés dans le gène de l'intégrase. Le BIC présente un profil d'efficacité similaire au DTG, sauf pour deux mutants : le double mutant E92Q+T97A sur lequel le BIC demeure actif, alors que le DTG présente une légère augmentation de sa  $CI_{50}$ , et le double mutant G140S/Q148H qui est complètement résistant à tous les INSTI, sauf au BIC qui présente une  $CI_{50}$  multipliée par 30 par rapport au virus sauvage.

Nous avons également identifié un nouveau mécanisme moléculaire de résistance aux INSTI, représenté par une insertion de 5 acides aminés après le codon 231 de l'intégrase. Cette insertion correspond à une duplication des 5 acides aminés en amont. Les acides aminés insérés différaient entre les virus des différents patients mais l'insertion comportait toujours deux acides aminés chargés positivement (R et/ou K) et les deux derniers acides aminés étaient soit GK, soit GR. Un virus présentant une insertion de deux acides aminés, GK, a été identifiée rétrospectivement chez l'un des patients, de manière transitoire, plusieurs mois avant que l'insertion de 5 acides aminés ne soit observée.

Le codon 231 de la région C-terminale de l'intégrase du VIH-2 fait partie du motif RKK, qui est conservé dans les séquences VIH-1 et VIH-2 (Lataillade et al., 2007; Roquebert et al., 2008). L'arginine au codon 231 est exposée à la surface de l'intégrase et jouerait un rôle dans la liaison à l'ADN de la cellule hôte (Eijkelenboom et al., 1997). L'importance de ce codon a été confirmée par une étude ayant exploré l'impact de différentes mutations dans le domaine C-terminal de l'intégrase du VIH-1 (Lutzke and Plasterk, 1998). La mutation R231A entraînait une diminution de moitié des deux activités enzymatiques de l'intégrase : le 3' processing et l'activité de transfert de brin (Lutzke and Plasterk, 1998).

Nous avons observé cette insertion dans les virus des patients traités par une trithérapie comprenant du raltegravir, un INSTI de première génération avec une faible barrière génétique, alors que leurs virus étaient déjà porteurs de mutations de résistance aux INTI et aux IP. Cette insertion était rapidement sélectionnée (11 mois après l'introduction du RAL, en médiane) et entraînait une résistance importante au RAL, à l'EVG et au CAB, ainsi qu'une résistance modérée au DTG et une résistance faible au BIC. Ce mécanisme de résistance est désormais reconnu par le groupe AC43 de l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS) qui l'a intégré dans la liste des mutations aux INSTI dans son dernier algorithme, en date de novembre 2018 (Annexe 2). Ces travaux ont été confirmés récemment par une équipe espagnole qui a identifié un virus porteur de cette insertion de 5 acides aminés dans leur cohorte, chez un patient en échec d'un traitement contenant du DTG, avec un historique d'échec sous RAL (Requena et al., 2019).

Dans le modèle macaque, deux équipes ont également rapporté la sélection d'insertions dans le gène de l'intégrase (Van Rompay et al., 2018) (Andrews, 2016). Dans la première étude, des insertions de 5 à 6 acides aminés ont été décrites, chez des macaques infectés par un virus simien proche du VIH-2, le VISmac251, et traités par monothérapie de DTG (Van Rompay et al., 2018). Les insertions étaient retrouvées dans les séquences virales obtenues à partir de virus plasmatiques mais également à partir des réservoirs profonds (ganglion lymphatique axillaire et jéjunum) chez 3 des 9 macaques (Van Rompay et al., 2018). Les insertions étaient sélectionnées au bout de 4, 10 et 54 semaines de monothérapie de DTG chez ces 3 primates (Van Rompay et al., 2018). Il est intéressant de noter que, comme cela a été observé dans notre étude, les motifs des insertions variaient entre les virus infectant les différents primates, mais également au fil du suivi et parfois même entre les virus isolés des prélèvements profonds et du plasma. Le motif de l'insertion semble donc être dynamique également dans un modèle primate. La sensibilité de ces VISmac251 porteurs d'insertions n'a pas été déterminée mais il semble probable que l'insertion confère également un certain niveau de résistance aux INSTI.

Dans l'autre étude, une insertion de 5 acides aminés a été rapporté chez un macaque infecté par VISmac251 et traité par une dose infra-thérapeutique de CAB en « long-acting » (Andrews, 2016). Cette mutation a ensuite été introduite dans différents virus, VISmac251, VISmac239 et VIH-1. L'infectivité était fortement réduite pour le VISmac239 et le VIH-1 porteurs de l'insertion, tandis que la capacité répliquative du VISmac251 porteur de cette insertion de 5 acides aminés était maintenue. De plus, la combinaison de cette insertion avec

les substitutions Q91R et D163N entraînaient un haut niveau de résistance phénotypique vis-à-vis du RAL, de l'EVG, du CAB et du DTG, avec une augmentation des  $CI_{50}$  d'un facteur 33 à 48 (Andrews, 2016).

Dans un troisième temps, nous avons poursuivi le travail précédent afin de mieux caractériser les insertions dans l'intégrase, leur impact sur la réplication virale, sur le niveau de sensibilité phénotypique et sur la structure de l'intégrase. Pour cela, nous avons construit par mutagenèse dirigée des VIH-2 porteurs des différents profils d'insertion dans le gène de l'intégrase observés *in vivo*. Nous avons également construit plusieurs virus porteurs des mutations majeures de résistance aux INSTI, afin de comparer les différents profils de résistance et de compléter nos connaissances sur ces mutations de résistance aux INSTI.

Nous avons montré que les insertions de 2 et de 5 acides aminés n'impactaient pas la réplication virale, à l'exception de l'insertion GIRGK. Les tests phénotypiques de sensibilité aux INSTI ont permis de définir l'impact sur la résistance de l'insertion de deux acides aminés, GK. Dans notre étude précédente, nous n'avions pas pu étudier ce profil car les virus présentant cette insertion n'avaient pas pu être isolés depuis le plasma des patients, probablement du fait des virémies très faibles (moins de 500 copies/mL). Le virus porteur d'une insertion GK présentait un profil de résistance intermédiaire avec une sensibilité fortement diminuée au RAL et au CAB, tandis que la sensibilité au BIC et au DTG est maintenue.

Les facteurs d'augmentation des  $CI_{50}$  pour les différents mutants 231INS variaient selon le motif de l'insertion mais, dans tous les cas, ils présentaient une résistance élevée au RAL et au CAB, contre-indiquant l'utilisation de ces deux molécules, ainsi que celle de l'EVG du fait de la forte résistance croisée avec le RAL. La sensibilité au BIC et au DTG était également impactée mais de manière modérée, permettant d'envisager de traiter les patients par du BIC ou du DTG, à condition de passer à une prise biquotidienne pour le DTG ou bien de co-administrer avec de l'atazanavir, boosté ou non par ritonavir, afin d'augmenter les concentrations de DTG et de BIC via l'effet potentialisateur de l'atazanavir, par inhibition du métabolisme du DTG et du BIC par UGT1A1 et CYP3A4.

Cela a été confirmé par des observations *in vivo*. L'un des patients dont le virus était porteur d'une insertion de 5 acides aminés a atteint une charge virale indétectable (inférieure à 40 copies/mL) après initiation d'un traitement contenant du BIC, malgré des années de réplication virale sous différentes lignes de traitement.

Nous nous sommes également intéressés à l'impact de ces insertions sur la structure de l'intégrase. Comme il pouvait être attendu, les structures prédites pour les intégrases porteuses d'une insertion montraient des modifications structurales importantes, avec la perte d'un des deux feuillets bêta du domaine C-terminal et la présence de l'insertion à la surface de l'enzyme virale. Ces modifications structurales, dans une région jouant un rôle dans la fixation de l'ADN de la cellule hôte, sont en faveur d'un impact sur l'activité enzymatique de l'intégrase virale.

Dans la dernière partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à la région promotrice du VIH-2, la région Long Terminal Repeat (LTR). Cette région a été étudiée par quelques équipes durant les années 1990, principalement via des études impliquant les virus du groupe A. A partir de l'étude des provirus VIH-2 issus de 66 patients de la cohorte Française VIH-2, nous avons observé une forte variabilité des séquences LTR des provirus du VIH-2 au sein d'une cohorte de 66 patients. Cela était dû à de nombreuses insertions et délétions, notamment dans la partie terminale de la sous-région U3, aussi appelée « régulatrice », qui comprend tous les sites connus de fixation de facteurs de transcription cellulaires.

Parmi les mutations identifiées, la majorité d'entre elles n'était observée que chez un seul patient, à l'exception de la délétion du premier site de fixation de Sp1, identifiée chez 4 des 37 provirus appartenant au groupe B. Sp1 est un facteur de transcription cellulaire, ubiquitaire, impliqué à la fois dans le niveau basal de transcription et dans l'intensité de la transactivation en réponse à la fixation de la protéine virale Tat sur la région TAR.

De plus, toutes les séquences du groupe B différaient fortement de celles du groupe A au niveau de la sous-région comprenant les sites de fixation PuB1 et pets, du fait de la délétion de plusieurs nucléotides. Des analyses *in silico* ont révélé que le site de fixation de PuB1 était probablement toujours fonctionnel mais que cette délétion causait la perte du site de fixation pets, qui fixe une protéine cellulaire non identifiée à ce jour mais qui est essentiel pour la réponse à l'activation cellulaire.

Devant ces observations, nous avons mesuré les activités transcriptionnelles de différents plasmides exprimant la luciférase sous le contrôle des régions LTR du VIH-2. Ces activités transcriptionnelles ont été étudiées dans deux lignées cellulaires, HEK293T et Jurkat clone 20.

Dans la lignée HEK293T, la transactivation par la protéine virale Tat du VIH-2 entraînait des niveaux de transcription similaires entre les LTR du groupe A et du groupe B. En revanche, la

seule délétion du site de fixation Sp1.I diminuait d'un facteur 2 le niveau de transactivation. Cette moindre réponse du LTR porteur d'une délétion de Sp1.I était également observée dans les cellules Jurkat mais la différence n'était pas significative. En revanche, dans la lignée Jurkat, le LTR porteur de cette délétion Sp1.I présentait une activité transcriptionnelle basale, en l'absence d'activateur, deux fois plus faible que celle du même LTR non muté. Ces observations sont en accord avec la littérature puisqu'il a été démontré qu'en plus de jouer un rôle dans le niveau de transcription basale, la présence de 3 sites intacts de fixation de Sp1 est aussi nécessaire pour une transactivation efficace par la protéine virale Tat du VIH-2 (Pagtakhan and Tong-Starksen, 1997). Les différences entre les lignées pourraient être dues à des niveaux différents d'expression de la protéine Sp1.

Le modèle cellulaire Jurkat clone 20 nous a permis d'étudier la transcription dans une lignée lymphocytaire, proche des cellules cibles du VIH *in vivo*. La délétion de plusieurs nucléotides dans la région Pub1/pets, en causant la perte du site de fixation pets, entraîne une diminution importante de la réponse du LTR des VIH-2 du groupe B à la transactivation cellulaire. La réponse à l'activation cellulaire par PMA est environ 10 fois plus faible pour les LTR de VIH-2 du groupe B. Cette différence d'activité transcriptionnelle reste significative, même après co-transfection d'un plasmide codant pour la protéine virale Tat du VIH-2 qui augmente fortement l'activité transcriptionnelle. Cette moindre réponse à la transactivation cellulaire avait été observée dans de précédentes études dans lesquelles les auteurs avaient introduit des mutations dans différents sites de fixation de facteurs de transcription, dont pets (Hannibal et al., 1994; Markovitz et al., 1992). L'importance de ce site de fixation pets est confirmée par la moindre réponse à l'activation cellulaire qui a également été observée pour le LTR recombinant dont la séquence est dérivée d'un patient, ne présentant pas ce site de fixation pets car sa séquence dans cette région appartient au groupe B.

Enfin, dans notre étude, nous avons mis en évidence des niveaux de réservoirs viraux plus faibles chez les patients infectés par des virus du groupe B. Cela n'était pas dû à un mésappariement des amorces et sondes utilisées car la quantification de l'ADN total du VIH-2 a été réalisée par une PCR duplex, ciblant des régions conservées entre les deux groupes viraux (Bertine et al., 2017). Cette plus faible activité transcriptionnelle du VIH-2 de groupe B après activation cellulaire pourrait limiter la production virale, et donc l'infection de nouvelles cellules cibles, réduisant l'expansion du réservoir viral.

Ces différences d'activité transcriptionnelle et de niveau de réservoir viral ne se reflétaient pas sur les caractéristiques cliniques ou biologiques des patients dans notre étude, les patients infectés par des virus du groupe B ne différaient pas de ceux infectés par un VIH-2 du groupe A, tant au niveau de la charge virale plasmatique que du taux de lymphocytes T CD4+. Différentes hypothèses sont à évoquer : soit une autre région du virus compense cette moindre activité transcriptionnelle du groupe B du VIH-2 suite à l'activation cellulaire, soit la différence de pathogénicité induite par cette plus faible activité transcriptionnelle n'est visible que plus tardivement dans l'infection, quand la réplication virale est moins bien contrôlée par le système immunitaire.

## Perspectives

---

L'ensemble de nos travaux confirme qu'il ne faut pas considérer le VIH-2 comme une infection bénigne, comme souligné dans un récent éditorial de Wejse et Hønge (Wejse and Hønge, 2019). Malgré une progression plus lente de l'infection, des charges virales plasmatiques spontanément faibles voire indétectables, et des réservoirs de taille réduite dans les CSMP, une étude a récemment montré qu'en l'absence de traitement antirétroviral les patients évoluaient vers le stade SIDA en 15 ans, en médiane (Esbjörnsson et al., 2018).

Cette évolution clinique plus lente est une opportunité qui doit être saisie afin de proposer le traitement le plus adéquat aux patients, en fonction de leurs comorbidités, de leurs co-médications mais également en anticipant les traitements futurs. En effet, du fait de l'arsenal thérapeutique limité et de la plus grande rapidité avec laquelle le VIH-2 sélectionne des mutations de résistance aux antirétroviraux, la stratégie de traitement antirétroviral devrait intégrer un concept d'épargne thérapeutique, c'est-à-dire ne pas compromettre l'efficacité des traitements de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> ligne, en limitant au maximum l'émergence de virus multi-résistants. Actuellement, les patients infectés par des virus devenus multi-résistants se retrouvent dans des situations d'impasse thérapeutique, situation devenue rare chez les PVVIH-1.

Au cours de la dernière décennie, deux essais randomisés ont été menés dans des pays d'Afrique de l'Ouest qui ont permis d'évaluer les traitements antirétroviraux proposés en 1<sup>ère</sup> ligne (Ba et al., 2018; Matheron et al., 2018), impliquant un très petit nombre de patients. Malheureusement, il n'existe toujours aucune recommandation internationale pour les traitements de deuxième ligne du fait de l'absence d'essai randomisé, les seules données provenant de cohortes observationnelles. Il semblerait intéressant de profiter de ces essais randomisés, qui se sont terminés récemment, et de l'expertise des différents consortiums internationaux pour initier des essais randomisés pour évaluer ces traitements de deuxième ligne.

Pour les patients infectés par des virus devenus multi-résistants au fil des années, les possibilités thérapeutiques sont actuellement limitées. Comme pour le VIH-1, des essais de

thérapies dites « de sauvetage » peuvent être proposées en associant de nouvelles molécules appartenant à une nouvelle classe (par exemple, l'ibalizumab) à une trithérapie classique, après une éventuelle période d'induction durant laquelle du foscarnet, en association avec de l'AZT, sera prescrit afin d'initier la décroissance de la charge virale plasmatique. Il peut également être proposé d'administrer le DTG en deux prises quotidiennes et/ou d'augmenter les concentrations plasmatiques des INSTI en co-administrant de l'atazanavir. Ces thérapies sont lourdes, certains médicaments ne pouvant être administrés que par voie intraveineuse, et les patients doivent être surveillés de manière rapprochée, pour évaluer la tolérance de ces traitements dont certains peuvent être toxiques (toxicité rénale du foscarnet, toxicité hématologique de l'AZT, hyperbilirubinémie avec l'atazanavir, etc.).

La sensibilité phénotypique des VIH-2 aux dernières molécules en développement : fostemsavir (inhibiteur d'attachement), GS-9131 (inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse, actif sur un grand nombre des profils de résistance aux INTI du VIH-1) et GS-CA1 (inhibiteur de capsid), devra être confirmée par des études phénotypiques sur un nombre plus conséquent de souches. Ces travaux devront notamment viser à identifier les déterminants virologiques de l'efficacité du fostemsavir dont l'efficacité sur le VIH-2 reste à déterminer.

Nous souhaitons poursuivre l'étude des mutants dans l'intégrase du VIH-2 de deux manières. Tout d'abord, nous développons actuellement des techniques de quantification moléculaire des différentes formes d'ADN du VIH-2, notamment les ADN intégrés et les formes circulaires 2-LTR. En effet, à l'heure actuelle, le seul outil de quantification des ADN du VIH-2 dont nous disposons est la quantification des ADN totaux du VIH-2. Cette technique ne permet pas de faire la distinction entre les différentes formes d'ADN du VIH-2 et ne permet donc pas de savoir si les mutations dans l'intégrase impactent le niveau d'intégration du virus. Il serait notamment intéressant de savoir si la capacité répllicative réduite de l'insertion GIRGK est due à une moindre intégration du virus.

Enfin, devant ces premiers résultats sur l'intégrase du VIH-2, nous avons poursuivi une collaboration avec l'équipe du Dr O. Delelis à l'ENS Cachan afin de mener des études biochimiques sur l'activité enzymatique de l'intégrase du VIH-2. Ces études ont pour but de répondre à différentes questions. Tout d'abord, nous voudrions comparer l'activité de l'intégrase du VIH-2 à celle du VIH-1, en se servant de souches de référence. Ensuite, il faudrait étudier les différences éventuelles entre les intégrases sur les activités enzymatiques, selon leur longueur en acides aminés et selon la présence ou non d'insertions. Enfin, des expériences de purification de l'intégrase du VIH-2 seront tentées. En effet, aucune intégrase

entière, du VIH-1 ou du VIH-2, n'a été cristallisée à ce jour. Les techniques de modélisation des intégrases du VIH se basent sur les structures cristallisées d'intégrase avec 2 domaines (NTD et CCD, ou bien CCD et CTD). Cela limite les connaissances sur le fonctionnement exact de cette enzyme, ainsi que la qualité des prédictions sur l'impact des mutations sur la structure de l'intégrase.

Une dernière piste de travail repose sur l'étude des sites d'intégration du VIH-2 dans le génome humain, sur lesquels nous ne disposons pas de données en dehors d'une étude réalisée sur des infections *in vitro* (MacNeil et al., 2006). Il a été récemment prouvé que des mutations aux codons 119 et 231 dans l'intégrase du VIH-1 modifiaient les sites d'intégration du génome proviral (Demeulemeester et al., 2014). Il serait intéressant de déterminer les sites d'intégration du VIH-2, dans un modèle cellulaire puis, si possible, dans des lymphocytes de patients, à l'aide d'une technique de capture des génomes proviraux suivie d'une technique de séquençage haut débit.

En parallèle de ces travaux, observant ces insertions dans le gène de l'intégrase du VIH-2, nous avons colligé les données sur les séquences d'intégrase VIH-1, à l'aide des laboratoires de virologie français rassemblés à l'AC43 de l'ANRS. Nous avons d'ores et déjà identifié des insertions de taille très variable dans le gène de l'intégrase chez des PVVIH-1, à des positions différentes du VIH-2. L'impact de ces insertions sur la capacité répliquative du virus et sur la sensibilité aux ARV reste à déterminer. Néanmoins, il semble probable que l'insertion en tant que mécanisme de résistance, si elle existe, soit un mécanisme rare pour le VIH-1.

Concernant les expériences réalisées sur la région LTR, nos futures expériences devront viser à confirmer ces premiers résultats. Il serait intéressant d'introduire ces mutations dans la région LTR du plasmide pROD9, d'infecter différentes lignées cellulaires avec les virus mutants générés et d'observer si ces mutations entraînent des différences dans la réplication virale et/ou dans la propagation de l'infection aux cellules non infectées. Enfin, l'activité transcriptionnelle pourrait être évaluée à l'aide de techniques de quantification des transcrits viraux, dans les CSMP des patients infectés.

Afin de mieux comprendre les mécanismes immunologiques et virologiques permettant le contrôle de l'infection, il serait également important d'étudier les réponses immunologiques, ainsi que d'isoler les virus et de quantifier les différents réservoirs, au cours de la primo-infection. Malheureusement, les infections par le VIH-2 sont souvent détectées tardivement et

les cellules immunitaires du patient sont rarement conservées. Une surveillance accrue doit être maintenue pour identifier ces rares primo-infections.

En l'absence de données chez l'Homme, des collaborations avec des chercheurs de centres en primatologie pourraient être développées afin d'étudier la dynamique de réplication du VIH-2 lors de primo-infection chez le modèle primate. Cela permettrait notamment d'explorer les réservoirs profonds, difficilement accessibles chez l'Homme, et sur lesquels les données sont limitées. En effet, certains patients infectés par VIH-2 présentent un déclin de leur nombre de lymphocytes T CD4+, bien que leur charge virale plasmatique reste indétectable, ainsi l'étude de ces réservoirs profonds pourrait notamment permettre d'étudier la réplication virale dans ces réservoirs et d'élucider le mécanisme à l'origine de cette déplétion des lymphocytes T CD4+.

En conclusion, la physiopathologie du VIH-2 est encore mal comprise, et nécessite des recherches pluridisciplinaires associant des acteurs immunologiques, virologiques, cliniques, pharmacologiques et des chercheurs fondamentaux.

## Bibliographie

---

Adjé-Touré, C.A., Cheingsong, R., Garcia-Lerma, J.G., Eholié, S., Borget, M.-Y., Bouchez, J.-M., Otten, R.A., Maurice, C., Sassan-Morokro, M., Ekpini, R.E., et al. (2003). Antiretroviral therapy in HIV-2-infected patients: changes in plasma viral load, CD4+ cell counts, and drug resistance profiles of patients treated in Abidjan, Côte d'Ivoire. *AIDS* 17, S49–S54.

Adjorlolo-Johnson, G., De Cock, K.M., Ekpini, E., Vetter, K.M., Sibailly, T., Brattegaard, K., Yavo, D., Doorly, R., Whitaker, J.P., Kestens, L., et al. (1994). Prospective comparison of mother-to-child transmission of HIV-1 and HIV-2 in Abidjan, Ivory Coast. *JAMA* 272, 462–466.

Alatrakchi, N., Damond, F., Matheron, S., Beretta-Tempelhoff, S., Campa, P., Carcelain, G., Brun-Vezinet, F., Autran, B., and French HIV-2 study group (2006). Proliferative, IFN $\gamma$  and IL-2-producing T-cell responses to HIV-2 in untreated HIV-2 infection. *AIDS* 20, 29–34.

Albert, J., Abrahamsson, B., Nagy, K., Aurelius, E., Gaines, H., Nyström, G., and Fenyö, E.M. (1990). Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS* 4, 107–112.

Alteri, C., Barbaliscia, S., Scutari, R., Bertoli, A., Fedele, V., Carta, S., Pollicita, M., Montano, M., Maffongelli, G., Andreoni, M., et al. (2015). High LTR genetic variability affects HIV-DNA levels in patients on suppressive HAART. International HIV Drug Resistance Workshop Poster #31.

Andrews, C. (2016). Evaluation of resistance to cabotegravir long-acting (CAB LA) in SIVmac251-infected macaques. HIV Research for Prevention (HIVR4P) Abstract OA03.04.

Anstett, K., Fusco, R., Cutillas, V., Mesplède, T., and Wainberg, M.A. (2015). Dolutegravir-Selected HIV-1 Containing the N155H and R263K Resistance Substitutions Does Not Acquire Additional Compensatory Mutations under Drug Pressure That Lead to Higher-Level Resistance and Increased Replicative Capacity. *J Virol* 89, 10482–10488.

Apetrei, C., Kaur, A., Lerche, N.W., Metzger, M., Pandrea, I., Hardcastle, J., Falkenstein, S., Bohm, R., Koehler, J., Traina-Dorge, V., et al. (2005). Molecular Epidemiology of Simian Immunodeficiency Virus SIVsm in U.S. Primate Centers Unravels the Origin of SIVmac and SIVstm. *J Virol* 79, 8991–9005.

Arendrup, M., Nielsen, C., Hansen, J.E., Pedersen, C., Mathiesen, L., and Nielsen, J.O. (1992). Autologous HIV-1 neutralizing antibodies: emergence of neutralization-resistant escape virus and subsequent development of escape virus neutralizing antibodies. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 5, 303–307.

Arya, S.K., and Mohr, J.R. (1994). Conditional regulatory elements of human immunodeficiency virus type 2 long terminal repeat. *J. Gen. Virol.* 75, 2253–2260.

- Ba, S., Raugi, D.N., Smith, R.A., Sall, F., Faye, K., Hawes, S.E., Sow, P.S., Seydi, M., Gottlieb, G.S., and University of Washington–Dakar HIV-2 Study Group (2018). A Trial of a Single Tablet Regimen of Elvitegravir, Cobicistat, Emtricitabine, and Tenofovir Disoproxil Fumarate for the Initial Treatment of HIV-2 Infection in a Resource-Limited Setting: 48 Week Results from Senegal, West Africa. *Clin Infect Dis* 67, 1588-1594.
- Ballandras-Colas, A., Brown, M., Cook, N.J., Dewdney, T.G., Demeler, B., Cherepanov, P., Lyumkis, D., and Engelman, A.N. (2016). Cryo-EM reveals a novel octameric integrase structure for betaretroviral intasome function. *Nature* 530, 358–361.
- Barouch, D.H., Ghneim, K., Bosche, W.J., Li, Y., Berkemeier, B., Hull, M., Bhattacharyya, S., Cameron, M., Liu, J., Smith, K., et al. (2016). Rapid Inflammasome Activation following Mucosal SIV Infection of Rhesus Monkeys. *Cell* 165, 656–667.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868–871.
- Benard, A., van Sighem, A., Taieb, A., Valadas, E., Ruelle, J., Soriano, V., Calmy, A., Balotta, C., Damond, F., Brun-Vézinet, F., et al. (2011). Immunovirological Response to Triple Nucleotide Reverse-Transcriptase Inhibitors and Ritonavir-Boosted Protease Inhibitors in Treatment-Naive HIV-2–Infected Patients: The ACHIEV2E Collaboration Study Group. *Clin Infect Dis* 52, 1257–1266.
- Benson, C.A., Deeks, S.G., Brun, S.C., Gulick, R.M., Eron, J.J., Kessler, H.A., Murphy, R.L., Hicks, C., King, M., Wheeler, D., et al. (2002). Safety and Antiviral Activity at 48 Weeks of Lopinavir/Ritonavir plus Nevirapine and 2 Nucleoside Reverse-Transcriptase Inhibitors in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Protease Inhibitor-Experienced Patients. *J Infect Dis* 185, 599–607.
- Bertine, M., Charpentier, C., Visseaux, B., Storto, A., Collin, G., Larrouy, L., Damond, F., Matheron, S., Brun-Vézinet, F., Descamps, D., et al. (2015). High level of APOBEC3F/3G editing in HIV-2 DNA vif and pol sequences from antiretroviral-naive patients. *AIDS* 29, 779–784.
- Bertine, M., Gueudin, M., Mélard, A., Damond, F., Descamps, D., Matheron, S., Collin, F., Rouzioux, C., Plantier, J.-C., and Avettand-Fenoel, V. (2017). New Highly Sensitive Real-Time PCR Assay for HIV-2 Group A and Group B DNA Quantification. *J. Clin. Microbiol.* 55, 2850–2857.
- Besnier, J.M., Barin, F., Baillou, A., Liard, F., Choutet, P., and Goudeau, A. (1990). Symptomatic HIV-2 primary infection. *Lancet* 335, 798.
- Blaak, H., Boers, P.H.M., Gruters, R.A., Schuitemaker, H., van der Ende, M.E., and Osterhaus, A.D.M.E. (2005). CCR5, GPR15, and CXCR6 Are Major Coreceptors of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Variants Isolated from Individuals with and without Plasma Viremia. *J Virol* 79, 1686–1700.
- Boyer, P.L., Sarafianos, S.G., Clark, P.K., Arnold, E., and Hughes, S.H. (2006). Why Do HIV-1 and HIV-2 Use Different Pathways to Develop AZT Resistance? *PLoS Pathog* 2.

- Brady, T., Agosto, L.M., Malani, N., Berry, C.C., O'Doherty, U., and Bushman, F. (2009). HIV integration site distributions in resting and activated CD4<sup>+</sup> T cells infected in culture. *AIDS* 23, 1461–1471.
- Brass, A.L., Dykxhoorn, D.M., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., Xavier, R.J., Lieberman, J., and Elledge, S.J. (2008). Identification of Host Proteins Required for HIV Infection Through a Functional Genomic Screen. *319*, 7.
- Bruner, K.M., Hosmane, N.N., and Siliciano, R.F. (2015). Towards an HIV-1 cure: measuring the latent reservoir. *Trends Microbiol* 23, 192–203.
- Bruner, K.M., Murray, A.J., Pollack, R.A., Soliman, M.G., Laskey, S.B., Capoferri, A.A., Lai, J., Strain, M.C., Lada, S.M., Hoh, R., et al. (2016). Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat Med* 22, 1043–1049.
- Bruner, K.M., Wang, Z., Simonetti, F.R., Bender, A.M., Kwon, K.J., Sengupta, S., Fray, E.J., Beg, S.A., Antar, A.A.R., Jenike, K.M., et al. (2019). A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses. *Nature* 566, 120–125.
- Brun-Vézinet, F., Ingrand, D., Deforges, L., Gochi, K., Ferchal, F., Schmitt, M.P., Jung, M., Masquelier, B., Aubert, J., and Buffet-Janvresse, C. (1992). HIV-1 sensitivity to zidovudine: a consensus culture technique validated by genotypic analysis of the reverse transcriptase. *J. Virol. Methods* 37, 177–188.
- Burgard, M., Jasseron, C., Matheron, S., Damond, F., Hamrene, K., Blanche, S., Faye, A., Rouzioux, C., Warszawski, J., Mandelbro, L., et al. (2010). Mother-to-child transmission of HIV-2 infection from 1986 to 2007 in the ANRS French Perinatal Cohort EPF-CO1. *Clin. Infect. Dis.* 51, 833–843.
- Butler, S.L., Hansen, M.S.T., and Bushman, F.D. (2001). A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo. *Nat Med* 7, 631–634.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., and Werner, T. (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21, 2933–2942.
- Cazals, N., Le Hingrat, Q., Abraham, B., Da Silva, P., Guindre, L., Goffart, S., Damond, F., Visseaux, B., Charpentier, C., Ranger-Rogez, S., et al. (2018). HIV-2 Primary Infection in a French 69-Year-Old Bisexual Man. *Open Forum Infect Dis* 5.
- Cazein, F., Brand, D., Brunet, S., Thierry, D., Leclerc, M., Benyelles, L., Couturier, S., Costa, C.D., Barin, F., and Semaille, C. Dépistage du VIH et découvertes de séropositivité, France, 2003-2010. 9.
- Centers for Disease Control (CDC) (1982). A cluster of Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis carinii* pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 31, 305–307.
- Charneau, P., Mirambeau, G., Roux, P., Paulous, S., Buc, H., and Clavel, F. (1994). HIV-1 Reverse Transcription A Termination Step at the Center of the Genome. *Journal of Molecular Biology* 241, 651–662.

- Charpentier, C., Larrouy, L., Collin, G., Damond, F., Matheron, S., Chêne, G., Nie, T., Schinazi, R., Brun-vézinet, F., and Descamps, D. (2010). In-vitro phenotypic susceptibility of Hiv-2 clinical isolates to the integrase inhibitor S/gsk1349572. *AIDS* 24, 2753–2755.
- Charpentier, C., Roquebert, B., Delelis, O., Larrouy, L., Matheron, S., Tubiana, R., Karmochkine, M., Duval, X., Chêne, G., Storto, A., et al. (2011). Hot Spots of Integrase Genotypic Changes Leading to HIV-2 Resistance to Raltegravir. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 1293–1295.
- Charpentier, C., Eholié, S., Anglaret, X., Bertine, M., Rouzioux, C., Avettand-Fenoël, V., Messou, E., Minga, A., Damond, F., Plantier, J.-C., et al. (2014). Genotypic resistance profiles of HIV-2-treated patients in West Africa. *AIDS* 28, 1161–1169.
- Chauveau, L., Puigdomenech, I., Ayinde, D., Roesch, F., Porrot, F., Bruni, D., Visseaux, B., Descamps, D., and Schwartz, O. (2015). HIV-2 infects resting CD4+ T cells but not monocyte-derived dendritic cells. *Retrovirology* 12, 2.
- Cherepanov, P., Ambrosio, A.L.B., Rahman, S., Ellenberger, T., and Engelman, A. (2005). Structural basis for the recognition between HIV-1 integrase and transcriptional coactivator p75. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17308–17313.
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F.A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M.-R., Ghattas, G., Brenchley, J.M., et al. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* 15, 893–900.
- Chougui, G., Munir-Matloob, S., Matkovic, R., Martin, M.M., Morel, M., Lahouassa, H., Leduc, M., Ramirez, B.C., Etienne, L., and Margottin-Goguet, F. (2018). HIV-2/SIV viral protein X counteracts HUSH repressor complex. *Nature Microbiology* 3, 891.
- Christ, F., Voet, A., Marchand, A., Nicolet, S., Desimmie, B.A., Marchand, D., Bardiot, D., Van der Veken, N.J., Van Remoortel, B., Strelkov, S.V., et al. (2010). Rational design of small-molecule inhibitors of the LEDGF/p75-integrase interaction and HIV replication. *Nat Chem Biol* 6, 442–448.
- Christiansen, C.B., Jessen, T.E., Nielsen, C., and Staun-Ohen, P. (1996). False Negative Anti-HIV-1/HIV-2 ELISAs in Acute HIV-2 Infection. *Vox Sanguinis* 70, 144–147.
- Chun, T.-W., Stuyver, L., Mizell, S.B., Ehler, L.A., Mican, J.A.M., Baseler, M., Lloyd, A.L., Nowak, M.A., and Fauci, A.S. (1997). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13193–13197.
- Chun, T.-W., Engel, D., Berrey, M.M., Shea, T., Corey, L., and Fauci, A.S. (1998). Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4+ T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8869–8873.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M., Santos-Ferreira, M., Laurent, A., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., et al. (1986a). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343–346.

- Clavel, F., Guyader, M., Guétard, D., Sallé, M., Montagnier, L., and Alizon, M. (1986b). Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* *324*, 691–695.
- Dalgleish, A.G., Beverley, P.C.L., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., and Weiss, R.A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* *312*, 763–767.
- Damond, F., Gueudin, M., Pueyo, S., Farfara, I., Robertson, D.L., Descamps, D., Chêne, G., Matheron, S., Campa, P., Brun-Vézinet, F., et al. (2002). Plasma RNA Viral Load in Human Immunodeficiency Virus Type 2 Subtype A and Subtype B Infections. *Journal of Clinical Microbiology* *40*, 3654.
- Damond, F., Collin, G., Matheron, S., Peytavin, G., Campa, P., Delarue, S., Taieb, A., Bénard, A., Chêne, G., Brun-Vézinet, F., et al. (2005). Letter. In vitro phenotypic susceptibility to nucleoside reverse transcriptase inhibitors of HIV-2 isolates with the Q151M mutation in the reverse transcriptase gene. *Antivir. Ther. (Lond.)* *10*, 861–865.
- Davenport, M.P., Khoury, D.S., Cromer, D., Lewin, S.R., Kelleher, A.D., and Kent, S.J. (2019). Functional cure of HIV: the scale of the challenge. *Nat Rev Immunol* *19*, 45–54.
- De Clercq, E., and Li, G. (2016). Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin. Microbiol. Rev.* *29*, 695–747.
- De Leys, R., Vanderborght, B., Vanden Haesevelde, M., Heyndrickx, L., van Geel, A., Wauters, C., Bernaerts, R., Saman, E., Nijs, P., and Willems, B. (1990). Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J Virol* *64*, 1207–1216.
- Delelis, O., Carayon, K., Saïb, A., Deprez, E., and Mouscadet, J.-F. (2008). Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology* *5*, 114.
- Demeulemeester, J., Vets, S., Schrijvers, R., Madlala, P., De Maeyer, M., De Rijck, J., Ndung'u, T., Debyser, Z., and Gijssbers, R. (2014). HIV-1 Integrase Variants Retarget Viral Integration and Are Associated with Disease Progression in a Chronic Infection Cohort. *Cell Host & Microbe* *16*, 651–662.
- Desbois, D., Roquebert, B., Peytavin, G., Damond, F., Collin, G., Bénard, A., Campa, P., Matheron, S., Chêne, G., Brun-Vézinet, F., et al. (2008). In Vitro Phenotypic Susceptibility of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Clinical Isolates to Protease Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* *52*, 1545–1548.
- Descamps, D., Collin, G., Letourneur, F., Apetrei, C., Damond, F., Loussert-Ajaka, I., Simon, F., Saragosti, S., and Brun-Vézinet, F. (1997). Susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 group O isolates to antiretroviral agents: in vitro phenotypic and genotypic analyses. *J Virol* *71*, 8893–8898.
- Descamps, D., Damond, F., Matheron, S., Collin, G., Campa, P., Delarue, S., Pueyo, S., Chêne, G., Brun-Vézinet, F., and French ANRS HIV-2 Cohort Study Group (2004). High frequency of selection of K65R and Q151M mutations in HIV-2 infected patients receiving nucleoside reverse transcriptase inhibitors containing regimen. *J. Med. Virol.* *74*, 197–201.

- Descamps, D., Peytavin, G., Visseaux, B., Tubiana, R., Damond, F., Campa, P., Charpentier, C., Khuong-Josses, M.-A., Duvivier, C., Karmochkine, M., et al. (2015). Dolutegravir in HIV-2-Infected Patients With Resistant Virus to First-line Integrase Inhibitors From the French Named Patient Program. *Clin Infect Dis* 60, 1521–1527.
- Deval, J., Selmi, B., Boretto, J., Egloff, M.P., Guerreiro, C., Sarfati, S., and Canard, B. (2002). The Molecular Mechanism of Multidrug Resistance by the Q151M Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase and Its Suppression Using  $\alpha$ -Boranophosphate Nucleotide Analogues. *J. Biol. Chem.* 277, 42097–42104.
- Easterbrook, P.J., Smith, M., Mullen, J., O’Shea, S., Chrystie, I., Ruiter, A. de, Tatt, I.D., Geretti, A.M., and Zuckerman, M. (2010). Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy. *Journal of the International AIDS Society* 13, 4.
- Eijkelenboom, A.P.A.M., van den Ent, F.M.I., Vos, A., Doreleijers, J.F., Hård, K., Tullius, T.D., Plasterk, R.H.A., Kaptein, R., and Boelens, R. (1997). The solution structure of the amino-terminal HHCC domain of HIV-2 integrase: a three-helix bundle stabilized by zinc. *Current Biology* 7, 739–746.
- Ekouevi, D.K., Tchounga, B.K., Coffie, P.A., Tegbe, J., Anderson, A.M., Gottlieb, G.S., Vitoria, M., Dabis, F., and Eholie, S.P. (2014). Antiretroviral therapy response among HIV-2 infected patients: a systematic review. *BMC Infect Dis* 14.
- Emu, B., Fessel, J., Schrader, S., Kumar, P., Richmond, G., Win, S., Weinheimer, S., Marsolais, C., and Lewis, S. (2018). Phase 3 Study of Ibalizumab for Multidrug-Resistant HIV-1. *New England Journal of Medicine* 379, 645–654.
- Esbjörnsson, J., Månsson, F., Kvist, A., da Silva, Z.J., Andersson, S., Fenyö, E.M., Isberg, P.-E., Biague, A.J., Lindman, J., Palm, A.A., et al. (2018). Long-term follow-up of HIV-2-related AIDS and mortality in Guinea-Bissau: a prospective open cohort study. *The Lancet HIV*.
- Espeseth, A.S., Felock, P., Wolfe, A., Witmer, M., Grobler, J., Anthony, N., Egbertson, M., Melamed, J.Y., Young, S., Hamill, T., et al. (2000). 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* 97, 11244–11249.
- Faria, N.R., Hodges-Mameletzis, I., Silva, J.C., Rodés, B., Erasmus, S., Paolucci, S., Ruelle, J., Pieniasek, D., Taveira, N., Treviño, A., et al. (2012). Phylogeographical footprint of colonial history in the global dispersal of human immunodeficiency virus type 2 group A. *J. Gen. Virol.* 93, 889–899.
- Farré, D., Roset, R., Huerta, M., Adsuara, J.E., Roselló, L., Albà, M.M., and Messeguer, X. (2003). Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res* 31, 3651–3653.
- Feng, L., Larue, R.C., Slaughter, A., Kessl, J.J., and Kvaratskhelia, M. (2015). HIV-1 Integrase Multimerization as a Therapeutic Target. *Curr Top Microbiol Immunol* 389, 93–119.

- Fenwick, C., Amad, M., Bailey, M.D., Bethell, R., Bös, M., Bonneau, P., Cordingley, M., Coulombe, R., Duan, J., Edwards, P., et al. (2014). Preclinical Profile of BI 224436, a Novel HIV-1 Non-Catalytic-Site Integrase Inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* *58*, 3233–3244.
- Finzi, D. (1997). Identification of a Reservoir for HIV-1 in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Science* *278*, 1295–1300.
- Fischl, M.A., Richman, D.D., Grieco, M.H., Gottlieb, M.S., Volberding, P.A., Laskin, O.L., Leedom, J.M., Groopman, J.E., Mildvan, D., Schooley, R.T., et al. (1987). The Efficacy of Azidothymidine (AZT) in the Treatment of Patients with AIDS and AIDS-Related Complex. *New England Journal of Medicine* *317*, 185–191.
- Fourati, S., Charpentier, C., Amiel, C., Morand-Joubert, L., Reigadas, S., Trabaud, M.-A., Delaugerre, C., Nicot, F., Rodallec, A., Maillard, A., et al. (2015). Cross-resistance to elvitegravir and dolutegravir in 502 patients failing on raltegravir: a French national study of raltegravir-experienced HIV-1-infected patients. *J Antimicrob Chemother* *70*, 1507–1512.
- Fraser, C., Lythgoe, K., Leventhal, G.E., Shirreff, G., Hollingsworth, T.D., Alizon, S., and Bonhoeffer, S. (2014). Virulence and pathogenesis of HIV-1 infection: an evolutionary perspective. *Science* *343*, 1243727.
- Freed, E.O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews Microbiology* *13*, 484–496.
- Gallant, J.E., Thompson, M., DeJesus, E., Voskuhl, G.W., Wei, X., Zhang, H., White, K., Cheng, A., Quirk, E., and Martin, H. (2017). Antiviral Activity, Safety, and Pharmacokinetics of Bictegravir as 10-Day Monotherapy in HIV-1-Infected Adults. *J Acquir Immune Defic Syndr* *75*, 61–66.
- Gao, F., Yue, L., Robertson, D.L., Hill, S.C., Hui, H., Biggar, R.J., Neequaye, A.E., Whelan, T.M., Ho, D.D., and Shaw, G.M. (1994). Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol* *68*, 7433–7447.
- Gathe, J., Ive, P., Wood, R., Schürmann, D., Bellos, N., DeJesus, E., Gladysz, A., Garris, C., and Yeo, J. (2004). SOLO: 48-week efficacy and safety comparison of once-daily fosamprenavir /ritonavir versus twice-daily nelfinavir in naive HIV-1-infected patients. *Aids* *18*, 1529–1537.
- Gautier, D., Beq, S., Cortesão, C.S., Sousa, A.E., and Cheynier, R. (2007). Efficient thymopoiesis contributes to the maintenance of peripheral CD4 T cells during chronic human immunodeficiency virus type 2 infection. *J. Virol.* *81*, 12685–12688.
- Geijtenbeek, T.B.H., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C.F., Middel, J., Cornelissen, I.L.M.H.A., Nottet, H.S.L.M., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., et al. (2000). DC-SIGN, a Dendritic Cell-Specific HIV-1-Binding Protein that Enhances trans-Infection of T Cells. *Cell* *100*, 587–597.
- Giorgi, J.V., Hultin, L.E., McKeating, J.A., Johnson, T.D., Owens, B., Jacobson, L.P., Shih, R., Lewis, J., Wiley, D.J., Phair, J.P., et al. (1999). Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte

activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J. Infect. Dis.* 179, 859–870.

Gottlieb, G.S., Sow, P.S., Hawes, S.E., Ndoeye, I., Redman, M., Coll-Seck, A.M., Faye-Niang, M.A., Diop, A., Kuypers, J.M., Critchlow, C.W., et al. (2002). Equal plasma viral loads predict a similar rate of CD4+ T cell decline in human immunodeficiency virus (HIV) type 1- and HIV-2-infected individuals from Senegal, West Africa. *The Journal of Infectious Diseases* 185, 905–914.

Gottlieb, G.S., Hawes, S.E., Kiviat, N.B., and Sow, P.S. (2008a). Differences in proviral DNA load between HIV-1-infected and HIV-2-infected patients. *AIDS* 22, 1379–1380.

Gottlieb, G.S., Eholié, S., Nkengasong, J.N., Jallow, S., Rowland-Jones, S., Whittle, H.C., and Sow, P.S.L. (2008b). A call for randomized controlled trials of antiretroviral therapy for HIV-2 infection in West Africa. *AIDS* 22, 2069–2072.

Gottlieb, G.S., Badiane, N.M.D., Hawes, S.E., Fortes, L., Toure, M., Ndour, C.T., Starling, A.K., Traore, F., Sall, F., Wong, K.G., et al. (2009). Emergence of Multiclass Drug-Resistance in HIV-2 in Antiretroviral-Treated Individuals in Senegal: Implications for HIV-2 Treatment in Resource-Limited West Africa. *Clin Infect Dis* 48, 476–483.

Gottlieb, G.S., Raugi, D.N., and Smith, R.A. (2018). 90-90-90 for HIV-2? Ending the HIV-2 epidemic by enhancing care and clinical management of patients infected with HIV-2. *The Lancet HIV* 5, e390–e399.

Gottlieb, M., Schanker, H., Fan, P., Saxon, A., and Weisman, J. (1981a). Pneumocystis pneumonia -- Los Angeles. 1981. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 45, 729–733.

Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., and Saxon, A. (1981b). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 305, 1425–1431.

Grabar, S., Selinger-Leneman, H., Abgrall, S., Pialoux, G., Weiss, L., and Costagliola, D. (2009). Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV. *AIDS* 23, 1163–1169.

Grassly, N.C., Xiang, Z., Ariyoshi, K., Aaby, P., Jensen, H., Schim van der Loeff, M., Dias, F., Whittle, H., and Breuer, J. (1998). Mortality among Human Immunodeficiency Virus Type 2-Positive Villagers in Rural Guinea-Bissau Is Correlated with Viral Genotype. *J Virol* 72, 7895–7899.

Gu, Z., Arts, E.J., Parniak, M.A., and Wainberg, M.A. (1995). Mutated K65R recombinant reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 shows diminished chain termination in the presence of 2',3'-dideoxycytidine 5'-triphosphate and other drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2760–2764.

Gueudin, M., Damond, F., Braun, J., Taïeb, A., Lemée, V., Plantier, J.-C., Chêne, G., Matheron, S., Brun-Vézinet, F., and Simon, F. (2008). Differences in proviral DNA load between HIV-1- and HIV-2-infected patients. *AIDS* 22, 211–215.

- Gupta, R.K., Abdul-Jawad, S., McCoy, L.E., Mok, H.P., Peppas, D., Salgado, M., Martinez-Picado, J., Nijhuis, M., Wensing, A.M.J., Lee, H., et al. (2019). HIV-1 remission following CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature* 568, 244–248.
- Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montagnier, L., and Alizon, M. (1987). Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 326, 662–669.
- Hammer, S.M., Squires, K.E., Hughes, M.D., Grimes, J.M., Demeter, L.M., Currier, J.S., Eron, J.J., Feinberg, J.E., Balfour, H.H., Deyton, L.R., et al. (1997). A Controlled Trial of Two Nucleoside Analogues plus Indinavir in Persons with Human Immunodeficiency Virus Infection and CD4 Cell Counts of 200 per Cubic Millimeter or Less. *N Engl J Med* 337, 725–733.
- Hannibal, M.C., Markovitz, D.M., and Nabel, G.J. (1994). Multiple cis-acting elements in the human immunodeficiency virus type 2 enhancer mediate the response to T-cell receptor stimulation by antigen in a T-cell hybridoma line. *Blood* 83, 1839–1846.
- Hare, S., Shun, M.-C., Gupta, S.S., Valkov, E., Engelman, A., and Cherepanov, P. (2009). A Novel Co-Crystal Structure Affords the Design of Gain-of-Function Lentiviral Integrase Mutants in the Presence of Modified PSIP1/LEDGF/p75. *PLOS Pathogens* 5, e1000259.
- Hare, S., Gupta, S.S., Valkov, E., Engelman, A., and Cherepanov, P. (2010). Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. *Nature* 464, 232–236.
- Harris, R.S., and Liddament, M.T. (2004). Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol* 4, 868–877.
- Henrich, T.J., Hanhauser, E., Hu, Z., Stellbrink, H.-J., Noah, C., Martin, J.N., Deeks, S.G., Kuritzkes, D.R., and Pereyra, F. (2015). Viremic control and viral coreceptor usage in two HIV-1-infected persons homozygous for CCR5  $\Delta$ 32. *AIDS* 29, 867–876.
- Henrickson, R., Osborn, K., Madden, D., Anderson, J., Maul, D., Sever, J., Ellingsworth, L., Lowenstine, L., and Gardner, M. (1983). Epidemic of acquired immunodeficiency in rhesus monkeys. *The Lancet* 321, 388–390.
- Hiener, B., Horsburgh, B.A., Eden, J.-S., Barton, K., Schlub, T.E., Lee, E., von Stockenström, S., Odevall, L., Milush, J.M., Liegler, T., et al. (2017). Identification of Genetically Intact HIV-1 Proviruses in Specific CD4<sup>+</sup> T Cells from Effectively Treated Participants. *Cell Rep* 21, 813–822.
- Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H., and Johnson, P.R. (1989). An African primate lentivirus (SIVsmc) closely related to HIV-2. *Nature* 339, 389–392.
- Ho, Y.-C., Shan, L., Hosmane, N.N., Wang, J., Laskey, S.B., Rosenbloom, D.I.S., Lai, J., Blankson, J.N., Siliciano, J.D., and Siliciano, R.F. (2013). Replication-competent non-induced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell* 155, 540–551.
- Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S.K., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., Florens, L., Washburn, M.P., and Skowronski, J. (2011). Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* 474, 658–661.

- Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G., and Wain-Hobson, S. (1990). Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* *345*, 356–359.
- Hütter, G., Ganepola, S., Schneider, T., Blau, O., and Thiel, E. (2009). Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine* *360*, 692–698.
- Ibe, S., Yokomaku, Y., Shiino, T., Tanaka, R., Hattori, J., Fujisaki, S., Iwatani, Y., Mamiya, N., Utsumi, M., Kato, S., et al. (2010). HIV-2 CRF01\_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *54*, 241–247.
- Iglesias-Ussel, M.D., and Romerio, F. (2011). HIV reservoirs: the new frontier. *AIDS Rev* *13*, 13–29.
- Invernizzi, C.F., Coutsinos, D., Oliveira, M., Moisi, D., Brenner, B.G., and Wainberg, M.A. (2009). Signature nucleotide polymorphisms at positions 64 and 65 in reverse transcriptase favor the selection of the K65R resistance mutation in HIV-1 subtype C. *J. Infect. Dis.* *200*, 1202–1206.
- Jia, B., Serra-Moreno, R., Neidermyer, W., Rahmberg, A., Mackey, J., Fofana, I.B., Johnson, W.E., Westmoreland, S., and Evans, D.T. (2009). Species-Specific Activity of SIV Nef and HIV-1 Vpu in Overcoming Restriction by Tetherin/BST2. *PLoS Pathog* *5*.
- Kanki, P.J., Travers, K.U., MBoup, S., Hsieh, C.C., Marlink, R.G., Gueye-NDiaye, A., Siby, T., Thior, I., Hernandez-Avila, M., and Sankalé, J.L. (1994). Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet* *343*, 943–946.
- Kanki, P.J., Hamel, D.J., Sankalé, J.-L., Hsieh, C., Thior, I., Barin, F., Woodcock, S.A., Guèye-Ndiaye, A., Zhang, E., Montano, M., et al. (1999). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtypes Differ in Disease Progression. *J Infect Dis* *179*, 68–73.
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.C., and Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* *312*, 767–768.
- König, R., Zhou, Y., Elleder, D., Diamond, T.L., Bonamy, G.M.C., Irelan, J.T., Chiang, C., Tu, B.P., De Jesus, P.D., Lilley, C.E., et al. (2008). Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early stage HIV-1 replication. *Cell* *135*, 49–60.
- Krebs, F.C., Hogan, T.H., Quiterio, S., Gartner, S., and Wigdahl, B. (2001). Lentiviral LTR-directed Expression, Sequence Variation, and Disease Pathogenesis. *HIV Sequence Compendium* 29–70.
- Krebs, R., Immendörfer, U., Thrall, S.H., Wöhrl, B.M., and Goody, R.S. (1997). Single-Step Kinetics of HIV-1 Reverse Transcriptase Mutants Responsible for Virus Resistance to Nucleoside Inhibitors Zidovudine and 3-TC †. *Biochemistry* *36*, 10292–10300.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* *33*, 1870–1874.

- Laguette, N., Brégnard, C., Benichou, S., and Basmaciogullari, S. (2010). Human immunodeficiency virus (HIV) type-1, HIV-2 and simian immunodeficiency virus Nef proteins. *Mol. Aspects Med.* *31*, 418–433.
- Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., and Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* *474*, 654–657.
- Lahaye, X., Satoh, T., Gentili, M., Cerboni, S., Conrad, C., Hurbain, I., El Marjou, A., Lacabaratz, C., Lelièvre, J.-D., and Manel, N. (2013). The Capsids of HIV-1 and HIV-2 Determine Immune Detection of the Viral cDNA by the Innate Sensor cGAS in Dendritic Cells. *Immunity* *39*, 1132–1142.
- Lahaye, X., Gentili, M., Silvin, A., Conrad, C., Picard, L., Jouve, M., Zueva, E., Maurin, M., Nadalin, F., Knott, G.J., et al. (2018). NONO Detects the Nuclear HIV Capsid to Promote cGAS-Mediated Innate Immune Activation. *Cell* *175*, 488-501.e22.
- Lataillade, M., Chiarella, J., and Kozal, M.J. (2007). Natural polymorphism of the HIV-1 integrase gene and mutations associated with integrase inhibitor resistance. *Antivir. Ther. (Lond.)* *12*, 563–570.
- Le Hingrat, Q., Perrier, M., Collin, G., Drumard, S., Storto, A., Bertine, M., Larrouy, L., Matheron, S., Damond, F., Charpentier, C., et al. (2018a). Efficiency of HIV-2 cultures from clinical isolates is enhanced after purification by anti-CD44 microbeads. *J. Virol. Methods*.
- Le Hingrat, Q., Collin, G., Lê, M., Peytavin, G., Visseaux, B., Bertine, M., Tubiana, R., Karmochkine, M., Valin, N., Collin, F., et al. (2018b). A new mechanism of resistance of HIV-2 to integrase inhibitors: a 5 amino-acids insertion in the integrase C-terminal domain. *Clin. Infect. Dis.*
- Le Tortorec, A., and Neil, S.J.D. (2009). Antagonism to and Intracellular Sequestration of Human Tetherin by the Human Immunodeficiency Virus Type 2 Envelope Glycoprotein. *J Virol* *83*, 11966–11978.
- Leiden, J.M., Wang, C.Y., Petryniak, B., Markovitz, D.M., Nabel, G.J., and Thompson, C.B. (1992). A novel Ets-related transcription factor, Elf-1, binds to human immunodeficiency virus type 2 regulatory elements that are required for inducible trans activation in T cells. *J Virol* *66*, 5890–5897.
- Lemey, P., Pybus, O.G., Wang, B., Saksena, N.K., Salemi, M., and Vandamme, A.-M. (2003). Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 6588–6592.
- Li, G., Piampongsant, S., Faria, N.R., Voet, A., Pineda-Peña, A.-C., Khouri, R., Lemey, P., Vandamme, A.-M., and Theys, K. (2015). An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective. *Retrovirology* *12*, 18.
- Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., MacDonald, M.E., Stuhlmann, H., Koup, R.A., and Landau, N.R. (1996). Homozygous Defect in HIV-1 Coreceptor Accounts for Resistance of Some Multiply-Exposed Individuals to HIV-1 Infection. *Cell* *86*, 367–377.

- Lopes, A.R., Jaye, A., Dorrell, L., Sabally, S., Alabi, A., Jones, N.A., Flower, D.R., De Groot, A., Newton, P., Lascar, R.M., et al. (2003). Greater CD8+ TCR heterogeneity and functional flexibility in HIV-2 compared to HIV-1 infection. *J. Immunol.* *171*, 307–316.
- van Lunzen, J., Maggiolo, F., Arribas, J.R., Rakhmanova, A., Yeni, P., Young, B., Rockstroh, J.K., Almond, S., Song, I., Brothers, C., et al. (2012). Once daily dolutegravir (S/GSK1349572) in combination therapy in antiretroviral-naïve adults with HIV: planned interim 48 week results from SPRING-1, a dose-ranging, randomised, phase 2b trial. *The Lancet Infectious Diseases* *12*, 111–118.
- Lusic, M., and Siliciano, R.F. (2017). Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. *Nature Reviews Microbiology* *15*, 69–82.
- Lutzke, R.A.P., and Plasterk, R.H.A. (1998). Structure-Based Mutational Analysis of the C-Terminal DNA-Binding Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase: Critical Residues for Protein Oligomerization and DNA Binding. *J Virol* *72*, 4841–4848.
- MacNeil, A., Sankalé, J.-L., Meloni, S.T., Sarr, A.D., Mboup, S., and Kanki, P. (2006). Genomic Sites of Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Integration: Similarities to HIV-1 In Vitro and Possible Differences In Vivo. *J Virol* *80*, 7316–7321.
- MacNeil, A., Sarr, A.D., Sankalé, J.-L., Meloni, S.T., Mboup, S., and Kanki, P. (2007). Direct Evidence of Lower Viral Replication Rates In Vivo in Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Infection than in HIV-1 Infection. *J Virol* *81*, 5325–5330.
- Mandelbrot, L., Tubiana, R., Le Chenadec, J., Dollfus, C., Faye, A., Pannier, E., Matheron, S., Khuong, M.-A., Garrat, V., Reliquet, V., et al. (2015). No perinatal HIV-1 transmission from women with effective antiretroviral therapy starting before conception. *Clin. Infect. Dis.* *61*, 1715–1725.
- Manel, N., Hogstad, B., Wang, Y., Levy, D.E., Unutmaz, D., and Littman, D.R. (2010). A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. *Nature* *467*, 214–217.
- Margolis, D.A., Gonzalez-Garcia, J., Stellbrink, H.-J., Eron, J.J., Yazdanpanah, Y., Podzamczak, D., Lutz, T., Angel, J.B., Richmond, G.J., Clotet, B., et al. (2017). Long-acting intramuscular cabotegravir and rilpivirine in adults with HIV-1 infection (LATTE-2): 96-week results of a randomised, open-label, phase 2b, non-inferiority trial. *Lancet* *390*, 1499–1510.
- Markovitz, D.M., Smith, M.J., Hilfinger, J., Hannibal, M.C., Petryniak, B., and Nabel, G.J. (1992). Activation of the human immunodeficiency virus type 2 enhancer is dependent on purine box and kappa B regulatory elements. *J Virol* *66*, 5479–5484.
- Martinson, J.J., Chapman, N.H., Rees, D.C., Liu, Y.-T., and Clegg, J.B. (1997). Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nature Genetics* *16*, 100–103.
- Matheron, S., Courpotin, C., Simon, F., Di Maria, H., Balloul, H., Bartzack, S., Dormont, D., Brun Vezinet, F., Saimot, A.G., and Coulaud, J.P. (1990). Vertical transmission of HIV-2. *Lancet* *335*, 1103–1104.

- Matheron, S., Pueyo, S., Damond, F., Simon, F., Leprêtre, A., Campa, P., Salamon, R., Chêne, G., Brun-Vezinet, F., Group, F.H.-2 C.S., et al. (2003). Factors associated with clinical progression in HIV-2 infected-patients: the French ANRS cohort. *AIDS* 17, 2593–2601.
- Matheron, S., Damond, F., Benard, A., Taieb, A., Campa, P., Peytavin, G., Pueyo, S., Brun-Vezinet, F., Chene, G., and ANRS CO5 HIV2 Cohort Study Group (2006). CD4 cell recovery in treated HIV-2-infected adults is lower than expected: results from the French ANRS CO5 HIV-2 cohort. *AIDS* 20, 459–462.
- Matheron, S., Descamps, D., Gallien, S., Besseghir, A., Sellier, P., Blum, L., Mortier, E., Charpentier, C., Tubiana, R., Damond, F., et al. (2018). First line raltegravir/emtricitabine/tenofovir combination in HIV-2 infection: phase 2 non-comparative trial (ANRS 159 HIV-2). *Clin Infect Dis* 67, 1161–1167.
- Meyer, P.R., Matsuura, S.E., Mian, A.M., So, A.G., and Scott, W.A. (1999). A Mechanism of AZT Resistance: An Increase in Nucleotide-Dependent Primer Unblocking by Mutant HIV-1 Reverse Transcriptase. *Molecular Cell* 4, 35–43.
- Michael, N.L., Chang, G., Loum, L.G., Mascola, J.R., Dondero, D., Birx, D.L., and Sheppard, H.W. (1997). The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature Medicine* 3, 338.
- Miedema, F., Hazenberg, M.D., Tesselaar, K., van Baarle, D., de Boer, R.J., and Borghans, J.A.M. (2013). Immune activation and collateral damage in AIDS pathogenesis. *Front Immunol* 4, 298.
- Mitchell, M., Balakrishnan, M., Brizgys, G., Cal, R., Lansdon, E., Mulato, A., Osier, M., Wang, J., Yu, H., and Sakowicz, R. (2017). Novel Non-Catalytic Site Integrase Inhibitor with Improved Resistance Profile. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections Poster #434.
- Molina, J.-M., Capitant, C., Spire, B., Pialoux, G., Cotte, L., Charreau, I., Tremblay, C., Le Gall, J.-M., Cua, E., Pasquet, A., et al. (2015). On-Demand Preexposure Prophylaxis in Men at High Risk for HIV-1 Infection. *N Engl J Med* 373, 2237–2246.
- Montefiori, D.C., Baba, T.W., Li, A., Bilaska, M., and Ruprecht, R.M. (1996). Neutralizing and infection-enhancing antibody responses do not correlate with the differential pathogenicity of SIVmac239delta3 in adult and infant rhesus monkeys. *J. Immunol.* 157, 5528–5535.
- Morlat, P. (2013). *Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH - Rapport 2013* (Paris: La Documentation française).
- Mörner, A., Björndal, Å., Albert, J., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Inoue, R., Thorstensson, R., Fenyö, E.M., and Björling, E. (1999). Primary Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Isolates, Like HIV-1 Isolates, Frequently Use CCR5 but Show Promiscuity in Coreceptor Usage. *J Virol* 73, 2343–2349.
- Mourez, T., Simon, F., and Plantier, J.-C. (2013). Non-M Variants of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Clin Microbiol Rev* 26, 448–461.

- Munir, S., Thierry, S., Subra, F., Deprez, E., and Delelis, O. (2013). Quantitative analysis of the time-course of viral DNA forms during the HIV-1 life cycle. *Retrovirology* 10, 87.
- Neil, S.J.D., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425–430.
- Nowroozalizadeh, S., Månsson, F., da Silva, Z., Repits, J., Dabo, B., Pereira, C., Biague, A., Albert, J., Nielsen, J., Aaby, P., et al. (2009). Studies on toll-like receptor stimuli responsiveness in HIV-1 and HIV-2 infections. *Cytokine* 46, 325–331.
- Ntemgwa, M.L., Toni, T. d’Aquin, Brenner, B.G., Camacho, R.J., and Wainberg, M.A. (2009). Antiretroviral Drug Resistance in Human Immunodeficiency Virus Type 2. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 3611–3619.
- Onyango, C.O., Leligdowicz, A., Yokoyama, M., Sato, H., Song, H., Nakayama, E.E., Shioda, T., de Silva, T., Townend, J., Jaye, A., et al. (2010). HIV-2 capsids distinguish high and low virus load patients in a West African community cohort. *Vaccine* 28, B60–B67.
- Osborn, K.G., Prahalada, S., Lowenstine, L.J., Gardner, M.B., Maul, D.H., and Henrickson, R.V. (1984). The pathology of an epizootic of acquired immunodeficiency in rhesus macaques. *Am J Pathol* 114, 94–103.
- Owen, S.M., Ellenberger, D., Rayfield, M., Wiktor, S., Michel, P., Grieco, M.H., Gao, F., Hahn, B.H., and Lal, R.B. (1998). Genetically Divergent Strains of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Use Multiple Coreceptors for Viral Entry. *J Virol* 72, 5425–5432.
- Ozkaya Sahin, G., Holmgren, B., da Silva, Z., Nielsen, J., Nowroozalizadeh, S., Esbjörnsson, J., Månsson, F., Andersson, S., Norrgren, H., Aaby, P., et al. (2012). Potent intratype neutralizing activity distinguishes human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) from HIV-1. *J. Virol.* 86, 961–971.
- Pagtakhan, A.S., and Tong-Starksen, S.E. (1997). Interactions between Tat of HIV-2 and transcription factor Sp1. *Virology* 238, 221–230.
- Parekh, B.S., Ou, C.-Y., Fonjungo, P.N., Kalou, M.B., Rottinghaus, E., Puren, A., Alexander, H., Hurlston Cox, M., and Nkengasong, J.N. (2018). Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clinical Microbiology Reviews* 32.
- Pasternak, A.O., Lukashov, V.V., and Berkhout, B. (2013). Cell-associated HIV RNA: a dynamic biomarker of viral persistence. *Retrovirology* 10, 41.
- Piatak, M., Saag, M., Yang, L., Clark, S., Kappes, J., Luk, K., Hahn, B., Shaw, G., and Lifson, J. (1993). High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 259, 1749–1754.
- Pitman, M.C., Lau, J.S.Y., McMahon, J.H., and Lewin, S.R. (2018). Barriers and strategies to achieve a cure for HIV. *Lancet HIV* 5, e317–e328.
- Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D.L., and Simon, F. (2009a). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 15, 871–872.

- Plantier, J.-C., Djemai, M., Lemée, V., Reggiani, A., Leoz, M., Burc, L., Vessière, A., Rousset, D., Poveda, J.-D., Henquell, C., et al. (2009b). Census and Analysis of Persistent False-Negative Results in Serological Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Group O Infections. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 2906.
- Pollard, V.W., and Malim, M.H. (1998). The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 491–532.
- Popper, S.J., Sarr, A.D., Travers, K.U., Guèye-Ndiaye, A., Mboup, S., Essex, M.E., and Kanki, P.J. (1999). Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J. Infect. Dis.* 180, 1116–1121.
- Popper, S.J., Sarr, A.D., Guèye-Ndiaye, A., Mboup, S., Essex, M.E., and Kanki, P.J. (2000). Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production in vivo. *J. Virol.* 74, 1554–1557.
- Qu, D., Li, C., Sang, F., Li, Q., Jiang, Z.-Q., Xu, L.-R., Guo, H.-J., Zhang, C., and Wang, J.-H. (2016). The variances of Sp1 and NF- $\kappa$ B elements correlate with the greater capacity of Chinese HIV-1 B'-LTR for driving gene expression. *Scientific Reports* 6, 34532.
- Raffi, F., Jaeger, H., Quiros-Roldan, E., Albrecht, H., Belonosova, E., Gatell, J.M., Baril, J.-G., Domingo, P., Brennan, C., Almond, S., et al. (2013). Once-daily dolutegravir versus twice-daily raltegravir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection (SPRING-2 study): 96 week results from a randomised, double-blind, non-inferiority trial. *The Lancet Infectious Diseases* 13, 927–935.
- Raugi, D.N., Smith, R.A., Ba, S., Toure, M., Traore, F., Sall, F., Pan, C., Blankenship, L., Montano, A., Olson, J., et al. (2013). Complex Patterns of Protease Inhibitor Resistance among Antiretroviral Treatment-Experienced HIV-2 Patients from Senegal: Implications for Second-Line Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 2751–2760.
- Requena, S., Lozano, A.B., Caballero, E., García, F., Nieto, M.C., Téllez, R., Fernández, J.M., Trigo, M., Rodríguez-Avial, I., Martín-Carbonero, L., et al. (2019). Clinical experience with integrase inhibitors in HIV-2-infected individuals in Spain. *J Antimicrob Chemother* 74, 1357–1362.
- Rhim, H., and Rice, A.P. (1995). HIV-1 Tat protein is able to efficiently transactivate the HIV-2 LTR through a TAR RNA element lacking both dinucleotide bulge binding sites. *Virology* 206, 673–678.
- Robertson, D.L., Anderson, J.P., Bradac, J.A., Carr, J.K., Foley, B., Funkhouser, R.K., Gao, F., Hahn, B.H., Kalish, M.L., Kuiken, C., et al. (2000). HIV-1 Nomenclature Proposal. *Science* 288, 55–55.
- Rodger, A.J., Cambiano, V., Bruun, T., Vernazza, P., Collins, S., Degen, O., Corbelli, G.M., Estrada, V., Geretti, A.M., Beloukas, A., et al. (2019). Risk of HIV transmission through condomless sex in serodifferent gay couples with the HIV-positive partner taking suppressive antiretroviral therapy (PARTNER): final results of a multicentre, prospective, observational study. *The Lancet* 393, 2428–2438.
- Rodriguez, S.K., Sarr, A.D., MacNeil, A., Thakore-Meloni, S., Gueye-Ndiaye, A., Traoré, I., Dia, M.C., Mboup, S., and Kanki, P.J. (2007). Comparison of heterologous neutralizing

antibody responses of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)- and HIV-2-infected Senegalese patients: distinct patterns of breadth and magnitude distinguish HIV-1 and HIV-2 infections. *J. Virol.* *81*, 5331–5338.

Roquebert, B., Damond, F., Collin, G., Matheron, S., Peytavin, G., Bénard, A., Campa, P., Chêne, G., Brun-Vézinet, F., and Descamps, D. (2008). 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* *62*, 914–920.

Ross, H.L., Gartner, S., McArthur, J.C., Corboy, J.R., McAllister, J.J., Millhouse, S., and Wigdahl, B. (2001). HIV-1 LTR C/EBP binding site sequence configurations preferentially encountered in brain lead to enhanced C/EBP factor binding and increased LTR-specific activity. *J. Neurovirol.* *7*, 235–249.

Rouzioux, C., Hubert, J.-B., Burgard, M., Deveau, C., Goujard, C., Bary, M., Sérén, D., Viard, J.-P., Delfraissy, J.-F., Meyer, L., et al. (2005). Early levels of HIV-1 DNA in peripheral blood mononuclear cells are predictive of disease progression independently of HIV-1 RNA levels and CD4+ T cell counts. *J. Infect. Dis.* *192*, 46–55.

Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* *5*, 725–738.

Ruelle, J., Roman, F., Vandenbroucke, A.-T., Lambert, C., Fransen, K., Echahidi, F., Piérard, D., Verhofstede, C., Van Laethem, K., Delforge, M.-L., et al. (2008). Transmitted drug resistance, selection of resistance mutations and moderate antiretroviral efficacy in HIV-2: Analysis of the HIV-2 Belgium and Luxembourg database. *BMC Infect Dis* *8*, 21.

Samri, A., Charpentier, C., Diallo, M., Bertine, M., Even, S., Morin, V., Oudin, A., Parizot, C., Collin, G., Hosmalin, A., et al. (2019). Limited HIV-2 reservoirs in central-memory CD4 T-cells associated to CXCR6 co-receptor expression in attenuated HIV-2 infection. *PLoS Pathog* *15*, e1007758.

Santiago, M.L., Range, F., Keele, B.F., Li, Y., Bailes, E., Bibollet-Ruche, F., Fruteau, C., Noë, R., Peeters, M., Brookfield, J.F.Y., et al. (2005). Simian Immunodeficiency Virus Infection in Free-Ranging Sooty Mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Taï Forest, Côte d'Ivoire: Implications for the Origin of Epidemic Human Immunodeficiency Virus Type 2. *J. Virol.* *79*, 12515–12527.

Serrao, E., Krishnan, L., Shun, M.-C., Li, X., Cherepanov, P., Engelman, A., and Maertens, G.N. (2014). Integrase residues that determine nucleotide preferences at sites of HIV-1 integration: implications for the mechanism of target DNA binding. *Nucleic Acids Res* *42*, 5164–5176.

Shaik, M.M., Peng, H., Lu, J., Rits-Volloch, S., Xu, C., Liao, M., and Chen, B. (2019). Structural basis of coreceptor recognition by HIV-1 envelope spike. *Nature* *565*, 318–323.

Shankarappa, R., Margolick, J.B., Gange, S.J., Rodrigo, A.G., Upchurch, D., Farzadegan, H., Gupta, P., Rinaldo, C.R., Learn, G.H., He, X., et al. (1999). Consistent Viral Evolutionary Changes Associated with the Progression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol* *73*, 10489–10502.

Sharp, P.M., and Hahn, B.H. (2011). Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1, a006841.

Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., and Malim, M.H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646–650.

Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., and Malim, M.H. (2003). The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat. Med.* 9, 1404–1407.

Shi, Y., Brandin, E., Vincic, E., Jansson, M., Blaxhult, A., Gyllensten, K., Moberg, L., Broström, C., Fenyö, E.M., and Albert, J. (2005). Evolution of human immunodeficiency virus type 2 coreceptor usage, autologous neutralization, envelope sequence and glycosylation. *J. Gen. Virol* 86, 3385–3396.

Simon, F., Maucière, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Müller-Trutwin, M.C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M.C., Barré-Sinoussi, F., and Brun-Vézinet, F. (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* 4, 1032–1037.

Skar, H., Borrego, P., Wallstrom, T.C., Mild, M., Marcelino, J.M., Barroso, H., Taveira, N., Leitner, T., and Albert, J. (2010). HIV-2 genetic evolution in patients with advanced disease is faster than that in matched HIV-1 patients. *J. Virol.* 84, 7412–7415.

Smith, B.A., Gartner, S., Liu, Y., Perelson, A.S., Stilianakis, N.I., Keele, B.F., Kerkering, T.M., Ferreira-Gonzalez, A., Szakal, A.K., Tew, J.G., et al. (2001). Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells. *J. Immunol.* 166, 690–696.

Smith, R.A., Anderson, D.J., Pyrak, C.L., Preston, B.D., and Gottlieb, G.S. (2009). Antiretroviral drug resistance in HIV-2: three amino acid changes are sufficient for classwide nucleoside analogue resistance. *J. Infect. Dis.* 199, 1323–1326.

Smith, R.A., Raugi, D.N., Kiviat, N.B., Hawes, S.E., Mullins, J.I., Sow, P.S., Gottlieb, G.S., and University of Washington-Dakar HIV-2 Study Group (2011). Phenotypic susceptibility of HIV-2 to raltegravir: integrase mutations Q148R and N155H confer raltegravir resistance. *AIDS* 25, 2235–2241.

Smith, R.A., Raugi, D.N., Pan, C., Coyne, M., Hernandez, A., Church, B., Parker, K., Mullins, J.I., Sow, P.S., Gottlieb, G.S., et al. (2012). Three main mutational pathways in HIV-2 lead to high-level raltegravir and elvitegravir resistance: implications for emerging HIV-2 treatment regimens. *PLoS ONE* 7, e45372.

Smith, R.A., Raugi, D.N., Pan, C., Sow, P.S., Seydi, M., Mullins, J.I., and Gottlieb, G.S. (2015). In vitro activity of dolutegravir against wild-type and integrase inhibitor-resistant HIV-2. *Retrovirology* 12.

Smith, R.A., Wu, V.H., Zavala, C.G., Raugi, D.N., Ba, S., Seydi, M., Gottlieb, G.S., and University of Washington-Dakar HIV-2 Study Group (2018). In vitro antiviral activity of cabotegravir against HIV-2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62.

Smith, R.A., Raugi, D.N., Wu, V.H., Zavala, C.G., Song, J., Diallo, K.M., Seydi, M., Gottlieb, G.S., Sall, F., Mouhamadou Baïla, D., et al. (2019). Comparison of the Antiviral

Activity of Bictegravir against HIV-1 and HIV-2 Isolates and Integrase Inhibitor-Resistant HIV-2 Mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 63, e00014-19, /aac/63/5/AAC.00014-19.atom.

Smyth, R.P., Schlub, T.E., Grimm, A.J., Waugh, C., Ellenberg, P., Chopra, A., Mallal, S., Cromer, D., Mak, J., Davenport, M.P., et al. (2014). Identifying Recombination Hot Spots in the HIV-1 Genome. *Journal of Virology* 88, 2891–2902.

Song, I., Borland, J., Chen, S., Lou, Y., Peppercorn, A., Wajima, T., Min, S., and Piscitelli, S.C. (2011). Effect of atazanavir and atazanavir/ritonavir on the pharmacokinetics of the next-generation HIV integrase inhibitor, S/GSK1349572. *Br J Clin Pharmacol* 72, 103–108.

Sousa, A.E., Carneiro, J., Meier-Schellersheim, M., Grossman, Z., and Victorino, R.M.M. (2002). CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J. Immunol.* 169, 3400–3406.

Stremlau, M., Owens, C.M., Perron, M.J., Kiessling, M., Autissier, P., and Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5a restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427, 848–853.

Takeuchi, J.S., Perche, B., Migraine, J., Mercier-Delarue, S., Ponscarne, D., Simon, F., Clavel, F., and Labrosse, B. (2013). High level of susceptibility to human TRIM5 $\alpha$  conferred by HIV-2 capsid sequences. *Retrovirology* 10, 50.

Terry, V.H., Johnston, I.C.D., and Spina, C.A. (2009). CD44 MicroBeads Accelerate HIV-1 Infection in T Cells. *Virology* 388, 294.

Thiébaud, R., Matheron, S., Taieb, A., Brun-Vezinet, F., Chêne, G., Autran, B., and immunology group of the ANRS CO5 HIV-2 cohort (2011). Long-term nonprogressors and elite controllers in the ANRS CO5 HIV-2 cohort. *AIDS* 25, 865–867.

Thierry, S., Munir, S., Thierry, E., Subra, F., Leh, H., Zamborlini, A., Saenz, D., Levy, D.N., Lesbats, P., Saïb, A., et al. (2015). Integrase inhibitor reversal dynamics indicate unintegrated HIV-1 dna initiate de novo integration. *Retrovirology* 12.

de Truchis, P., Assoumou, L., Landman, R., Mathez, D., Le Dû, D., Bellet, J., Amat, K., Katlama, C., Gras, G., Bouchaud, O., et al. (2018). Four-days-a-week antiretroviral maintenance therapy in virologically controlled HIV-1-infected adults: the ANRS 162-4D trial. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73, 738–747.

Tse, W.C., Link, J.O., Mulato, A., Niedziela-Majka, A., Rowe, W., Somoza, J.R., Villasenor, A.G., Yant, S.R., Zhang, J.R., and Zheng, J. (2017). Discovery of novel potent HIV capsid inhibitors with long-acting potential (Seattle, Washington).

Tuaille, E., Gueudin, M., Lemée, V., Gueit, I., Roques, P., Corrigan, G., Plantier, J.-C., Simon, F., and Braun, J. (2004). Phenotypic Susceptibility to Nonnucleoside Inhibitors of Virion-Associated Reverse Transcriptase From Different HIV Types and Groups. *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes* 37, 1543–1549.

Van Rompay, K.K.A., Hassounah, S., Keele, B.F., Lifson, J.D., Ardeshir, A., Watanabe, J., Pham, H.T., Chertova, E., Sowder, R., Balzarini, J., et al. (2018). Dolutegravir Monotherapy

of Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques Selects for Several Patterns of Resistance Mutations with Variable Virological Outcomes. *J Virol* 93, e01189-18.

Venner, C.M., Nankya, I., Kyeyune, F., Demers, K., Kwok, C., Chen, P.-L., Rwambuya, S., Munjoma, M., Chipato, T., Byamugisha, J., et al. (2016). Infecting HIV-1 Subtype Predicts Disease Progression in Women of Sub-Saharan Africa. *EBioMedicine* 13, 305.

Visseaux, B., Damond, F., Matheron, S., Descamps, D., and Charpentier, C. (2016a). HIV-2 molecular epidemiology. *Infect. Genet. Evol.* 46, 233–240.

Visseaux, B., Charpentier, C., Bertine, M., Besseghir, A., Fagard, C., Damond, F., Matheron, S., Hue, S., and Descamps, D. (2016b). HIV-2 group A in France displayed 2 clades with distinct geographical origins. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections Poster #214.

Wang, L., Mukherjee, S., Jia, F., Narayan, O., and Zhao, L.-J. (1995). Interaction of Virion Protein Vpr of Human Immunodeficiency Virus Type 1 with Cellular Transcription Factor Sp1 and trans-Activation of Viral Long Terminal Repeat. *J. Biol. Chem.* 270, 25564–25569.

Wei, X., Decker, J.M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J.C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Kilby, J.M., Saag, M.S., et al. (2003a). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422, 307–312.

Wei, X., Decker, J.M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J.C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J.F., Salazar, M.G., Kilby, J.M., Saag, M.S., et al. (2003b). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422, 307–312.

Wejse, C., and Hønge, B.L. (2019). Is it time to revise the notion that HIV-2 is benign? *The Lancet HIV* 6, e3–e4.

Wetzel, K.S., Yi, Y., Yadav, A., Bauer, A.M., Bello, E.A., Romero, D.C., Bibollet-Ruche, F., Hahn, B.H., Paiardini, M., Silvestri, G., et al. (2018). Loss of CXCR6 coreceptor usage characterizes pathogenic lentiviruses. *PLoS Pathog* 14.

Witte, L. de, Nabatov, A., and Geijtenbeek, T.B.H. (2008). Distinct roles for DC-SIGN<sup>+</sup>-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. *Trends in Molecular Medicine* 14, 12–19.

de Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., de Jong, M.A.W.P., de Gruijl, T., Piguet, V., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B.H. (2007). Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med* 13, 367–371.

Witvrouw, M., Pannecouque, C., Switzer, W.M., Folks, T.M., De Clercq, E., and Heneine, W. (2004). Susceptibility of HIV-2, SIV and SHIV to various anti-HIV-1 compounds: implications for treatment and postexposure prophylaxis. *Antivir. Ther. (Lond.)* 9, 57–65.

Wong, J.K. (1997). Recovery of Replication-Competent HIV Despite Prolonged Suppression of Plasma Viremia. *Science* 278, 1291–1295.

Xu, J., and Zhang, Y. (2010). How significant is a protein structure similarity with TM-score = 0.5? *Bioinformatics* 26, 889–895.

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., and Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods* 12, 7–8.

Yeni, P. (2010). *Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH: rapport 2010 : recommandations du groupe d'experts* (Paris: La Documentation française).

Ylinen, L.M.J., Keckesova, Z., Wilson, S.J., Ranasinghe, S., and Towers, G.J. (2005). Differential Restriction of Human Immunodeficiency Virus Type 2 and Simian Immunodeficiency Virus SIVmac by TRIM5 $\alpha$  Alleles. *J Virol* 79, 11580–11587.

Zhang, F., Wilson, S.J., Langford, W., Virgen, B., Gregory, D., Johnson, M., Munch, J., Kirchhoff, F., Bieniasz, P.D., and Hatziioannou, T. (2009). Nef proteins from simian immunodeficiency viruses are tetherin antagonists. *Cell Host Microbe* 6, 54–67.

Zheng, N.N., Kiviat, N.B., Sow, P.S., Hawes, S.E., Wilson, A., Diallo-Agne, H., Critchlow, C.W., Gottlieb, G.S., Musey, L., and McElrath, M.J. (2004). Comparison of human immunodeficiency virus (HIV)-specific T-cell responses in HIV-1- and HIV-2-infected individuals in Senegal. *J. Virol.* 78, 13934–13942.

UNAIDS (2018). *UNAIDS - Data 2018*.

## Annexe 1 : Fiche de la cohorte ANRS CO5 VIH-2

Cohortes dans l'infection par le VIH et hépatites, Co-Infection menées sous l'égide de l'ANRS (septembre 2014)\*

### ANRS CO5 VIH-2 (ex EP19)

“Histoire naturelle de l'infection par le VIH-2 chez les patients adultes vivant en France”

<b>Nombre de sujets inclus/attendus</b>	1038/Indéterminé
<b>Date de début et durée des inclusions</b>	1994/Indéterminé
<b>Durée de l'étude</b>	Indéterminée
<b>Nombre de centres déclarés</b>	122 (mise à jour du 03/07/2014)
<b>Situation</b>	En cours d'inclusion
<b>Équipe de coordination</b>	
Investigateur coordonnateur	S. Matheron (Maladies infectieuses et tropicales, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris)
Virologues coordonnateurs	F. Brun-Vezinet, F. Damond, D. Descamps (Virologie, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris)
Immunologistes coordonnateurs	B. Autran (Immunologie, Hôpital La Pitié Salpêtrière, Paris)
Coordination méthodologique	G. Chêne (CMG-EC de l'Inserm U897, Bordeaux)
Chef de projet	Céline Roy (CMG-EC de l'Inserm U897, Bordeaux)
<b>Promoteur</b>	Inserm - ANRS
<b>Objectifs</b>	<p><b>Principal</b> : Etudier la progression de l'infection par le VIH-2 chez les patients adultes suivis en France</p> <p><b>Secondaires</b> : Décrire les caractéristiques épidémiologiques et cliniques des patients infectés par le VIH-2 ; étudier la progression des patients infectés par le VIH-2 à travers les différents stades de la maladie et les facteurs pronostiques de cette évolution ; fournir une banque de données clinico-biologiques permettant la réalisation de projets cliniques, virologiques ou immunologiques sur l'infection par le VIH-2</p>
<b>Méthodologie</b>	Cohorte ouverte, prospective, multicentrique
<b>Principaux critères d'inclusion</b>	Infection par VIH-2 seulement, diagnostiquée par ELISA, confirmée par un test Western-Blot, suivi en consultation ou en hospitalisation dans un des services participants, âge $\geq$ 18 ans, suivi prolongé possible, résidence en France prévue pour au moins un an, consentement du patient à participer, prise en charge à 100% possible pour le patient, ou aide médicale ou déclaration d'obtention d'aide médicale au moment de l'inclusion
<b>Modalités du suivi</b>	Visites et questionnaires semestriels ; trimestriels en cas de traitement antirétroviral et en cas d'évènement intermédiaire
<b>Biothèques</b> (Nature des prélèvements)	<p><u>Sérothèque</u> : prélèvement d'un tube sec de 10 mL tous les ans. Serum aliquoté en tubes de 1 mL conservés à -80°C</p> <p><u>Plasmathèque</u> : prélèvement de 2 tubes EDTA de 10 mL ; Plasma aliquoté en tubes de 1 mL et conservés à -80°C</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• tous les 6 mois pour les patients non traités</li> <li>• à J0, M1, M3 puis tous les 3 mois pour les patients traités</li> <li>• en cas d'évènements intermédiaires tel que définis dans le protocole</li> </ul> <p><u>Cellulothèque</u> : tous les ans, conservation des culots des 2 tubes EDTA de 10 mL utilisés pour la plasmathèque. Aliquotage en culots secs de <math>5 \times 10^6</math> cellules conservés à -80°C</p>
<b>Données</b>	<p><b>Cliniques et biologiques</b> : tous les 6 mois, et en cas d'évènement intermédiaire</p> <p><b>Virologiques</b> : mesure de l'ARN plasmatique réalisée à l'inclusion, puis pour les patients non traités tous les 6 mois ; avec contrôle au 3<sup>e</sup> mois en cas de charge virale détectable ; pour les patients traités par antirétroviraux : avant le début du traitement, puis à 1 mois, 3 mois et tous les 3 mois. Sérologie VIH-1 annuelle.</p>

## Sous études **Immunovir-2 / Réservoirs (amendement N°12 du 28/11/2012)**

**Objectif :** rechercher les corrélats immunologiques (Immunovir-2) et virologiques (Réservoirs) de protection contre la maladie chez les participants infectés par le VIH-2.

**Recrutement :** (Tous les centres d'Ile de France sont invités à participer)

- 40 patients: 20 non-progresseurs (infection stable sur le plan clinique et immunitaire), et 20 progresseurs (progression clinique et/ou immunologique faisant poser l'indication d'un traitement antirétroviral)
- 20 volontaires sains ayant de préférence un lien de filiation ou de fratrie avec les patients de l'étude ou à défaut le même pays d'origine que ceux auxquels ils seront appariés.

Visite à M0 et M12 pour les patients, 1 seule visite pour les volontaires sains.

La 1ère inclusion dans la sous-étude a eu lieu le 29 Mai 2013.

A ce jour, 24 centres d'Ile de France ont été ouverts, 14 patients non progresseurs et 3 patients progresseurs ont été inclus.

## Faits marquants

*Description de l'histoire naturelle, clinique et immunologique*

- Progression clinique ; Pente de décroissance des CD4 ; Charge virale plasmatique ; ADN proviral ; Proportion de Long Term Non Progressors et Elite Controllers. Facteurs prédictifs de progression dont les marqueurs d'inflammation.

*Etudes virologiques*

- Mise au point des techniques de mesure de l'ARN plasmatique : seuil de détection à 250 puis 100 cp/mL, puis à 40cp/mL depuis Février 2013
- Etudes phénotypique et génotypique de la sensibilité (inhibiteurs de protéase, d'intégrase) et de la résistance aux antirétroviraux (prévalence de la résistance primaire et description des mutations sélectionnées sous traitement ; inhibiteurs nucléos(t)idiques de la transcriptase inverse, inhibiteurs de protéase, d'intégrase).
- Détermination du tropisme (ARN, ADN) et des facteurs associés ; association tropisme et progression clinique ; développement d'un test de sensibilité phénotypique de sensibilité aux anti-CCR5. Concordance entre le tropisme du VIH-2 basé sur l'ARN viral et sur l'ADN proviral.
- Etude des sites de clivage du gène gag.
- Identification des groupes de VIH-2 circulant au sein de la cohorte et analyse leur influence sur la réponse au traitement antirétroviral.
- Etude des facteurs de restriction (TRIM5a)

*Etudes satellite Immuno-virologique*

- Etude des caractéristiques immunologiques de l'infection à VIH-2 ; Etude des réservoirs latents et inductibles dans les cellules du compartiment CD4 circulant en cours.
- Etude de l'interaction VIH-2 immunité innée / capsid
- Etude de la réponse immuno-virologique chez les patients traités par cART incluant lopinavir/ritonavir

*Contribution à la mise à jour des recommandations nationales de prise en charge (groupe d'experts, rapport 2013).*

## Collaborations

- Collaboration internationale **ACHIEV2E/COHERE**, dans le cadre d'**EuroCoord**, compare l'évolution des infections VIH-1 et VIH-2 de 176 148 patients infectés par VIH-1 et 925 infectés par VIH-2, appariés sur l'origine géographique, le genre, l'âge et sur la valeur de la charge virale plasmatique
- Collaboration avec N. Manel, **Equipe ATIP-AVENIR, INSERM U932, Institut Curie** pour l'étude de l'impact des séquences de capsid des patients infectés par le VIH-2 sur l'induction de la réponse innée, et de la corrélation avec le statut clinique. Ce projet utilise une partie des prélèvements (10 mL par patient) des patients inclus dans la sous-étude Immunovir-2 et doit porter sur 10 patients progresseurs et 10 patients non progresseurs de la sous-étude Immunovir-2.
- Collaboration avec **leDEA et RESAPSI**  
La collaboration développée depuis 2009, avec le Réseau Africain de Praticiens Assurant la Prise en Charge des Personnes vivant avec le VIH/SIDA (RESAPSI), le réseau leDEA, et le Mozambique, le Brésil et l'Inde a été poursuivie et développée. Son objectif principal est la mise en place d'une cohorte multicentrique de patients infectés

par VIH-2 et VIH-1&2, traités et non traités, vivant dans les pays du Sud, principalement en Afrique de l'Ouest, selon un format de suivi standardisé, et la mise en place d'un réseau Nord-Sud pour la conception d'un essai clinique comparatif (traitement de première ligne) : « Essai randomisé de phase III, sans insu sur les traitements, évaluant l'efficacité et la tolérance du ténofovir-emtricitabine-lopinavir/ritonavir et du ténofovir-emtricitabine raltegravir chez des adultes infectés par le VIH-2 en Afrique de l'Ouest et naïfs de traitement antirétroviral ».

## Publications principales

- Damond F, Brun-Vézinet F, Matheron S, et al.. Polymorphism of the human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) protease gene and selection of drug resistance mutations in HIV-2-infected patients treated with protease inhibitors. *J Clin Microbiol* 2005; 43:484-7.
- Damond F, Collin G, Matheron S, et al.; French ANRS HIV-2 Cohort (ANRS CO 5 VIH-2). Letter. In vitro phenotypic susceptibility to nucleoside reverse transcriptase inhibitors of HIV-2 isolates with the Q151M mutation in the reverse transcriptase gene. *Antivir Ther* 2005; 10: 861-5
- Damond F, Collin G, Descamps D, et al. Improved sensitivity of human immunodeficiency virus type 2 subtype B plasma viral load assay. *J Clin Microbiol* 2005;43:4234-6
- Alatrakchi N, Damond F, Matheron S, et al.; French HIV-2 study group. Proliferative, IFN $\gamma$  and IL-2-producing T-cell responses to HIV-2 in untreated HIV-2 infection. *AIDS* 2006; 20(1):29-34.
- Matheron S, Damond F, Benard A, et al. CD4+ cell recovery in treated HIV2 infected adults is lower than expected: results from the French ANRS CO5 HIV2 cohort. *AIDS* 2006; 20:459-62.
- Descamps D, Damond F, Benard A, et al. No association between GB virus C infection and disease progression in HIV-2-infected patients from the French ANRS HIV-2 cohort. *AIDS* 2006;20:1076-9.
- Damond F, Bénard A, Ruelle J, et al. Quality control assessment of HIV-2 viral load quantification assays. Results from an international collaboration on HIV-2 infection, 2006. *J Clin Microbiol*. 2008;46:2088-91
- 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.
- Matheron S. Editorial comment : HIV-2 infection: a call for controlled trials. *AIDS* 2008, 22:2073–2074.
- 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.
- Roquebert B, Blum L, Collin G, Damond F, Peytavin G, Leleu J, Matheron S, Chêne G, Brun-Vézinet F, Descamps D. Selection of the Q148R integrase inhibitor resistance mutation in a failing raltegravir containing regimen.; ANRS HIV-2 Co5 Cohort. *AIDS*. 2008 Oct 1; 22(15):2045-6.
- Bénard A, Damond F, Campa P, et al. for the ANRS CO5 HIV-2 Cohort Study Group. Good response to LPV/r containing antiretroviral regimens in antiretroviral-naïve HIV-2-infected patients. *AIDS* 2009, 23:1171–1179
- Charpentier C, Larrouy L, Collin G, Damond F, Matheron S, Chêne G, Nie T, Schinazi R, Brun-Vézinet F, Descamps D; French ANRS HIV-2 Cohort (ANRS CO 05 VIH-2). In-vitro phenotypic susceptibility of HIV-2 clinical isolates to the integrase inhibitor S/GSK1349572. *AIDS* 2010 ; 24(17):2753-5
- Charpentier C, Roquebert B, Delelis O, Larrouy L, Matheron S, Tubiana R, Karmochkine M, Duval X, Chêne G, Storto A, Collin G, Bénard A, Damond F, Mouscadet JF, Brun-Vézinet F, Descamps D; French ANRS HIV-2 Cohort (ANRS CO 05 VIH-2). Hot spots of integrase genotypic changes leading to HIV-2 resistance to raltegravir. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 ;55(3):1293-5
- Charpentier C, Larrouy L, Matheron S, Damond F, Delelis O, Mouscadet JF, Campa P, Chêne G, Brun-Vézinet F, Descamps D; French ANRS HIV-2 Cohort (ANRS CO 05). Long-lasting persistence of integrase resistance mutations in HIV-2-infected patients after raltegravir withdrawal. *Antivir Ther*. 2011;16(6):937-40
- Thiébaud R, Matheron S, Taieb A, Brun-Vézinet F, Chêne G, Autran B; immunology group of the ANRS CO5 HIV-2 cohort. Long-term nonprogressors and elite controllers in the ANRS CO5 HIV-2 cohort. *AIDS* 2011; 25(6):865-7
- Thiébaud R, Charpentier C, Damond F, Taieb A, Antoine R, Capeau J, Chêne G, Collin G, Matheron S, Descamps D, Brun-Vézinet F; French ANRS HIV-2 CO5 Cohort. Association of soluble CD14 and inflammatory biomarkers with HIV-2 disease progression. *Cil. Infect. Dis*. 2012 ; 55(10) :1417-25
- Visseaux B, Charpentier C, Hurtado-Nedelec M, Storto A, Antoine R, Peytavin G, Damond F, Matheron S, Brun-Vézinet F, Descamps D; French ANRS HIV-2 Cohort (ANRS CO 05 VIH-2). In vitro phenotypic susceptibility of HIV-2 clinical isolates to CCR5 inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(1):137-9
- Visseaux B, Hurtado-Nedelec M, Charpentier C, Collin G, Storto A, Matheron S, Larrouy L, Damond F, Brun-Vézinet F, Descamps D; ANRS CO 05 HIV-2 Cohort. Molecular determinants of HIV-2 R5-X4 tropism in the V3 loop: development of a new genotypic tool. *J Infect Dis*. 2012; 205(1):111-20
- Larrouy L, Vivot A, Charpentier C, Bénard A, Visseaux B, Damond F, Matheron S, Chêne G, Brun-Vézinet F, Descamps D; ANRS CO5 HIV-2 Cohort. Impact of gag genetic determinants on virological outcome to boosted lopinavir-containing regimen in HIV-2-infected patients. *AIDS* 2013; 27(1):69-80
- Visseaux B, Charpentier C, Taieb A, Damond F, Bénard A, Larrouy L, Chêne G, Brun-Vézinet F, Matheron S, Descamps D; ANRS CO5 HIV-2 Cohort. Concordance between HIV-2 genotypic coreceptor tropism predictions based on plasma RNA and proviral DNA. *AIDS* 2013; 27(2):292-5

- Charpentier C, Visseaux B, Bénard A, Peytavin G, Damond F, Roy C, Taieb A, Chêne G, Matheron S, Brun-Vézinet F, Descamps D; ANRS CO5 HIV-2 Cohort. Transmitted drug resistance in French HIV-2-infected patients. *AIDS* 2013; 27(10):1671-4.
- Delarue S, Didier E, Damond F, Ponscarne D, Brengle-Pesce K, Resche-Rigon M, Vray M, Gueudin M, Simon F. Highly sensitive plasma RNA quantification by real-time PCR in HIV-2 group A and group B infection. *J Clin Virol*. 2013; 58(2):461-7.
- Takeuchi JS, Perche B, Migraine J, Mercier-Delarue S, Ponscarne D, Simon F, Clavel F, Labrosse B. High level of susceptibility to human TRIM5α conferred by HIV-2 capsid sequences. *Retrovirology* 2013; 10:50.
- Visseaux B, Charpentier C, Rouard C, Fagard C, Glohi D, Tubiana R, Damond F, Brun-Vézinet F, Matheron S, Descamps D. HIV-2 X4 tropism is associated with lower CD4+ cell count in treatment-experienced patients, *AIDS*, September 10, 2014 - Volume 28 - Issue 14.
- Avettand-Fenoel V, Damond F, Gueudin M, Matheron S, Mélard A, Collin G, Descamps D, Chaix ML, Rouzioux C, Plantier JC; ANRS-CO5 HIV-2 and the ANRS-AC11 Quantification Working Group. New sensitive one-step real-time duplex PCR method for group A and B HIV-2 RNA load. *J Clin Microbiol*. 2014 Aug;52(8):3017-22. doi: 10.1128/JCM.00724-14. Epub 2014 Jun 11.

## Communications 2014

---

- Descamps D, Peytavin G, Damond F, Tubiana R, Campa P, Khuong MA, Duvivier C, Karmochkine M, Lukiana T, Matheron S. Dolutegravir in the French Early Access Program in Integrase HIV-2 Resistant Infected Patients. CROI 2014.
- Visseaux B, Charpentier C, Rouard C, Fagard C, Glohi D, Tubiana R, Damond F, Brun-Vézinet F, Matheron S, Descamps D and the French HIV-2 ANRS Cohort CO5. HIV-2 X4 Tropism is Associated with Lower CD4 Cell Count in Treatment-experienced Patients. CROI 2014.
- Linda Wittkop and Sophie Matheron on behalf of the COHERE in EuroCoord and ACHIEV2E study team. CD4 cell count dynamics in HIV-1 and HIV-2 seroprevalent patients while naïve for antiretroviral treatment – a multicohort study. IWHOD 2014.
- Bertine M., Charpentier C., Visseaux B., Storto A., Collin G., Fagard C., Ozanne A., Larrouy L., Damond F., Matheron S., Brun-Vézinet F., Descamps D. and the ANRS CO5 HIV-2 Cohort. Higher Proportion of Defective Proviral Viruses in HIV-2 compared with HIV-1. IHDRW 2014.
- Visseaux B., Charpentier C., Bertine M., Peytavin G., Damond F., Matheron S., Lefebvre E., Brun-Vézinet F., Descamps D. and the ANRS CO5 HIV-2 Cohort. Cenicriviroc, a Novel CCR5 (R5) and CCR2 Antagonist, Shows In Vitro Activity Against R5 Tropic HIV-2 Clinical Isolates. IHDRW 2014.
- Visseaux B., Charpentier C., Ozanne A., Drumard S., Fagard C., Glohi D., Damond F., Brun-Vézinet F., Matheron S., Descamps D. and the ANRS CO5 HIV-2 Cohort. Tropism Distribution among Antiretroviral-naïve HIV-2-infected Patients. IHDRW 2014.

★

- Cohortes dans l'infection par le VIH
- Cohortes dans la co-infection
- Cohortes dans les hépatites virales

## Annexe 2 : Algorithme ANRS d'interprétation des génotypes de résistance du VIH-2

November 2018 - Version n°29

### ANRS - AC 43: RESISTANCE GROUP GENOTYPE INTERPRETATION FOR HIV-2

#### GENOTYPE INTERPRETATION: NUCLEOSIDE AND NUCLEOTIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS [1]

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
ZDV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Q151M</li> <li>• S215A/C/F/L/Y + 1 mutation among K65R, N69S/I/T, K70R, Y115F, K223R</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• S215A/C/F/L/Y</li> </ul>
3TC/FTC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• M184I/V</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• K65R</li> </ul>
ABC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• K65R</li> <li>• Q151M</li> <li>• M184I/V + 1 mutation among: L74V, Y115F</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 mutations among: D67N, K70N/R, M184V/I, S215A/C/F/L/Y</li> </ul>
TDF/TAF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• K65R</li> <li>• Q151M + V111I</li> </ul>	

ZDV: zidovudine, 3TC: lamivudine, FTC: emtricitabine, ABC: abacavir, TDF: tenofovir, TAF: tenofovir alafenamide

Didanosine and stavudine are not recommended

November 2018 - Version n°29

GENOTYPE INTERPRETATION: PROTEASE INHIBITORS [1]

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
LPV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 mutations among: I82F, I84V, L90M</li> <li>• I54M</li> <li>• V47A</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• V62A + L99F</li> <li>• 1 mutation among: I82F, I84V, L90M</li> </ul>
DRV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• I50V</li> <li>• I54M</li> <li>• I84V + L90M</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 mutation among: I84V, L90M</li> </ul>

LPV: lopinavir, DRV: darunavir

For indinavir and saquinavir refer to previous rules (See Archives, Version 27, September 2017)  
Atazanavir and tipranavir are not recommended

November 2018 - Version n°29

**GENOTYPE INTERPRETATION: INTEGRASE STRAND TRANSFER INHIBITORS [1-5]**

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
RAL	<ul style="list-style-type: none"> <li>• N155H/R</li> <li>• Q148K/R/H [3,4,5]</li> <li>• E92Q + T97A</li> <li>• Y143C/G/R + 1 mutation among: E92Q, T97A</li> <li>• Insertion at codon 231 [5]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• E92Q</li> <li>• Y143C/G/R</li> </ul>
EVG	<ul style="list-style-type: none"> <li>• E92G/Q</li> <li>• Q148K/R/H [3,4,5]</li> <li>• N155H</li> <li>• T97A + Y143C</li> <li>• Insertion at codon 231 [5]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Y143C</li> </ul>
DTG	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Q148K</li> <li>• G140S + Q148R/H [3,4,5]</li> <li>• E92Q + N155H</li> <li>• T97A + N155H</li> <li>• Insertion at codon 231 [5]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Q148R/H [3]</li> <li>• N155H</li> <li>• E92Q</li> <li>• T97A + Y143C</li> </ul>
CAB*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Q148K</li> <li>• G140S + Q148R/H [3,4,5]</li> <li>• E92Q + N155H</li> <li>• T97A + N155H</li> <li>• Insertion at codon 231 [5]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Q148R/H [3]</li> <li>• N155H</li> <li>• E92Q</li> <li>• T97A + Y143C</li> </ul>
BIC*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Q148K</li> <li>• G140S + Q148R/H [5]</li> <li>• E92Q + N155H</li> <li>• T97A + N155H</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Q148R/H</li> <li>• N155H</li> <li>• E92Q</li> <li>• T97A + Y143C</li> <li>• Insertion at codon 231 [5]</li> </ul>

RAL: raltegravir, EVG: elvitegravir, DTG: dolutegravir, CAB: cabotegravir, BIC: bictegravir  
 \*Due to the very close structures of dolutegravir and cabotegravir, rules for dolutegravir are transposed to cabotegravir with the exception of the insertion at codon 231 for bictegravir

November 2018 - Version n°29

<b>NON-NUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Naturally resistant to all NNRTI [2]</li> </ul>
<b>FUSION INHIBITOR</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Naturally resistant to enfuvirtide [2]</li> </ul>
<b>ATTACHEMENT INHIBITOR</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Naturally resistant to fostemsavir [6]</li> </ul>

**REFERENCES**

1/ Charpentier C et al. HIV-2EU-Supporting Standardized HIV-2 Drug-Resistance Interpretation in Europe: An Update. Clin Infect Dis. 2015 Jul 17. pii: civ572

2/ Witvrouw E et al. Susceptibility of HIV-2, SIV and SHIV to various anti-HIV-1 compounds: implications for treatment and postexposure prophylaxis. Antivir Ther 2004; 9(1): 57-65.

3/ Smith RA et al. Three main mutational pathways in HIV-2 lead to high-level raltegravir and elvitegravir resistance: implications for emerging HIV-2 treatment regimens. PLoS ONE, 2012; 7.

4/ Smith RA, In vitro antiviral activity of cabotegravir against HIV-2. Antimicrob Agents Chemother. 2018 Jul 16. pii: AAC.01299-18. doi: 10.1128/AAC.01299-18.

5/ Le Hingrat Q et al. A 5 amino-acid insertion in the C-terminal region of HIV-2 integrase impacts phenotypic susceptibility to the five integrase inhibitors. 16th European Meeting on HIV & Hepatitis Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance, May 2018, Roma, Italy, Abstract 4.

6/ Lataillade M et al. Viral drug resistance through 48 weeks, in a phase 2b, randomized, controlled trial of the HIV-1 attachment inhibitor prodrug, Fostemsavir. J Acquir Immune Defic Syndr. 2018 Mar 1;77(3):299-30

## Annexe 3 : Rapport de cas d'une primo-infection par le VIH-2

Open Forum Infectious Diseases

BRIEF REPORT



### HIV-2 Primary Infection in a French 69-Year-Old Bisexual Man

Nicolas Cazals,<sup>1</sup> Quentin Le Hingrat,<sup>2,3,4</sup> Bruno Abraham,<sup>1</sup> Patricia Da Silva,<sup>1</sup> Laure Guindre,<sup>4</sup> Sylvie Goffart,<sup>4</sup> Florence Damond,<sup>2,3</sup> Benoît Visseaux,<sup>2,3</sup> Charlotte Charpentier,<sup>2,3</sup> Sylvie Ranger-Rogez,<sup>5</sup> and Diane Descamps<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Service de Médecine Interne, Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier de Brive-la-Gaillarde, Brive-la-Gaillarde, France; <sup>2</sup>IAME, UMR 1137, INSERM, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; <sup>3</sup>Laboratoire de Virologie, Hôpital Bichat-Claude Bernard, AP-HP, Paris, France; <sup>4</sup>Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier de Brive-la-Gaillarde, Brive-la-Gaillarde, France; <sup>5</sup>Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, Limoges, France

More than 1 million individuals, mainly in West Africa, are thought to be infected with HIV-2. Acute HIV-2 infection is rarely observed, only 2 primary infections have been described to date. We report a detailed case of HIV-2 primary infection in a 69-year-old French bisexual Caucasian man, thereby providing valuable insights into HIV-2 early infection.

**Keywords.** early treatment; HIV-2; primary infection; reservoir.

#### CASE REPORT

A 69-year-old French bisexual Caucasian man with no significant prior medical history and no travel history presented to Brive-La-Gaillarde Hospital in mid-April of 2017 (visit 1 [V1]), with a 1-month history of upper respiratory tract symptoms, low-grade fever, fatigue, and a positive HIV serology performed 2 weeks prior using a fourth-generation enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; HIV Combi, Cobas, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Three weeks before V1, he exhibited a generalized maculopapular rash that lasted for 3 days. He reported no history of diarrhea or weight loss. Clinical examination revealed no signs of pharyngitis, fever, adenopathy, or organomegaly. Chest radiography yielded normal chest findings. He reported having engaged in unprotected anal and oral sexual encounters with 15 male individuals between March of 2016

and April of 2017. Three of these individuals had been unknown to him, and none of them came from HIV-2-endemic areas in West Africa. His last at-risk exposure occurred 5 weeks before, in mid-March 2017, with an unknown individual, with whom he engaged in unprotected receptive anal intercourse that involved ejaculation and unprotected mutual oral sex. The patient had a negative HIV serology 1 year before presentation. Screening for other sexually transmitted infections (syphilis, hepatitis B virus, hepatitis C virus, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Chlamydia trachomatis*) was negative.

At V1, HIV infection was confirmed by a fourth-generation HIV ELISA assay (HIV Ag/Ab Combo, Architect, Abbott, Wiesbaden, Germany), detecting anti-HIV-1 and anti-HIV-2 antibodies, and HIV-1 p24 antigen (p24 Ag). The signal was weakly positive (2.5 times the minimum threshold). At V1 and V2 (1 month after V1), HIV-1 plasma viral load (VL) was repeatedly undetectable (<40 copies/mL) using Xpert HIV-1 Viral Load (Cepheid, Sunnyvale, CA). As recommended in France, HIV Western blots (WBs) were performed. Combined HIV-1/2 WB was carried out at V1 and V2, using HIV Blot 2.2 (MP Diagnostics, Singapore) and INNO-LIA HIV 1/2 Score (Innogenetics, Gent, Belgium), respectively. In addition to HIV-1 antigens, these assays include several HIV-2 antigens (the Gag-Pol precursor for the MP test and the HIV-2 glycoproteins gp36 and gp105 for the INNO-LIA test). At V1, the combined HIV-1/2 WB was only positive for the HIV-1 p24 band, but not for the HIV-2 band corresponding to the Gag-Pol precursor. At V2, the HIV-1/2 WB profile only exhibited the HIV-1 p24 and HIV-2 gp36 bands, thus suggesting an HIV-2 primary infection.

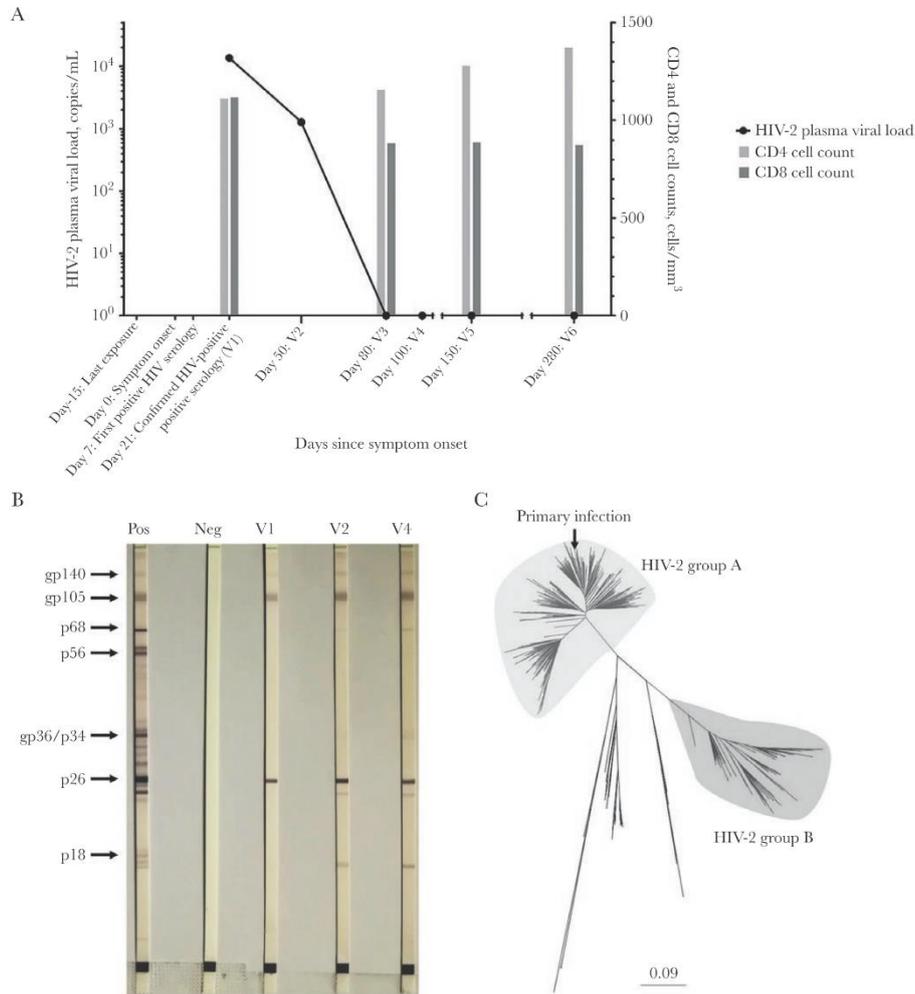
Combined antiretroviral therapy was hence initiated 1 week after V2, with a regimen containing emtricitabine, tenofovir disoproxil fumarate, and ritonavir-boosted darunavir. Due to HIV-2 natural drug resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, the recommended firstline treatment options consist of 2 nucleoside reverse transcriptase inhibitors associated with a protease or integrase inhibitor. Following diagnosis, the patient also received adequate patient education sessions and psychological assistance. The patient's follow-up consisted of 4 additional visits, at 2, 3, 4, and 8 months after V1 (V3, V4, V5, and V6, respectively) (Figure 1). No white cell count anomalies were noted at V1 or over the course of the follow-up. At diagnosis (V1), his CD4 and CD8 cell counts were 1104 and 1112/mm<sup>3</sup>, respectively, with a CD4/CD8 ratio of 0.99. Over the course of the follow-up, under antiretroviral therapy, his CD4 cell count increased by 260/mm<sup>3</sup> between V1 and V6, and the CD4/CD8 ratio reversed (it was 1.31 at V3 and 1.57 at V6) (Figure 1).

Received 17 April 2018; editorial decision 24 August 2018; accepted 10 September 2018.

Correspondence: Q. Le Hingrat, PharmD, Laboratoire de Virologie, Hôpital Bichat-Claude Bernard, AP-HP, Paris, France (quentin.lehingrat@aphp.fr).

Open Forum Infectious Diseases®

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com  
DOI: 10.1093/ofid/ofy223



**Figure 1.** Changes in immunological and virological parameters during an HIV-2 primary infection. A, CD4 and CD8 cell counts and the HIV-2 plasma viral load (VL) were monitored throughout the 8-month follow-up. Antiretroviral therapy was started 1 week after V2, with a regimen containing emtricitabine, tenofovir disoproxil fumarate, and ritonavir-boosted darunavir. CD4 and CD8 cell counts are depicted as light and dark gray bars, respectively. Undetectable HIV-2 plasma VLs were assigned an arbitrary value of 1 copy/mL, and HIV-2 VLs were log-transformed and are represented as a black circle. Dates are expressed as days since symptom onset, with day -15 being the last exposure. B, HIV-2-specific Western blots were performed using New Lav Blot II (BioRad, Marne-la-Coquette, France). Longitudinal serums were tested on the same batch: Pos, positive control; Neg, negative control; V1, serum from patient at visit 1; V2, serum at visit 2 (1 month after V1); and V4, serum at visit 4 (3 months after V1). At V4, the patient was receiving antiretroviral therapy. The criteria for HIV-2 positivity are the presence of at least 1 band for each gene (Env, Gag, and Pol). Thus, the HIV-2 WB performed at V1 was indeterminate, although consistent with an HIV-2 primary infection, whereas the WB performed at V2 and V4 fulfilled the criteria for HIV-2 positivity. C, A consensus phylogenetic tree was built by maximum likelihood method using PhyML v3.1, using a data set composed of protease and reverse transcriptase sequences obtained from the patient and from Los Alamos HIV Database, including HIV-2 groups A and B, as well as SIV viruses. Robustness of the tree was assessed by bootstrapping with 1000 replicates. The tree was edited using FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Serum and plasma samples collected at V1, V2, and subsequent visits were sent to the French HIV-2 reference laboratory for specific serological and molecular assays. An HIV-2-specific

WB assay (New Lav Blot II, BioRad, Marne-la-Coquette, France) was performed on samples at V1, V2, and V4 to document this suspected HIV-2 primary infection. This assay

detects antibodies directed against HIV-2 Env (gp36, gp105, and gp140), Gag (p56, p26, and p16), and Pol (p55 and p34) proteins. At V1, only weak anti-gp140, anti-gp105, anti-p26 bands and faint anti-p16 bands were present (Figure 1). This pattern is highly compatible with a recent HIV-2 seroconversion. The V2 sample (ie, before initiation of antiretroviral therapy) yielded faint anti-p68 and anti-gp36 bands. The HIV-2 WB was fully reactive to all of the antigens at V4 (3 months after V1) (Figure 1).

Plasma HIV-2 RNA quantification was performed on samples collected at V1, V2, V3, V4, V5, and V6 using a Biocentric HIV-2 RNA kit (Biocentric, Bandol, France), with a quantification threshold of 40 copies/mL. At V1, the patient had a HIV-2 plasma viral load of 13 600 copies/mL. One month later, before the antiretroviral treatment was initiated, the viremia had spontaneously decreased to 1270 copies/mL. His HIV-2 viral load was undetectable (<40 copies/mL) 1 month after treatment initiation, and it remained undetectable at subsequent visits (Figure 1).

Genotypic resistance testing was performed on samples collected at V1 and V2. HIV-2 protease, reverse transcriptase, integrase, and the V3 loop of the gp105 regions were sequenced by Sanger technology, as described by the Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS) [1]. Phylogenetic analyses identified this virus as belonging to HIV-2 group A, which is the main epidemic group of HIV-2. No mutations on residues associated with drug resistance were identified, and the predicted viral tropism was CCR5 [2, 3]. The protease, reverse transcriptase, integrase, and the V3 loop of gp105 region sequences were deposited in GenBank under accession numbers MG878085, MG878086, MG878087, and MG878088.

The HIV-2 cellular reservoir was estimated by quantifying HIV-2 total DNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using a recently developed technique with a quantification threshold of 6 HIV-2 total DNA copies per polymerase chain reaction (PCR) [4]. At V4 and V5, the HIV-2 cellular reservoir was detectable, although it was below the threshold of quantification, despite the input of genomic DNA equivalent to 100 000 PBMCs.

## DISCUSSION

To our knowledge, this case report describes the third case of reported primary HIV-2 infection, while it is the first case reported to have occurred after homosexual intercourse. The previous case reports of HIV-2 primary infection were only described serologically [5, 6]. Thus, the current report provides new insights into HIV-2 primary infection dynamics through serological and molecular assays, including viral load and reservoir quantification assessments.

The clinical presentation of this case of HIV-2 primary infection exhibited many similarities with HIV-1, namely upper

respiratory tract symptoms, fatigue, and a transient maculopapular skin rash [7]. Analogous to HIV-1 classification, this patient was diagnosed at Fiebig stage V (RNA-positive, p24 Ag-positive, and an incomplete WB lacking the p34 band), suggesting that the infection occurred at least 3 weeks but less than 4 months prior [8]. The patient's medical and personal history suggest that the infection probably occurred during his last at-risk exposure 5 weeks before the first visit, in line with the Fiebig classification designed for HIV-1.

It has been established that the HIV-2 RNA VL is 30-fold lower than with HIV-1 in chronically infected patients [9], and this appears to be similar during primary infection. As frequently observed in HIV-2 antiretroviral-naïve patients, the HIV-2 cellular reservoir was limited in this patient [10]. Low replication of HIV-2 during the primary infection, which is a critical phase for the establishment of the HIV reservoir, may explain the low level of HIV-2 total DNA observed in this patient. Nevertheless, the early initiation of antiretroviral therapy probably also contributed to limiting the reservoir seeding, as described in HIV-1 [11]. Early initiation of antiretroviral therapy could also be responsible for the slow appearance of HIV-2-specific antibodies on WB. As in most sexually transmitted HIV infections, the transmitted virus displayed no resistance-associated mutations and it had a CCR5 tropism.

Interestingly, during the follow-up of this patient, in addition to the reversal of the CD4/CD8 ratio that is indicative of reduced lymphocyte activation in response to antiretroviral therapy, the CD4 cell count increased by 260/mm<sup>3</sup> in 8 months. This differs from chronically HIV-2-infected patients, for whom CD4 cell count recovery under antiretroviral drugs is often lower than expected, thus highlighting the usefulness of early treatment initiation in HIV-2 as in HIV-1 [12]. However, no extensive immunological characterization could be performed, limiting our knowledge on immunological mechanisms in this primary infection.

During HIV-1 primary infection, 40% to 90% of patients are symptomatic [7]. Diagnosis of HIV-2 primary infections may be limited by a larger proportion of asymptomatic primary infections. We hypothesize that the lower replication of HIV-2 may limit the immune response and the onset of symptoms, which may explain why only 2 HIV-2 primary infections have been reported to date.

Detecting primary HIV-2 infections can also be challenging because of technical hurdles, as HIV-2-specific testing (WB or nucleic acid testing) is not frequently available in routine settings. Although the immuno-differentiation tests recommended in the United States to confirm HIV positivity detect both HIV-2 infections and dual HIV-1/2 infections, only HIV-1-specific WB assays are performed in some countries. Due to the similarity of HIV-1 and HIV-2 capsid proteins (p24 and p26 Ag, respectively), cross-reactivity against HIV-1 p24 Ag on HIV-1-specific WB is a frequent occurrence with HIV-2-infected patients [13].

Some laboratories use HIV-1/2 combined WB, which includes an HIV-2-specific band. However, no combined HIV-1/2 WB tests detect antibodies directed against HIV-2 gp140 and gp105, which along with anti-p26 are the first anti-HIV-2 antibodies to appear. Thus, HIV-1/2 WB may lack sensitivity for HIV-2 primary infections. HIV positivity should always be confirmed with an immune differentiation test followed by specific HIV-1 and HIV-2 DNA PCR to discriminate between cross-reactivity and HIV-1/2 dual infections [14].

In conclusion, this case illustrates for the first time that during HIV-2 primary infection viral replication appears to be limited to the same extent as chronic infection. This patient had a moderate level of viral reservoir in PBMCs, which was probably at least partly due to early initiation of antiretroviral therapy. This also emphasizes the importance of discriminating between HIV-1 and HIV-2 for all new HIV infections, regardless of the patient's risk factors, age, and origin. HIV-2 should be kept in mind as a possibility when screening all patients at risk of HIV and other sexually transmitted infections.

#### Acknowledgments

**Financial support.** No specific funding was received for this work.

**Potential conflicts of interest.** C.N., L.H.Q., A.B., D.S.P., G.L., G.S., D.F., V.B., C.C., S.A., R.R.S., and D.D.: no conflicts. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

#### References

- Charpentier C, Eholié S, Anglaret X, et al; IeDEA West Africa Collaboration. Genotypic resistance profiles of HIV-2-treated patients in West Africa. *AIDS* **2014**; 28:1161–9.
- Charpentier C, Camacho R, Ruelle J, et al. HIV-2EU-supporting standardized HIV-2 drug-resistance interpretation in Europe: an update. *Clin Infect Dis* **2015**; 61:1346–7.
- Visseaux B, Hurtado-Nedelec M, Charpentier C, et al; ANRS CO 05 HIV-2 Cohort. Molecular determinants of HIV-2 R5-X4 tropism in the V3 loop: development of a new genotypic tool. *J Infect Dis* **2012**; 205:111–20.
- Bertine M, Gueudin M, Mflard A, et al. New highly sensitive real-time PCR assay for HIV-2 Group A and Group B DNA quantification. *J Clin Microbiol* **2017**; 55:2850–7.
- Besnier JM, Barin F, Baillou A, et al. Symptomatic HIV-2 primary infection. *Lancet* **1990**; 335:798.
- Christiansen CB, Jessen TE, Nielsen C, Staun-Olsen P. False negative anti-HIV-1/HIV-2 ELISAs in acute HIV-2 infection. *Vox Sang* **1996**; 70:144–7.
- Kassutto S, Rosenberg ES. Primary HIV type 1 infection. *Clin Infect Dis* **2004**; 38:1447–53.
- Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS* **2003**; 17:1871–9.
- Popper SJ, Sarr AD, Travers KU, et al. Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J Infect Dis* **1999**; 180:1116–21.
- Bertine M, Charpentier C, Visseaux B, et al; ANRS CO5 HIV-2 Cohort. High level of APOBEC3F/3G editing in HIV-2 DNA vif and pol sequences from antiretroviral-naïve patients. *AIDS* **2015**; 29:779–84.
- Chun TW, Engel D, Berrey MM, et al. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**; 95:8869–73.
- Matheron S, Damond F, Benard A, et al; ANRS CO5 HIV2 Cohort Study Group. CD4 cell recovery in treated HIV-2-infected adults is lower than expected: results from the French ANRS CO5 HIV-2 cohort. *AIDS* **2006**; 20:459–62.
- Brücker G, Brun-Vezinet F, Rosenheim M, et al. HIV-2 infection in two homosexual men in France. *Lancet* **1987**; 1:223.
- de Mendoza C, Cabezas T, Caballero E, et al; Spanish HIV-2 Network. HIV type 2 epidemic in Spain: challenges and missing opportunities. *AIDS* **2017**; 31:1353–64.