

MEMOIRE

DU DIPLOME INTERUNIVERSITAIRE DE SPECIALISATION

de Biologie Médicale

Soutenu le 03 juillet 2003

par **Dissou AFFOLABI**

PROFIL DE RESISTANCE A L'AMPRENAVIR CHEZ DES SUJETS INFECTES PAR LE HIV-1 ET PRETRAITES PAR DES ANTIPROTEASES

JURY

Président : Monsieur le professeur AGUT Henri

Membres : Monsieur le professeur LEGRAND Alain

Monsieur le docteur CALVEZ Vincent

Monsieur le docteur PEYTAVIN Gilles

Madame le docteur MARCELIN Anne-Geneviève, directeur

REMERCIEMENTS

Je remercie le docteur Anne-Geneviève MARCELIN pour avoir accepté de diriger ce travail. Vous n'avez pas ménagé votre temps pour assurer mon encadrement avec rigueur et méthode.

Je suis très reconnaissant envers le docteur Vincent CALVEZ pour son aide précieuse à toutes les étapes de la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont également à l'adresse des professeurs Henri AGUT et Jean Marie HURAUX qui m'ont accueilli dans leur service et m'ont donné le goût de la virologie. A vous et à tout le personnel du laboratoire de virologie de la Pitié Salpêtrière, grand merci.

Je suis très redevable envers le docteur Gilles PEYTAVIN qui a réalisé tous les dosages pharmacologiques effectués dans le cadre de ce travail. Soyez-en remercié.

Professeur Alain LEGRAND, merci pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. Je suis passé dans votre service au début de l'internat et votre accueil enthousiaste m'a permis de garder un lien fort avec le service.

A tous ceux qui, de près ou de loin, ont participé à la réalisation de ce travail, merci infiniment.

LISTE DES ABREVIATIONS

3TC	lamivudine
AIDS	acquired immunodeficiency syndrom
AMM	autorisation de mise sur le marché
APV	amprénavir
ARV	antirétroviraux
ATU	autorisation temporaire d'utilisation
AZT	zidovudine
CI	concentration inhibitrice
CP	comprimés
CPA	cellules présentant l'antigène
CV	charge virale
CYP	cytochrome P450
D4T	stavudine
DDC	zalcitabine
DDI	didanosine
DLV	delavirdine
EFV	efavirenz
ENV	enveloppe
GAG	group antigen
GEL	gélules
GGT	gamma glutamyl-transférase
GIQ	genotypic inhibitory quotient
HAART	traitements antirétroviraux hautement efficaces
HCV	hepatitis C virus
HIV	virus de l'immunodéficience acquise
IDV	indinavir
IP	inhibiteurs de la protéase
J0	premier jour de traitement
LTR	long terminal repeat
MDR	multi drug resistance
NASBA	nucleic acid sequence based amplification
NNRTI	inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse
NRTI	inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse
NVP	névirapine
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PERF	perfusion
PCR	polymerase chain reaction
POL	polymérase
PR	protéase
r/APV	association ritonavir et amprénavir
RT	transcriptase inverse
RTV	ritonavir
RVA	recombinant virus assay
S4	4è semaine
S8	8è semaine
S12	12è semaine
S18	18è semaine
S24	24è semaine
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
SIV	simian immunodeficiency virus
SOL	solution
SQV	saquinavir
TAMs	thymidine associated mutations

A. INTRODUCTION

I. EPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION A HIV DANS LE MONDE EN 2002

1. Modes de transmission de l'infection à HIV

Le HIV est un virus transmissible par le sang. Cependant, selon la période de l'infection considérée, le virus peut être retrouvé, à différentes concentrations, dans la plupart des compartiments de l'organisme (sang, plasma, liquide céphalo-rachidien, lymphes, urine, sécrétions vaginales, sperme, salive, larmes).

L'infection à HIV peut être transmise selon trois voies : sanguine, sexuelle, et de la mère à l'enfant.

2. Epidémiologie de la pandémie de HIV en 2002

La pandémie que connaît actuellement le monde se compose de multiples épidémies dont l'ancienneté, la dynamique et l'impact sont très différents d'un endroit à l'autre du monde, d'un pays à l'autre d'un même continent, et d'une région à l'autre d'un même pays. Si les modes de transmission du HIV sont partout les mêmes, les comportements qui favorisent la diffusion du virus varient considérablement d'un endroit à l'autre de la planète. Ces comportements sont sous la dépendance des facteurs démographiques, sociaux, religieux, culturels, et psychologiques qui caractérisent les comportements et qui rendent compte de la diversité de la transmission du HIV à travers le monde.

Les progrès réalisés au cours des années 1990 dans la prise en charge thérapeutique de l'infection à HIV sont indéniables et ont littéralement changé la qualité de vie des patients infectés et traités. Cependant, ils n'ont fait que mettre en exergue et accroître l'écart qui existait déjà entre pays riches et pays pauvres.

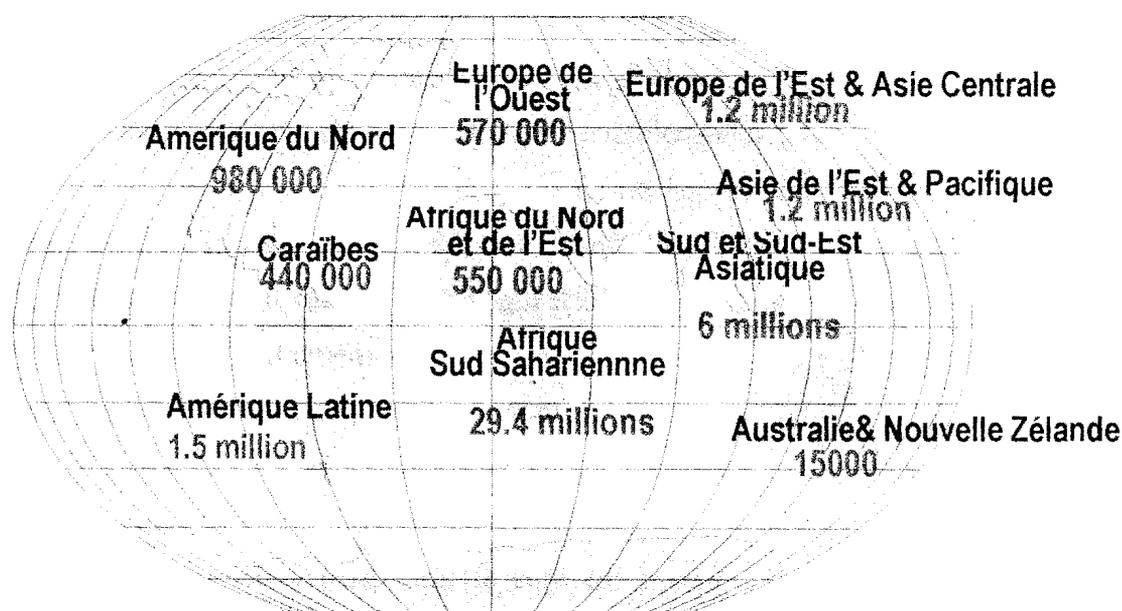
Les pays pauvres rencontrent un grand nombre de difficultés qui sont autant d'obstacles à la lutte contre la diffusion du HIV. Le manque d'infrastructures sanitaires, l'approvisionnement insuffisant en réactifs et en médicaments, empêchent le diagnostic et le traitement rapide des maladies sexuellement transmissibles (MST) classiques qui fragilisent les muqueuses génitales et facilitent la transmission sexuelle du HIV. La difficulté d'accès aux préservatifs, l'allaitement maternel quasi-systématique faute de lait artificiel disponible, l'absence de matériel stérile jetable dans les hôpitaux, les pesanteurs socio-culturelles sont d'autres problèmes auxquels ces pays sont confrontés.

Pourtant, l'efficacité de traitements courts chez la femme enceinte a été établie et permettrait de réduire considérablement le nombre d'enfants contaminés dans le monde.

A la fin de l'année 2002, 42 millions de personnes vivaient avec l'infection à HIV à travers le monde dont la grande majorité vit dans des pays en voie de développement (**Figure 1**).

Ces chiffres sont très préoccupants et l'avenir de certaines régions du continent africain paraît sombre. Mais la situation n'est cependant pas irrémédiable, et un certain nombre de gouvernements ont déjà engagé le combat contre le HIV.

Personnes vivant avec le HIV à la fin de l'année 2002



Total: 42 millions

Figure 1 : Caractéristiques de l'épidémie à HIV par région dans le monde à la fin 2002. L'infection à HIV est présente dans tous les pays. A la fin 2002, on dénombre 42 millions de personnes infectées par le HIV à travers le monde, dont 95 % vivent dans des pays en voie de développement (Source OMS, 2003)

II. BASES VIROLOGIQUES DE L'INFECTION A HIV

1. Définition et classification des rétrovirus

Les HIV-1 et HIV-2 appartiennent à la famille des rétrovirus. Cette famille comporte des virus enveloppés à ARN, caractérisés par une étape de réplication particulière : la rétrotranscription. Cette dernière est possible grâce à une enzyme présente dans le virus : la transcriptase inverse (ou "reverse transcriptase") qui rétrotranscrit leur matériel génétique, constitué de 2 molécules d'ARN, en ADN complémentaire (ADNc). L'ADNc ainsi obtenu s'intègre alors dans le génome de l'hôte sous forme de provirus.

Plusieurs classifications de rétrovirus ont été établies. Dans les années 1970, la classification des rétrovirus reposait sur la morphologie et la maturation des particules virales (types A à D de Harven, 1974). Actuellement, cette famille comporte 7 genres définis selon des critères de pathogénie et de phylogénie (virus taxonomy 2000).

- Les *Alpharétrovirus* possèdent un core concentrique de type C, comme le virus de la leucose aviaire (ALV pour "Avian Leukosis Virus").

- Les *Betarétrovirus*, dont le core est excentré ou cylindrique, assemblent leurs particules dans le cytoplasme et bourgeonnent à la surface de la membrane cellulaire. Ils sont représentés par le virus de la tumeur mammaire de la souris (MMTV pour "Mouse Mammary Tumour Virus").

- Les *Gammarétrovirus* ont également un core central et sphérique de type C. La capsid s'assemble à la surface interne de la membrane cellulaire, de façon simultanée au bourgeonnement. Ils infectent les mammifères, les reptiles et les oiseaux. Ils sont représentés par le MLV (Murin Leukemia Virus).

- Les *Deltarétrovirus* sont similaires aux gammarétrovirus en termes de morphologie et d'assemblage. Ils sont représentés par le virus de la leucémie bovine (BLV pour "Bovin Leukemia Virus") ou les virus HTLV (Human T-cell Leukemia Virus). Les HTLV ont été identifiés à la fin des années 1970 chez des patients atteints de leucémie T ou de lymphome cutané (HTLV-1), puis chez un patient atteint d'une leucémie à tricholeucocytes (HTLV-2). Ces virus possèdent un pouvoir transformant sur les lymphocytes T CD4+ *in vitro*.

- Les *Epsilonrétrovirus* sont des virus affectant les poissons, comme le virus WDSV (pour "Walleye Dermal Sarcoma Virus").

- Les *Spumavirus* ont un core central et sphérique. L'assemblage de la capsid se fait dans le cytoplasme. Ils ne sont pour l'instant associés à aucune pathologie, ni chez l'homme, ni

chez l'animal, mais induisent une vacuolisation des cellules en culture, comme HFV (pour "Human Foavy Virus").

- Les *Lentivirus* ont un core particulier de structure icosaédrique. Ces virus infectent de nombreuses espèces animales telles que les primates (SIV pour "Simian Immunodeficiency Virus"), les chèvres, les chevaux, les chats, et le bétail. Ils provoquent des infections persistantes et génèrent des maladies à évolution lente et chronique. Les HIV, responsables du SIDA chez l'homme, appartiennent à ce genre. Deux virus ont été identifiés à ce jour. Le HIV-1 est répandu en Europe, aux Etats-Unis, en Afrique centrale et orientale, et en Asie. Le HIV-2, quant à lui, est surtout présent en Afrique de l'Ouest. L'organisation génétique de ces 2 virus est similaire. Seules quelques protéines dites "auxiliaires ou accessoires" diffèrent. Le genre *Lentivirus* est caractérisé par une très grande variabilité génétique comme nous le verrons ci-dessous.

2. Morphologie et structure du HIV

2.1. Morphologie du HIV-1

Les particules de HIV-1, observées en microscopie électronique, ont un aspect sphérique (Barre-Sanoussi 2001). Leur diamètre est de 90 à 120 nanomètres (nm) (**Figure 2**).

Le HIV-1 est un virus enveloppé. Son enveloppe phospholipidique se forme par bourgeonnement aux dépens de la membrane de la cellule hôte infectée. On y retrouve 2 protéines d'origine virale ancrées, la glycoprotéine d'enveloppe externe gp120 et une protéine transmembranaire gp41 (TM). Ces deux protéines sont associées de façon non covalente et proviennent du clivage enzymatique d'un même précurseur glycoprotéique, gp160.

L'intérieur de la particule virale est tapissé des protéines de la matrice p17-18 (MA) et contient également la protéase virale p12 (PR).

La nucléocapside, de forme trapézoïdale, est constituée de la protéine p24 (CA). On y trouve la protéine de nucléocapside p7 (NC), 2 des 3 enzymes virales (la transcriptase inverse p68 ou RT, et l'intégrase p34 ou INT), et le matériel génétique viral sous la forme de 2 molécules d'ARN identiques.

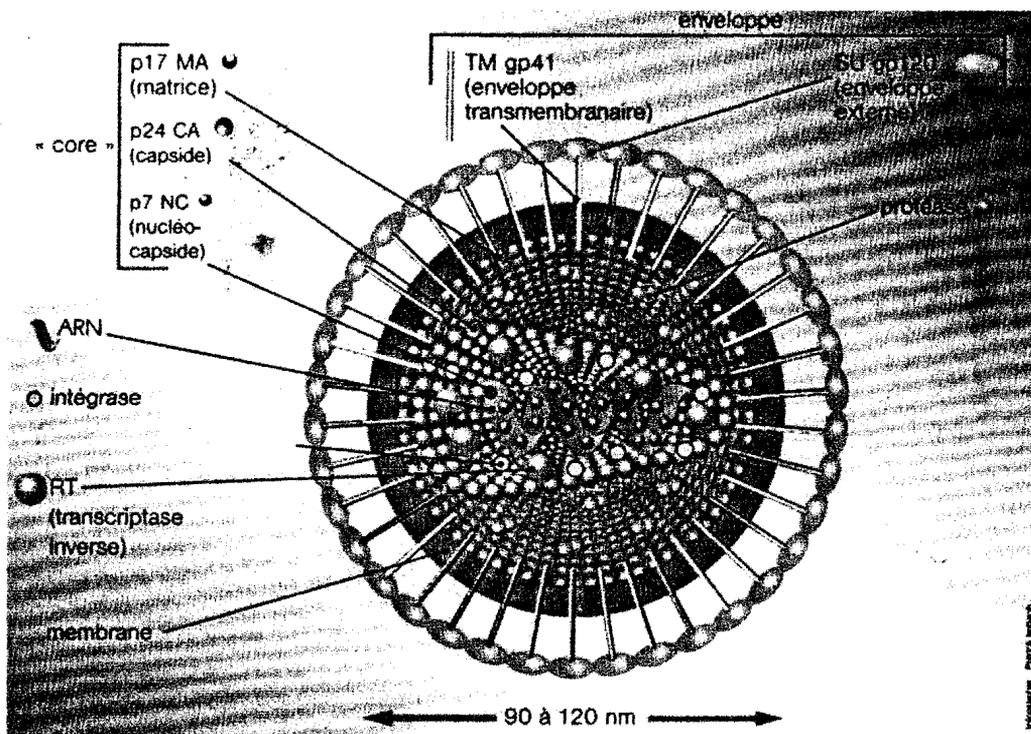


Figure 2 : Structure du HIV (d'après F. Barré-Sanoussi, Les VIH, rappel virologique, Impact Médecin Guide Infection à HIV 2001, 17-26, illustration : P. Imbach).

2.2. Morphologie du HIV-2

L'organisation générale du HIV-2 est identique à celle du HIV-1. Cependant, le HIV-2 est plus proche du virus simien SIVmac (72 % d'homologie), que du HIV-1 (42 % d'homologie). Cela implique l'existence de protéines de poids moléculaire différent entre HIV-1 et HIV-2, qu'il s'agisse des protéines internes ou des protéines d'enveloppe.

Ainsi, on retrouve pour le HIV-2, une glycoprotéine d'enveloppe externe gp105 (au lieu de gp120 pour le HIV-1) et une protéine transmembranaire gp36 (au lieu de gp41 pour le HIV-1).

L'intérieur de la particule virale est tapissé des protéines de la matrice p16 et contient également la protéase virale p12 (PR).

La nucléocapsidie, de forme trapézoïdale, est constituée de la protéine p26. On y trouve la protéine de nucléocapsidie p7 (NC), 2 des 3 enzymes virales (la transcriptase inverse p68 ou RT, et l'intégrase p34 ou int), et le matériel génétique viral sous la forme de 2 molécules d'ARN identiques.

2.3. Structure du génome

L'organisation du génome du HIV est commune à tous les rétrovirus. Chaque molécule d'ARN possède à ses extrémités une région répétitive appelée R, importante pour l'intégration du virus à l'ADN cellulaire, et des régions appelées U5 et U3. Ces régions répondent également à la dénomination de séquences LTR ("Long Terminal Repeat"). Une molécule d'ARN d'une longueur d'environ 9000 nucléotides comprend les 3 gènes *gag* (group antigen), *pol* (polymérase), et *env* (enveloppe) de l'extrémité 5' à l'extrémité 3', soit une séquence linéaire du type 5'LTR-*gag-pol-env*-LTR3' (Figure 3).

Le gène *gag* code un précurseur protéique p55 *gag* dont le clivage par la protéase virale donne naissance aux protéines p17-18 MA (matrice), p24 CA (capside), et p15 (nucléocapside) généralement dissociée en p9 et p7.

Le gène Pro-Pol code un précurseur polypeptidique p160 *gag-ProPol* qui est clivé en protéines p12 PR (protéase responsable du clivage des protéines *gag* et *pol*), p51-66 RT (hétérodimère de la transcriptase inverse, les 2 sous-unités différant par la présence sur l'une d'elle de la RNase H), et p32 (intégrase).

Le gène *env* code un précurseur glycoprotéique gp160 *env* qui est clivé par des protéases cellulaires en glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41 (TM).

Cependant, la présence de nombreux gènes de régulation différencie les HIV des autres rétrovirus. En effet, ceux-ci contiennent au moins 6 gènes supplémentaires qui codent des protéines de régulation : *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, et *nef*.

Le gène *vif* ("virion infectivity factor") code une protéine p23-24 qui augmenterait le pouvoir infectieux du virus pour les cellules cibles.

Le gène *vpr* ("virion protein r") code une protéine p15 qui activerait le transport de l'ADN viral vers le noyau et stopperait le cycle cellulaire en phase G₂/M.

Le gène *tat* ("transactivator") code une protéine p14 qui agit sur la transcription. Elle activerait une séquence cible TAR située sur l'ARN viral, dans la région LTR en 5', après le site d'amorçage de la transcriptase inverse. Cette même protéine *tat* aurait également un rôle sur le transport post-transcriptionnel des ARNm viraux.

Le gène *rev* ("regulator of virion proteins") code une protéine p19 qui stabiliserait et faciliterait le transport des ARNm longs des protéines *gag*, *pol* et *env*.

Le gène *vpu* ou *vpx* pour le HIV-2 ("virion protein u" ou "x"), code une protéine p16 phosphorylée qui jouerait un rôle dans la dégradation du lymphocyte T CD4+, et dans l'assemblage et la sortie de la particule virale.

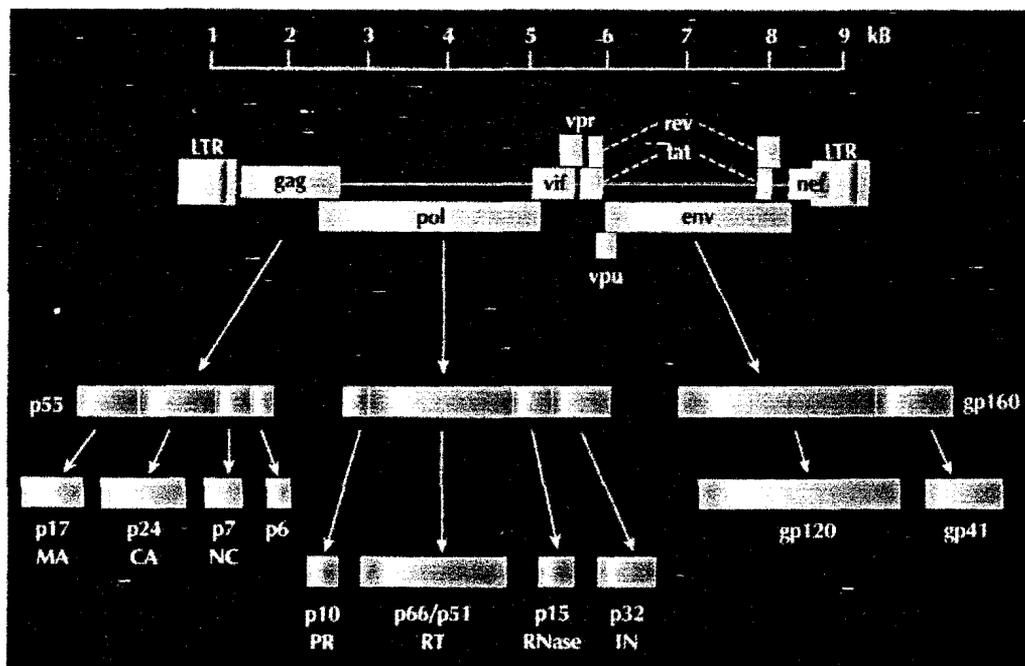


Figure 3 : Organisation du génome du HIV-1. Les deux molécules d'ARN formant le génome du HIV-1 sont identiques. Chacune de ces molécules a une longueur d'environ 9000 nucléotides. Elle comporte de 5' en 3' les gènes *gag*, *pol* et *env* et à chaque extrémité une région appelée LTR. Chaque gène code un précurseur protéique, qui est ensuite clivé par des protéases cellulaires ou virales (d'après J. Erickson, HIV Resistance and Implications for Therapy, 2nde édition, Section 1 : Virology, Gilead Science).

Le gène nef ("negative factor") code une protéine p27-28 qui ralentit l'expression virale *in vitro*. La réplication des virus mutés, défectifs en gène nef, est 2 à 10 fois plus importante que celle des virus non mutés.

2.4. La transcriptase inverse (ou reverse transcriptase ou RT)

La transcriptase inverse est une enzyme spécifique des Rétrovirus. Elle intervient au début du cycle de réplication du HIV, dès que le virus se retrouve dans le cytoplasme de la cellule hôte. C'est une ADN polymérase ARN et ADN dépendante qui catalyse la synthèse d'ADN proviral à partir de l'ARN génomique du HIV, permettant ainsi son intégration dans le génome cellulaire. La synthèse de l'ADN viral est uniquement réalisée par la RT qui a un rôle triple : ADN polymérase ARN dépendante, RNase H (hydrolyse d'un brin d'ARN hybridé à un brin d'ADN) et ADN polymérase ADN dépendante.

Elle se présente sous la forme d'un hétérodimère multifonctionnel composé de 2 sous-unités. Une sous unité de 66 kDa et 560 acides aminés (appelée p66), responsable de l'activité enzymatique, et une sous-unité de 51 kDa et 440 acides aminés (appelée p51), sans activité enzymatique mais nécessaire au fonctionnement de la RT.

2.5. La protéase (PR)

La protéase du HIV (PR), contrairement à la RT qui intervient au tout début du cycle de réplication, joue un rôle dans les étapes post-transcriptionnelles. Elle est requise pour l'assemblage et l'infectivité des particules virales. Elle découpe les précurseurs polyprotéiques des protéines de structure et des enzymes de réplication du virus, donnant naissance à des protéines matures, fonctionnelles et infectieuses.

2.5.1. Classification des protéases virales

Les protéases virales sont des endopeptidases. Ces enzymes reconnaissent et se lient aux acides aminés entourant un site de clivage spécifique. La classification des protéases repose sur leur mécanisme d'action. On distingue 2 groupes : les Sérine/Cystéine protéases et les Aspartate protéases (Bazan *et al.* 1988).

Dans le cas des Sérine/Cystéine protéases, un résidu sérine ou cystéine de l'enzyme est important pour l'activité catalytique. Dans le cas des aspartate protéases, on retrouve toujours l'association des acides aminés Aspartate (Asp ou D)-Thréonine (Thr ou T) / Sérine (Ser ou S)-Glycine (Gly ou G). Les protéases virales ne contiennent qu'un seul motif DTG et leur séquence est moitié moins longue. Les protéases du HIV appartiennent à cette famille des protéases aspartiques.

2.5.2. Structure de la protéase du HIV

Elle est constituée de deux monomères apportant chacun la séquence caractéristique Asp²⁵-Thr²⁶-Gly²⁷. Seule la forme dimérique est active. Elle se présente sous la forme d'un homodimère constitué de 2 polypeptides identiques de 99 acides aminés qui s'assemblent pour former le site actif de l'enzyme (**Figure 4**). Les 2 sous-unités sont associées de façon non covalente et liées entre elles par l'intermédiaire de 4 feuillets antiparallèles β impliquant les extrémités N et C terminales. Chaque polypeptide comporte une Proline en N-terminal et une Phénylalanine en C-terminal. Repliée dans l'espace, la séquence polypeptidique d'un monomère s'organise en 9 feuillets plissés β et une petite hélice α .

Le site actif est constitué par une excavation centrale située à l'interface des 2 sous-unités. Il forme un tunnel de 23 Å de long qui permet une interaction avec 7 à 9 acides aminés des substrats protéiques. Ce tunnel est recouvert par des structures en épingle à cheveux, appelées volets ou "flaps", riches en glycine. Sous sa forme apoenzyme de la protéase, les volets adoptent une conformation ouverte et sont distants de 7 Å du site catalytique. L'interaction avec le substrat provoque des modifications dans la structure de l'enzyme. L'ouverture des volets permet l'entrée des substrats et la sortie des produits clivés de l'excavation centrale du site actif (Gustchina *et al.* 1990). Au niveau du plancher du site actif, on retrouve le site catalytique de la protéase caractérisé par les 2 séquences Asp²⁵-Thr²⁶-Gly²⁷, chacune située sur une boucle d'un monomère. La substitution d'un résidu du site actif, par exemple en asparagine (D25N) (Darke *et al.* 1989; Kohl *et al.* 1988) ou en sérine (A28S et T26S) (Mous *et al.* 1988; Seelmeier *et al.* 1988) provoque une baisse de l'activité de la protéase.

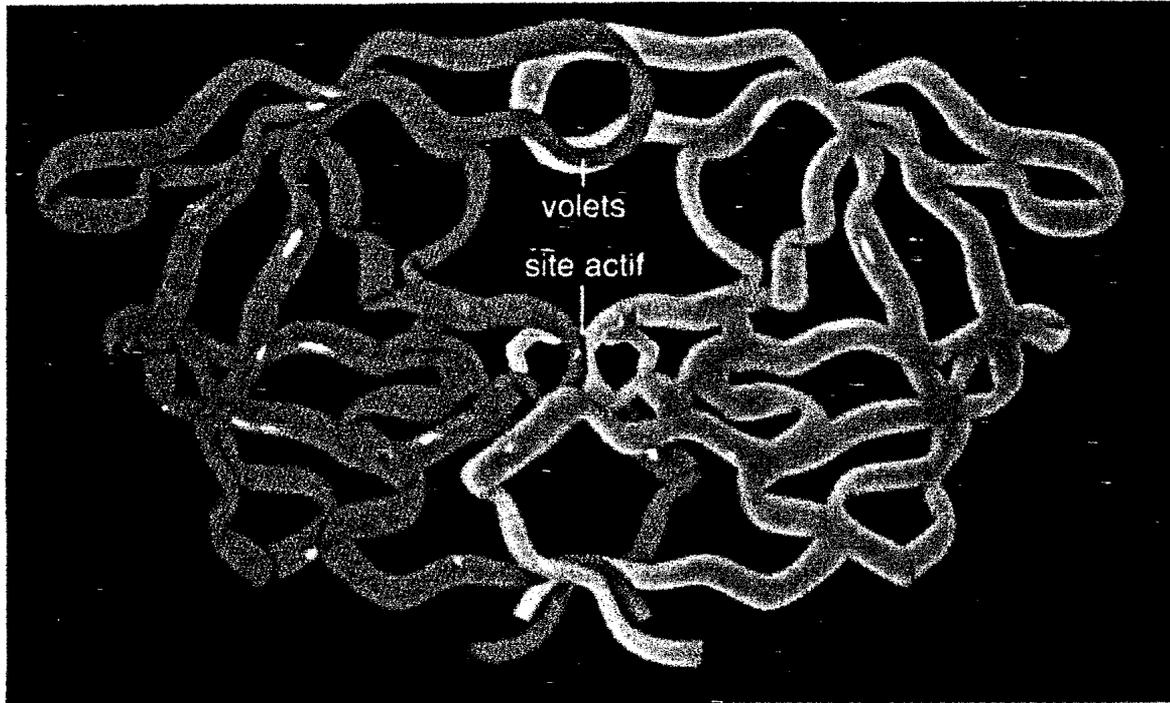


Figure 4 : Structure de la protéase du HIV-1. La protéase se présente comme un homodimère constitué de 2 polypeptides identiques de 99 acides aminés. Repliée dans l'espace, la séquence polypeptidique d'un monomère s'organise en 9 feuillets plissés β et une petite hélice α . Le site actif est une excavation centrale située à l'interface des 2 sous-unités. Il forme un tunnel de 23 Å de long qui permet une interaction avec 7 à 9 acides aminés des substrats protéiques. Les volets sont des structures en épingle qui, selon leur conformation, permettent l'entrée des substrats et la sortie des produits clivés du site actif. (Abbott Pharmacie, 1998).

Plusieurs régions sont bien conservées entre les protéases des rétrovirus : les acides aminés 1 à 9 (séquence N terminale), 21 à 32 (séquence autour du site catalytique), 47 à 56 (volets), 78 à 88 (région de la liaison avec le substrat) et 94 à 99 (séquence C terminale) (Fontenot *et al.* 1992). L'homologie entre les protéases du HIV-1 et du HIV-2 est d'environ 50 %. Toutefois, les structures secondaires et tertiaires sont majoritairement conservées entre les 2 enzymes.

2.5.3. Biochimie de la protéase du HIV

La protéase est une aspartate-protéase, cette dénomination est en rapport avec la présence de 2 aspartates catalytiques au niveau du site actif de l'enzyme respectivement en position 25 et 25' de chacun des 2 monomères. Malgré la nature symétrique de l'enzyme, le substrat peptidique est, quant à lui, asymétrique. Il se lie donc de façon pseudosymétrique dans la cavité du site actif. Cette interaction est stabilisée par des liaisons non covalentes (liaisons hydrogènes ou hydrophobes).

Le mécanisme de catalyse de la liaison peptidique par la protéase est classique. La molécule d'eau, activée par l'aspartate Asp²⁵ déprotoné, réalise une attaque nucléophile du carbonyle de la liaison peptidique scissile (**figure 5**). Il se forme transitoirement un intermédiaire tétraédrique zwitterionique, l'aspartate ayant cédé un proton à l'azote de la liaison amide. Cet intermédiaire instable se décompose pour conduire aux 2 produits de la réaction, l'acide et l'amine. La coupure de la liaison C-N est considérée comme l'étape lente de la réaction.

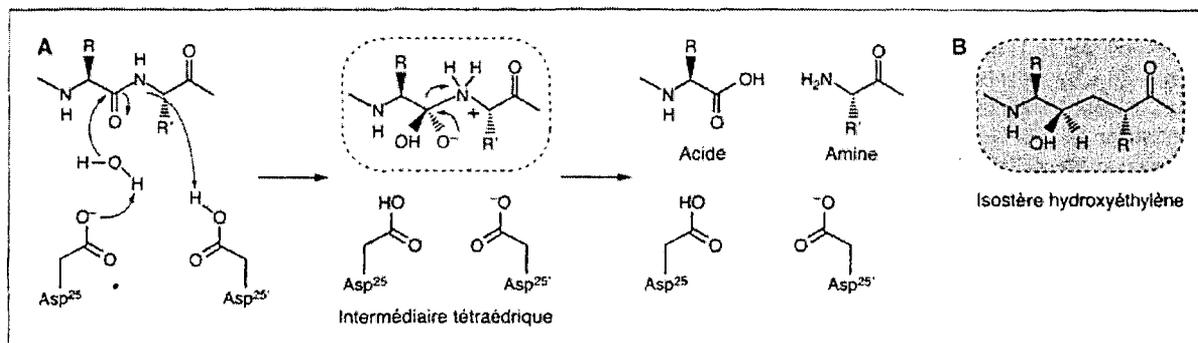


Figure 5 : A. Mécanisme postulé pour l'hydrolyse des liaisons peptidiques catalysée par la PR. La molécule d'eau liée aux aspartates Asp²⁵ et Asp^{25'} par des liaisons hydrogènes, réalise une attaque nucléophile du carbonyle de la liaison peptidique scissile. L'intermédiaire tétraédrique zwitterionique formé transitoirement est représenté. **B. Isostère hydroxyéthylène mimant l'état de transition** (d'après N. Boggetto et M. Reboud-Ravaux, La protéase du HIV et le développement d'inhibiteurs, *Virologie* 2001, 5 : S9-18).

La protéase reconnaît douze sites de coupure, onze différents au niveau des polyprotéines gag et gag-pol et un au niveau de la protéine nef. Elle réalise des coupures entre un acide aminé aromatique, Tyrosine (Tyr) ou Phénylalanine (Phe), et une proline (Pro). Les endopeptidases de mammifères (rénine, pepsine) ne pouvant couper de telles liaisons peptidiques, on a développé des molécules comportant un mime de la liaison Tyr/Phe-Pro afin d'obtenir des inhibiteurs spécifiques de la PR. Celle-ci coupe également d'autres liaisons peptidiques notamment la liaison Leucine (Leu) - Alanine (Ala) proche de la liaison Leu¹⁰-Val¹¹ de l'angiotensinogène coupée par la rénine. D'où l'idée d'utiliser des inhibiteurs de la rénine ou des molécules dérivées pour inhiber la PR. Il existe une troisième catégorie de sites de coupure. Il s'agit de séquences ayant une symétrie de part et d'autre de la liaison coupée. La coupure a lieu entre 2 acides aminés hydrophobes, Méthionine (Met) - Méthionine (Met), Phe-Leu et Leu-Phe. Cela a conduit à la recherche d'inhibiteurs symétriques.

Tout changement des acides aminés tapissant la face interne du site actif de la protéase est susceptible de décroître l'affinité de l'inhibiteur pour sa cible tout en restant tolérable pour la fonction de la protéase. Cela constituera un avantage sélectif pour la réplication du virus en présence de cet inhibiteur.

3. Cycle de réplication du HIV

Le cycle de réplication du HIV peut être schématiquement séparé en 2 phases. Une phase précoce, correspondant à l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire, et une phase plus tardive qui aboutit à la formation de nouveaux virions infectants (**Figure 6**).

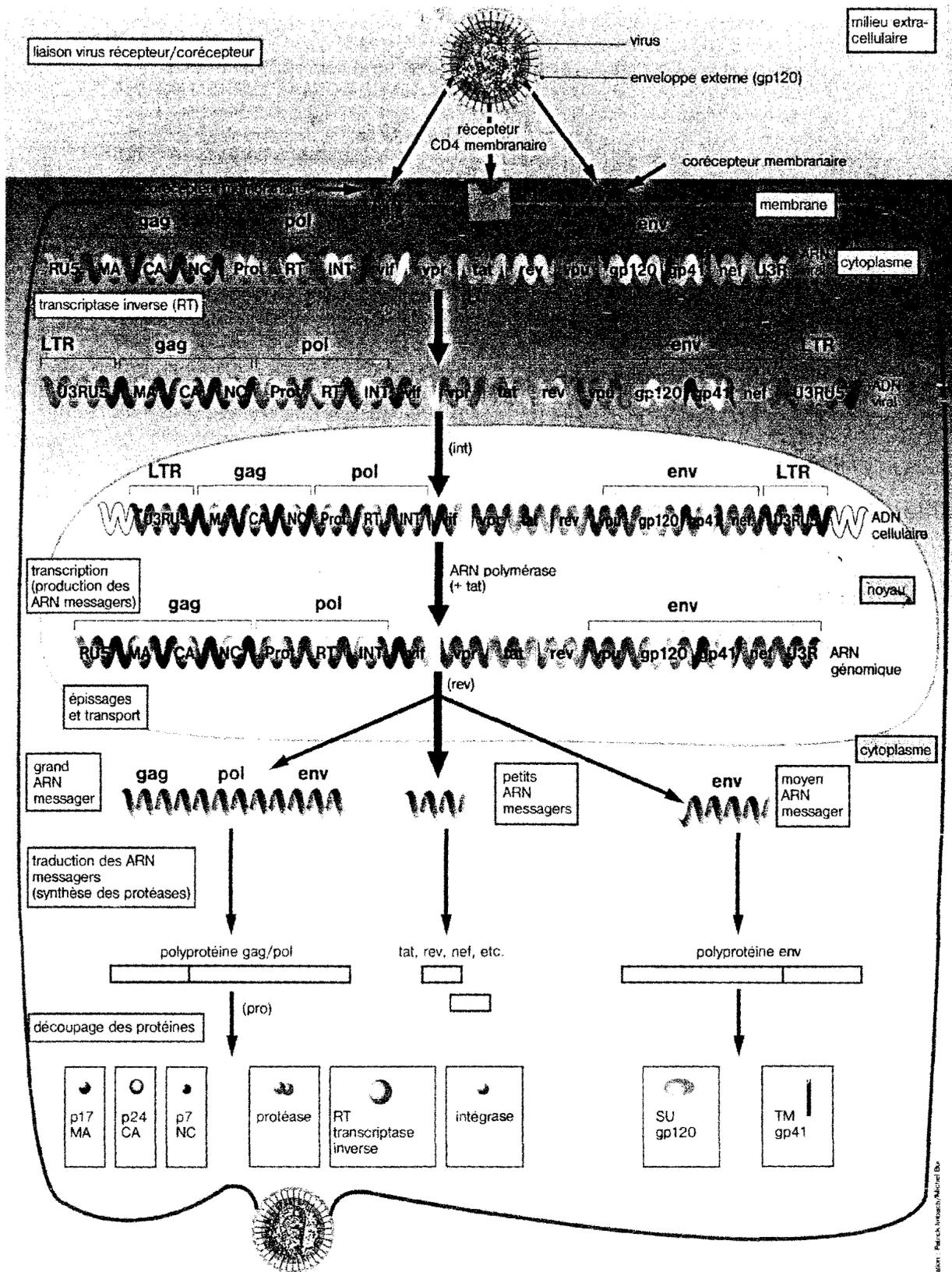


Figure 6 : Cycle de répliation des HIV (d'après F. Barré-Sanoussi, Les VIH, rappel virologique, Impact Médecin Guide Infection à HIV 2001, 17-26, illustration : P. Imbach et M. Bui).

3.1. Événements précoces du cycle de réplication du HIV

Ils comportent 3 temps majeurs :

3.1.1. Reconnaissance et entrée du virus dans la cellule cible

L'entrée du virus dans la cellule cible résulte, dans un premier temps, de la reconnaissance spécifique et forte entre la glycoprotéine extra-membranaire gp120 (SU) du HIV et la molécule CD4, qui est son récepteur de haute affinité, à la surface du lymphocyte T (**Figure 7**).

Cette reconnaissance va provoquer, dans un second temps, un changement conformationnel de la gp120 (SU). Ce changement va permettre à une région particulière de la gp120 (notamment le domaine V3) d'entrer en contact avec des co-récepteurs présents à la surface de la cellule cible. Une quinzaine de co-récepteurs ont été décrits dans le cadre de l'infection à HIV, les 2 principaux sont le CCR5 et le CXCR4, tous deux récepteurs de chimiokines en temps normal.

L'interaction entre la gp120 et le co-récepteur va provoquer la fusion de l'enveloppe virale avec l'enveloppe cellulaire, et ce par l'intermédiaire de la gp41 (TM).

Le résultat de cette fusion est la pénétration de la nucléocapside du HIV dans le cytoplasme de la cellule cible.

3.1.2. Rétrotranscription de l'ARN viral en ADN viral complémentaire

Il s'agit d'une étape essentielle du cycle de réplication du HIV. Elle a lieu dès que la nucléocapside se retrouve dans le cytoplasme de la cellule cible. Elle consiste en la rétrotranscription de l'ARN viral en ADNc grâce à une enzyme virale : la transcriptase inverse (RT). Le brin d'ADN de polarité négative ainsi produit sert de matrice pour la synthèse d'un brin de polarité positive.

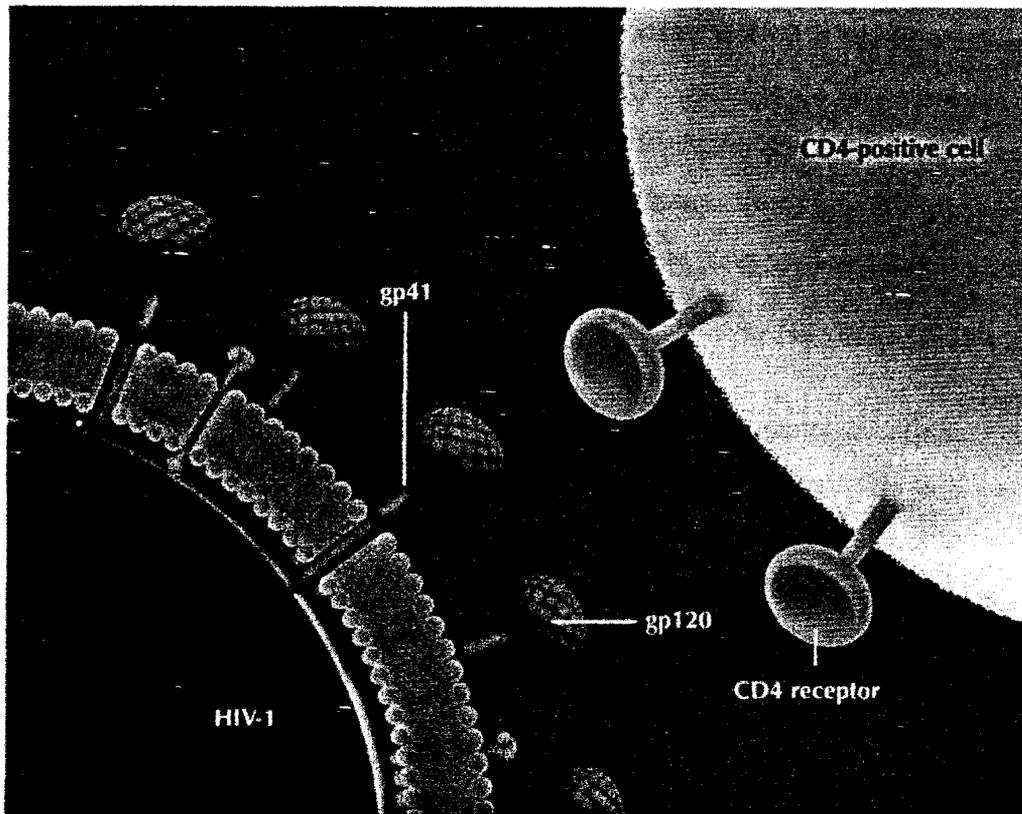


Figure 7 : Représentation de l'interaction des glycoprotéines d'enveloppe du HIV-1 avec le récepteur CD4. La reconnaissance entre la gp120 du HIV-1 et la molécule CD4 du lymphocyte entraîne une modification conformationnelle de la gp120 permettant son interaction avec des co-récepteurs puis la fusion des enveloppes virale et cellulaire (d'après J. Erickson, HIV Resistance and Implications for Therapy, 2nde édition, Section 1 : Virology, Gilead Science).

3.1.3. Import nucléaire et intégration de l'ADN viral à l'ADN cellulaire

L'import nucléaire de l'ADN est une propriété essentielle des lentivirus. Cette famille de rétrovirus est capable d'infecter les cellules indépendamment de la division cellulaire et donc de la mitose. L'indépendance de l'intégration du HIV vis-à-vis de la mitose implique que le génome viral, imbriqué dans un complexe de préintégration soit importé activement dans le noyau en 2 étapes : le routage vers le noyau et la translocation à travers les pores nucléaires (Bukrinsky *et al.* 1992). Ce complexe est formé de protéines virales et de protéines cellulaires, comme les importines qui permettent à l'ADN viral d'accéder à l'intérieur du noyau de la cellule.

L'intégration du génome viral se fait ensuite au hasard dans le génome cellulaire au niveau de sites non spécifiques avec, cependant, une prédilection pour les zones de faible condensation chromosomique.

Pour cela, l'intégrase virale clive l'ADN cellulaire et l'ADN viral au niveau des séquences LTR, permettant l'intégration proprement dite du génome viral au génome de la cellule. Cette intégration se fait en 3 étapes. L'enzyme reconnaît les séquences terminales de l'ADN viral situées dans les 2 LTR et retire les dinucléotides terminaux en 3' par une activité endonucléase. Puis, ces 2 extrémités 3' de l'ADN viral se lient de façon covalente avec l'ADN cellulaire (transfert de brin). Les régions simple brin sont ensuite réparées par des mécanismes cellulaires, et également viraux. L'ADN viral prend alors le nom de provirus.

3.2. Evénements tardifs du cycle de réplication du HIV

3.2.1. Etapes transcriptionnelles

La transcription de l'ADN proviral en ARN est réalisée grâce à une enzyme cellulaire : l'ARN polymérase II. La synthèse de l'ARN proviral débute à l'extrémité 5' et se termine à l'extrémité 3' qui contient les signaux permettant l'arrêt de la transcription et la maturation des ARN néosynthétisés par attachement d'une queue polyA en 3'. L'expression du provirus est liée, en partie à des signaux cellulaires, et en partie à des signaux viraux.

Le LTR en 5' sert de promoteur à cette synthèse lorsqu'il interagit avec des facteurs cellulaires comme le NF Kappa B. La présence de ces facteurs au niveau des noyaux dépend de l'état d'activation des cellules. En effet, lorsque la cellule infectée interagit avec une autre cellule de

son environnement, ou lorsqu'elle est stimulée par un facteur soluble (lymphokine ou cytokine), elle s'active et des signaux sont émis, permettant le passage de facteurs tels que le NF Kappa B au niveau du noyau. Ainsi, la réplication virale est directement liée à l'état d'activation de la cellule infectée.

Des protéines virales jouent également un rôle important dans la synthèse de l'ARN viral. La protéine régulatrice tat du HIV se fixe sur la séquence TAR (Transactivating Response Element), présente à l'extrémité 5' des ARN en cours de synthèse, augmentant le taux de transcription 100 à 1000 fois. Quant à la protéine rev, elle facilite le transport de l'ARN (sous forme complète de 9000 nucléotides et sous forme réduite) dans le cytoplasme de la cellule infectée.

3.2.2. Etapes post-transcriptionnelles

Les ARNm viraux formés subissent, comme les ARNm cellulaires, des modifications post-transcriptionnelles : épissage, addition d'une coiffe en 5', polyadénylation en 3'.

Ils sont traduits en protéines virales dans le cytoplasme grâce à la machinerie cellulaire.

Les ARNm de petite taille donnent naissance aux protéines de régulation du HIV. Les ARNm de taille moyenne et de taille plus importante, comportant les gènes gag, pol, et env, génèrent les protéines constitutives du HIV. Ces protéines sont synthétisées sous forme de protéines de fusion (polyprotéines) qui vont être clivées par la protéase virale ou par des protéases cellulaires dans un second temps. Chez tous les rétrovirus, les trois principales polyprotéines Gag (p55), Gag-Pol (p160) et Env (gp160) doivent subir des modifications protéolytiques indispensables au pouvoir infectieux du virus. Contrairement au précurseur gp160 qui est clivé par les protéases cellulaires dans l'appareil de golgi, les précurseurs polypeptidiques Gag et Gag-Pol sont clivés par la protéase virale. Le précurseur Gag libère les protéines structurales : la matrice (p17), la capsid (p24), la nucléocapsid (p7) et le peptide p6. Le précurseur Gag-Pol libère également les protéines structurales mais aussi les protéines enzymatiques : la protéase (p12), la transcriptase inverse (p66/p51) et l'intégrase (p32). Le précurseur gp160-Env des glycoprotéines d'enveloppe est synthétisé au niveau des polyribosomes associés au réticulum endoplasmique granuleux.

De façon concomitante à ces clivages, la transcription complète du génome produit l'ARN génomique viral.

Les derniers stades du cycle de réplication du HIV comprennent 2 temps. Dans un premier temps, il se produit l'assemblage des précurseurs des protéines virales avec 2 molécules

d'ARN viral à proximité de la membrane cellulaire. Dans un second temps, ce processus d'assemblage aboutit à la sortie des virus par bourgeonnement des particules virales à la surface de la cellule infectée. Les virus ainsi produits et libérés dans le plasma sont immatures. Ce n'est donc qu'à l'extérieur de la cellule, lorsque la protéase clive les précurseurs Gag et Gag-Pol, que les virus deviennent matures et donc infectieux. Les virus défectifs pour le gène de la protéase produisent des virus immatures et donc non infectieux.

4. Tropisme cellulaire des HIV : rôle des co-récepteurs

L'entrée du HIV dans sa cellule cible est possible grâce à la liaison spécifique et de forte affinité entre une gp120 virale et une molécule CD4 de la surface cellulaire. Cette molécule CD4 est présente en grande quantité à la surface des lymphocytes T auxiliaires ou "helpers". Mais elle est également exprimée, en plus faible quantité, à la surface de nombreuses cellules présentatrices d'antigènes (CPA) : monocytes, macrophages, cellules dendritiques, cellules de Langerhans. Cependant, d'autres molécules sont nécessaires à la pénétration du virus dans la cellule. Ces récepteurs accessoires, ou co-récepteurs, sont, à l'état normal, des récepteurs de chimiokines. Une quinzaine de co-récepteurs du HIV ont été décrits, mais les deux principaux sont le CCR5 et le CXCR4.

Le HIV infecte surtout les lymphocytes CD4+ dans le sang et, à un degré bien moindre, les CPA dans les tissus. Mais, même si la réplication du HIV est peu importante dans les CPA, ces cellules représentent un réservoir permanent de virus. Les CPA pourraient donc être impliquées dans la "latence" du virus (Agut 2000).

III. IMMUNOPATHOLOGIE DE L'INFECTION A HIV

1. Déficit immunitaire associé à l'infection à HIV

Il est d'autant plus important que l'infection est ancienne. Il s'agit d'abord d'un déficit qualitatif et quantitatif des lymphocytes CD4+. Les lymphocytes du sang circulant ne représentent que 2 % des lymphocytes totaux. Le taux normal de lymphocytes CD4+ dans le sang circulant est de 500 à 2000 / mm³, soit 35 % à 45 % des lymphocytes T matures périphériques. Le taux normal de lymphocytes CD8+ est deux fois moindre. Le principal signe du déficit immunitaire est représenté par la lymphopénie CD4 et l'inversion du rapport CD4 / CD8 qui

devient inférieur à un. Cette lymphopénie est progressive, elle se majore au fur et à mesure de la progression de la maladie pour devenir maximale 6 à 10 ans après la primo-infection. La perte en lymphocytes CD4+ est évaluée à 50 cellules / mm³ par jour soit 10⁹ cellules, avec des variations interindividuelles importantes (Carcelain *et al.* 2001a). Le mécanisme exact responsable de la destruction du système immunitaire n'est pas encore totalement élucidé. On pense qu'il s'agirait de l'association de l'effet cytopathogène du HIV (mais l'importance réelle de cet effet reste inconnue) et d'une augmentation de l'apoptose. Les CD4 sont les premiers touchés, cela explique la disparition souvent très précoce des réactions d'hypersensibilité retardée cutanée. De nombreuses autres anomalies fonctionnelles apparaissent par la suite et ont pour conséquences une sensibilité accrue aux infections, une mauvaise réponse aux vaccinations et un développement plus fréquent de néoplasies.

2. Evolution immunologique naturelle de l'infection à HIV

Durant les premiers stades de l'infection, le niveau de réplication virale est maintenu bas par le système immunitaire. Lors de l'évolution de la maladie, l'atteinte quantitative et qualitative du système immunitaire va entraîner une augmentation du niveau de réplication virale qui devient maximal en fin de maladie. La cinétique de cette atteinte du système immunitaire peut être schématiquement divisée en trois phases (Amiel 2001; Carcelain *et al.* 2001a).

2.1. Phase initiale : primo-infection

La primo-infection constitue la phase aiguë de l'infection. Elle peut être cliniquement asymptomatique ou symptomatique. Biologiquement, la charge virale et l'antigénémie p24 sont respectivement détectables dès les 9^{ème} et 14^{ème} jours suivant le contage. La charge virale augmente rapidement et de façon très importante, attestant de l'absence de toute réponse immunitaire. Cette production virale majeure et non contrôlée va être à l'origine de la dissémination du virus dans tout l'organisme.

Lors de la primo-infection, l'immunité non spécifique (innée) est débordée par la très importante production de virus et l'immunité spécifique se met en place. Durant cette phase, les lymphocytes T helpers (CD4+) spécifiques du HIV sont rapidement détruits, entraînant une lymphopénie brusque et plus ou moins profonde selon les cas. La chute des lymphocytes

CD4+ est généralement rapide, transitoire et relative, les cellules étant à la limite inférieure de la normale (500 à 2000 / mm³ dans le sang circulant). Cependant, dans 2 % des cas, on observe une lymphopénie absolue entre 500 et 200 CD4 / mm³. Cette lymphopénie peut persister et aboutir rapidement au stade SIDA. On parle alors de patient progressateur à court terme. Petit à petit, les particules virales se retrouvent dans les ganglions, au niveau des centres germinatifs. Il va donc se produire une hyperplasie folliculaire avec des adénopathies cliniquement palpables.

2.2. Phase secondaire : réponse immunitaire

Cette seconde phase correspond à la mise en place de la réponse immunitaire (humorale et cellulaire) et à la latence clinique. Les anticorps anti-HIV sont détectables dans le sérum à partir du 21^{ème} jour suivant le contage (fenêtre sérologique) et généralement dans un délai de 6 à 8 semaines suivant la contamination (3 mois au maximum) (**Figure 8**). Les premiers anticorps synthétisés ont pour cible des antigènes d'enveloppe (la gp120 et la gp41), puis les anticorps dirigés contre les autres protéines virales apparaissent rapidement. La production des anticorps persiste en plateau jusqu'à la phase terminale de la maladie pendant laquelle celle-ci diminue régulièrement. Parallèlement à l'apparition des anticorps, on observe une diminution brutale de la charge virale plasmatique. Il s'établit alors une période de latence pendant laquelle la charge virale plasmatique est relativement stable et les lymphocytes CD4+ diminuent progressivement. Le taux de CD4 se situe entre 350 et 500 / mm³. Le virus se réplique alors essentiellement dans les organes lymphoïdes. La mesure de la charge virale plasmatique, en dehors de tout traitement antirétroviral, constitue alors un important marqueur pronostic de l'évolution vers le stade SIDA. En effet, plus la CV plasmatique est importante à ce moment de l'infection, plus l'évolution vers le stade SIDA sera rapide.

La réponse à médiation cellulaire se met également en place avec la génération de lymphocytes cytotoxiques CD8+. Cependant, l'activation des CD8+ nécessitant des cytokines secrétées par les lymphocytes CD4+, leur fonction va être altérée au fur et à mesure de la progression du déficit immunitaire.

2.3. Phase terminale : déficitaire immunitaire profond

Cette phase correspond à l'entrée dans la phase symptomatique de l'infection : c'est le stade SIDA. Le statut immunitaire du patient s'effondre et la lymphopénie CD4 profonde s'accompagne de CV plasmatiques de plus en plus élevées et d'une altération de l'état général du patient. Cet état devient propice au développement d'infections opportunistes, de néoplasies et d'encéphalites à HIV. La durée d'évolution vers le stade SIDA est variable selon les patients. On distingue trois groupes de patients : les "progresseurs rapides" qui évoluent vers le SIDA en 3 à 4 ans, les "progresseurs classiques", et les "non progresseurs à long terme" (5 % de la population infectée) qui, en l'absence de tout traitement, n'évoluent pas vers le stade SIDA après 10 ans de contamination.

Lors de la phase terminale, les souches virales forment des syncytia *in vitro*, elles se répliquent de façon rapide et intense. Du point de vue immunologique, le profil de sécrétion des cytokines s'inverse. Initialement, le profil est de type Th1 avec la sécrétion d'IL-2, de TNF- α et d'interféron- γ . Au cours de la maladie, le profil s'inverse et devient de type Th2 à la phase terminale avec sécrétion d'IL-4 et d'IL-10.

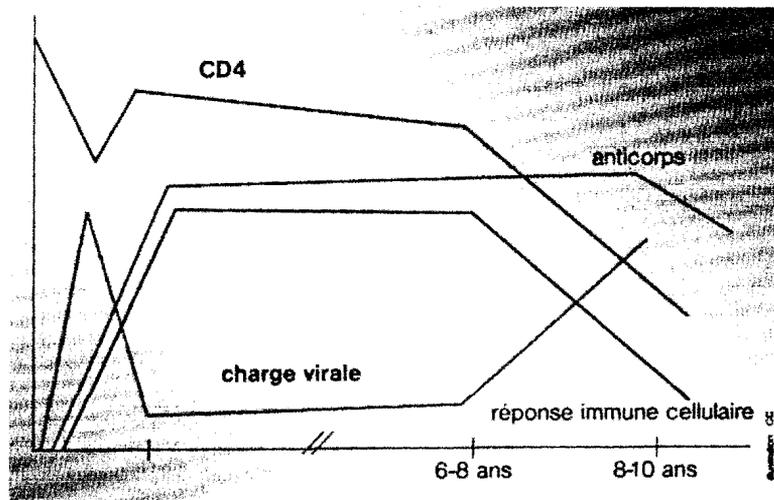


Figure 8 : Evolution des lymphocytes CD4+, de la charge virale plasmatique et de la réponse cellulaire humorale au cours de l'infection à HIV-1. On peut distinguer 3 phases. La primo-infection se caractérise par une CV élevée, une baisse des CD4 et une réponse immunitaire faible. La phase secondaire correspond à la mise en place de la réponse immunitaire qui entraîne une chute de la CV et une réascension des CD4+. La production des anticorps persiste en plateau jusqu'à la phase terminale de la maladie, le stade SIDA où le statut immunitaire du patient s'effondre et la lymphopénie CD4 profonde s'accompagne de CV plasmatiques de plus en plus élevées (d'après C. Amiel, Histoire naturelle immunologique de l'infection à HIV-1, Impact Médecin Guide Infection à HIV 2001, 79-85)

3. Restauration du système immunitaire sous traitement antirétroviral combiné

Lorsque le système immunitaire est atteint, il est difficile de récupérer les taux initiaux de lymphocytes CD4+. Sous traitement antirétroviral inhibant efficacement la réplication virale, la baisse de la charge virale plasmatique est rapide. En revanche la restauration du système immunitaire est lente et incomplète (Carcelain *et al.* 2001b).

Les traitements antirétroviraux combinés permettent donc une récupération immune partielle et de ce fait une protection contre les pathogènes opportunistes. Cependant, cette récupération est uniquement possible si la réplication virale est contrôlée de façon durable et efficace.

IV. . DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE D'UNE INFECTION A HIV

Le diagnostic d'une infection à HIV consiste, dans un premier temps, en un test sérologique de dépistage. Tout résultat positif ou douteux lors du test de dépistage devra être confirmé par Western-Blot (WB) (Agut *et al.* 2001). Dans certaines situations plus délicates, telles que la primo-infection ou bien l'infection à HIV-2 ou à HIV-1 de sous-types moins fréquents, il faudra recourir à d'autres outils virologiques.

1. Diagnostic virologique indirect

Les tests indirects sont des tests détectant la présence des anticorps sériques dirigés contre les protéines constitutives du virus.

1.1. Tests de dépistage

La sérologie HIV associe obligatoirement 2 tests ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) différents qui détectent les anticorps anti-HIV. Les tests ELISA de première génération utilisaient comme antigènes des lysats de cellules infectées contenant des protéines virales et cellulaires, et occasionnant des réactions faussement positives. Quant aux tests de deuxième génération, ils utilisaient comme antigènes des peptides synthétiques ou des protéines de recombinaison génétique. Ils permettaient une détection plus précoce des séroconversions de 10 jours par rapport aux tests de première génération. Les tests de première et de deuxième génération ne détectaient que les immunoglobulines d'isotype G. Les

tests de troisième génération, arrivés quelques années plus tard, détectent les immunoglobulines de type G et M. Ils dépistent de ce fait les séroconversions 5 jours plus tôt que les tests de deuxième génération. Enfin, les tests de quatrième génération, apparus sur le marché en 1998, permettent la détection combinée de la protéine de capsid p24 du HIV-1 et des anticorps anti-HIV-1 et anti-HIV-2. Toutes les trousse ELISA commercialisées actuellement en France doivent permettre la détection des anticorps dirigés contre les HIV-1 des groupes M et O, et tous les sous types de HIV-2. L'ELISA constitue une technique rapide, automatisable et donnant des résultats reproductibles. L'agrément des kits commercialisés en France privilégie une sensibilité proche de 100 % à la spécificité afin d'éviter les résultats faussement négatifs. Le pourcentage de faux positifs toléré, correspondant à des situations physiologiques ou pathologiques particulières, est de 0,5 %.

Les anticorps spécifiques du HIV ne sont pas présents au début de la phase aiguë de l'infection. Ils ne sont pas détectables dans le sérum avant le 21^{ème} jour suivant le contage. Il convient donc d'interpréter les résultats des tests de dépistage avec prudence et en fonction du contexte clinico-biologique du patient afin d'éviter le piège de la fenêtre sérologique.

Les tests de dépistage comportent des risques de résultats faussement positifs. De ce fait, en cas de résultat positif ou de discordance entre les 2 tests de dépistage pratiqués, il faudra recourir à un test de confirmation.

1.2. Tests de confirmation

La technique de référence est le Western blot.

Il est effectué sur le second prélèvement d'un patient ayant des résultats sérologiques positifs ou discordants en ELISA. Le principe du WB consiste à séparer par électrophorèse les protéines virales obtenues après culture, puis à les transférer sur une membrane de nitrocellulose. La présence d'anticorps contre une protéine donnée est révélée par une réaction immuno-enzymatique qui matérialise la position de la protéine sous la forme d'une bande colorée. Les autres tests, appelés immunoblots, sont fabriqués à partir de protéines virales recombinantes déposées en lignes séparées. Ils sont comparables au WB.

2. Diagnostic virologique direct

Les tests directs détectent la présence du virus entier ou de parties de virus (protéines ou génome viraux) dans un échantillon.

2.1. Détection de l'antigène p24

Les antigènes viraux circulants correspondent aux particules et aux protéines virales libres. Les méthodes ELISA commercialisées dosent la protéine p24 du HIV-1 dans le plasma et le sérum. L'antigénémie p24 représente un témoin de la réplication virale. C'est une technique simple, rapide (3 à 4 heures) et peu onéreuse. Sa sensibilité est de l'ordre de 10 pg/ml et sa valeur prédictive positive (VPP) est élevée. La positivité de la réaction peut être confirmée par un test de neutralisation qui inhibe spécifiquement la détection de l'antigène et permet d'exclure un faux positif.

L'antigénémie p24 est détectable dans le sérum en moyenne 14 jours après le contage (de J12 à J26). Cette positivité précède celle des anticorps, qui n'apparaissent pas avant le 21^{ème} suivant le contage au minimum. La détermination de l'antigénémie p24 est essentiellement indiquée chez le nouveau-né de mère séropositive pour le HIV-1 et en cas de suspicion de primo-infection (permettant ainsi de réduire l'écueil de la fenêtre sérologique). Les autres indications sont le diagnostic en cas de conduite à risque récente et la confirmation, au laboratoire, des sérologies discordantes et des profils de WB ininterprétables.

2.2. Isolement du HIV : co-culture lymphocytaire

La culture du HIV-1 est une technique longue, coûteuse et nécessitant des laboratoires de haute sécurité (niveau P2/P3). Le principe de la technique repose sur la co-culture de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) de donneurs sains avec les PBMC d'un patient infecté. La multiplication virale est appréciée par la détermination de l'antigénémie p24 et/ou la recherche d'une activité enzymatique de type transcriptase inverse dans les surnageants de co-culture. La culture cellulaire est entretenue et étudiée pendant plusieurs semaines. Le HIV-2 est isolé par une technique identique.

2.3. Détection des acides nucléiques viraux

Les méthodes moléculaires de détection du HIV sont plus lourdes et plus onéreuses que la détermination de l'antigénémie p24, mais nettement plus rapides et moins onéreuses que l'isolement viral. Elles présentent également l'avantage d'être plus sensibles et plus précoces que l'antigénémie p24. Elles permettent enfin la quantification des particules virales dans le plasma d'un sujet infecté.

Ces méthodes appartiennent à 2 groupes : celles basées sur l'amplification du génome viral et celles basées sur l'hybridation amplifiée, sans amplification génique préalable.

L'amplification génique (PCR ou amplification multi-enzymatique de type NASBA) permet de détecter l'ADN proviral intégré à l'ADN cellulaire ou bien, après une étape de rétrotranscription préalable, l'ARN génomique contenu dans les particules virales. Cette technique présente des risques de faux positifs (contamination de l'ADN amplifié en cours de manipulation) et de faux négatifs (variations génétiques de la région amplifiée, faible nombre de copies d'acide nucléique, ou présence d'inhibiteurs non spécifiques dans l'échantillon).

La technique d'hybridation amplifiée sans amplification génique est fondée sur l'utilisation de sondes ramifiées (technique dite de l'"ADN branché"). Elle a une sensibilité proche des techniques avec amplification génique mais elle présente 2 avantages par rapport à ces dernières : une meilleure reproductibilité, et une sensibilité moindre aux problèmes de contamination et de variabilité génétique. L'inconvénient de cette technique est de nécessiter de plus grands volumes d'échantillon biologique.

La charge virale ARN HIV plasmatique (CV) se positive dès le 12^{ième} jour après le contage. Elle est alors très élevée et correspond à une répllication virale maximale initiale lors de la primo-infection en l'absence de toute réponse immunitaire. La CV baisse ensuite lors de la mise en place de la réponse immunitaire pour atteindre un état d'équilibre, environ 6 mois après le contage.

La variabilité de la méthode est de 0,2 à 0,3 log. Une différence entre 2 charges virales est qualifiée de significative lorsque l'écart est de 0,5 log.

Les principales indications de la CV sont le bilan initial et le suivi thérapeutique (en pratique tous les 3 mois). Dans le cas particulier de la primo-infection, la CV peut également être utile pour affirmer le diagnostic, parallèlement au WB et à l'antigénémie p24.

L'interprétation de la CV nécessite quelques précisions :

- les infections intercurrentes ou les vaccinations occasionnent des augmentations transitoires de la CV, il convient donc d'éviter de pratiquer cet examen pendant cette période et le mois qui suit, afin de ne pas faussement interpréter le résultat,
- il faut savoir que l'on sous-estime la CV lorsque l'on réalise l'examen dans le sérum par rapport au plasma.

Chez un sujet infecté, le suivi repose sur l'évolution des lymphocytes CD4+ et la quantification de l'ARN plasmatique viral (charge virale). Les variations de ces deux marqueurs sont étroitement liées. En effet, une élévation de la CV annonce une diminution du nombre de CD4+, elle même en rapport avec la progression de la maladie vers le stade SIDA. On réalisera donc un bilan initial complet comprenant, entre autres, un dosage des lymphocytes CD4+ / CD8+ et une CV avant tout traitement antirétroviral. On suivra ces deux paramètres de façon régulière, en pratique tous les 3 mois, pour le suivi thérapeutique. L'évaluation trimestrielle des CD4+ et de la CV est utile pour affirmer l'efficacité ou l'inefficacité d'un traitement antirétroviral, et permet de définir les échecs immunologiques (diminution du nombre de CD4+) et virologique (augmentation significative de la CV).

V. LES THERAPIES ANTIRETROVIRALES CONTRE LE HIV

Le traitement étiologique de l'infection par le HIV repose sur les antirétroviraux (ARV). Il doit être instauré de façon concomitante au traitement symptomatique de la primo-infection, et à un traitement préventif et curatif des pathologies associées à la phase tardive de l'infection, qu'elles soient opportunistes ou tumorales.

La connaissance approfondie du cycle de réplication du HIV a permis, malgré sa complexité, de fournir des cibles potentielles à des agents pharmacologiques. Les deux cibles de prédilection des ARV actuellement commercialisés sont la transcriptase inverse et la protéase.

Depuis 1987, année d'obtention de l'AMM pour l'AZT, plus d'une quinzaine de molécules sont disponibles, réparties en 5 classes selon leur mécanisme d'action :

- les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (NRTI),
- les inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse,
- les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTI),
- les inhibiteurs de la protéase (IP),
- les inhibiteurs d'attachement / fusion du virus avec les cellules cibles.

L'émergence de mutants résistants, directement liée aux hautes capacités répliquatives du HIV, explique la nécessité d'exercer une activité antirétrovirale très puissante pour empêcher l'émergence de souches mutantes résistantes par pression de sélection. Une activité antirétrovirale très puissante est obtenue en associant différentes molécules afin d'obtenir un effet additif, voire synergique sur le virus. Cela permet également de minimiser les chances du virus de trouver une combinaison de mutations compatible avec sa survie. La prévention de l'émergence de virus résistants suppose donc que la réplication virale soit la plus faible possible, le plus longtemps possible.

Nous étudierons ci-dessous successivement les différentes classes d'antirétroviraux actuellement disponibles, en précisant à chaque fois les mécanismes d'action et les principales caractéristiques des molécules commercialisées.

1. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

La RT représente une cible privilégiée pour le traitement antirétroviral, en raison de son rôle indispensable dans la réplication virale, mais aussi parce qu'elle est absente chez l'homme. Les inhibiteurs de la RT sont divisés en deux classes basées sur leur structure et leur mode d'action : les analogues nucléosidiques et non nucléosidiques.

1.1. Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (NRTI)

1.1.1. Mécanisme d'action des NRTI

Les NRTI (Nucleosidic Analog Reverse Transcriptase Inhibitor) dérivent des nucléosides naturels. Ils ont constitué la première classe d'ARV disponibles avec la mise sur le marché de l'AZT en 1987. Actuellement, 6 molécules de cette classe sont utilisées en thérapeutique.

L'AZT (Zidovudine, Rétrovir[®]) et le D4T (Stavudine, Zerit[®]) sont des analogues de la thymidine, le ddC (Zalcitabine, Hivid[®]) et le 3TC (Lamivudine, Epivir[®]) sont des analogues de la cytidine, l'abacavir (Ziagen[®]) est un analogue de la guanosine, et le ddI (Didanosine, Videx[®]) est un analogue de l'adénosine. Cette analogie avec les nucléosides naturels est à la base même de leur activité antirétrovirale. Ils constituent des prodrogues et devront être triphosphorylés à l'intérieur de la cellule grâce aux kinases cellulaires pour être actifs. L'activité des kinases est différente selon les cellules et selon leur état d'activation. La triphosphorylation se fait de façon séquentielle, par addition successive de 3 groupements phosphates à l'extrémité 5' du résidu déoxyribose. Puis, les NRTI triphosphorylés entrent en compétition avec les déoxynucléosides triphosphates (dNTP) naturels pour la liaison à la transcriptase inverse. Ils vont ainsi être incorporés à la chaîne d'ADN viral en cours de formation. Or, les NRTI ne possèdent plus de groupement hydroxyle en 3'. Il a été remplacé par un atome d'azote pour l'AZT, par un atome de soufre pour le 3TC et par un atome hydrogène pour tous les autres NRTI. L'absence de groupement hydroxyle en 3' empêche l'incorporation de toute nouvelle base à leur suite par la transcriptase inverse. Ce sont donc des terminateurs de l'élongation de la chaîne d'ADN viral naissante (Guedj 1999). D'autre part, les NRTI agissent également sur les ADN polymérases cellulaires, mais l'affinité de ces molécules est plus grande pour la RT que pour les polymérases cellulaires.

Les NRTI, comme tous les autres ARV, sont virostatiques et non virucides. Ils n'ont aucune efficacité sur les virus déjà intégrés au génome des cellules cibles. Leurs effets sont limités et transitoires, surtout s'ils sont utilisés en monothérapie, car des souches virales mutées sur le gène de la transcriptase inverse émergent alors très rapidement.

1.1.2. Principales caractéristiques des NRTI commercialisés

Les principales caractéristiques des NRTI actuellement commercialisés sont rassemblées dans le **Tableau 1**.

DCI	Zidovudine (AZT, ZDV)	Didanosine (ddI)	Zalcitabine (ddC)	Stavudine (d4T)	Lamivudine (3TC)	Abacavir (ABC)
Nom commercial	Retrovir®	Videx®	Hivid®	Zerit®	Epivir®	Ziagen®
Présentation	Gél à 100, 250 ou Cp à 300 mg Sol. per os 10 mg/ml Flacon pour perf à 200 mg/ml	Cp. solubles à 25, 50, 100 et 150 mg Gél 125, 200, 250 et 400 mg Sol per os à 2 et à 4 g	Cp. à 0,375 et 0,750 mg	Gél à 15, 20, 30 et 40 mg Sol. per os à 1 mg/ml	Cp à 150 mg Sol per os à 10 mg/ml	Cp à 300 mg Sol per os à 20 mg/ml
Posologie moyenne (adulte / 24 h)	200 mg x 3 250 ou 300 mg x 2	125 à 200 mg x 2 250 à 400 mg x 1 à jeun selon le poids et la clairance de la créatinine	0,75 mg x 3, x 2 ou x 1 selon la clairance de la créatinine	De 15 mg x 1 à 40 mg x 2 selon le poids et la clairance de la créatinine	150mg x 2 ou x 1 selon la clairance de la créatinine	300 mg x 2 à jeun d'alcool
Biodisponibilité	60 %	40 %	85 %	86 %	86 %	83 %
Demi-vie plasmatique	1,1 h	1,6 h	1,2 h	1 h	3 à 6 h	1,5 h
Demi-vie intracellulaire	3 h	25 à 40 h	3 h	3,5 h	12 h	3,3 h
Métabolisme	Glucuroconjugaison (50 à 80 %) puis excrétion rénale	excrétion rénale (50 %)	excrétion rénale (70 %)	excrétion rénale (40 %) sous forme inchangée	excrétion rénale sous forme inchangée	excrétion rénale (82 %)*
Principaux effets secondaires	Myélotoxicité : anémie, neutropénie Myalgies, céphalées, nausées Acidose lactique**	Diarrhée Pancréatite Neuropathie périphérique Acidose lactique**	Neuropathie périphérique Pancréatite Stomatite Acidose lactique**	Neuropathie périphérique Pancréatite Elévation des transaminases Acidose lactique**	Myélotoxicité en association avec AZT	Réactions d'hypersensibilité (fièvre, rash, nausées, vomissements, asthénie)

* Métabolisation par l'alcool déshydrogénase et la glucuronyl-transférase. Elimination urinaire à 82 % dont 66 % de métabolites.

** L'acidose lactique associée à une stéatose hépatique est une complication rare, mais potentiellement fatale.

Tableau 1 : Principales caractéristiques des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse

1.2. Les inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse

Les inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse fonctionnent de la même manière que les inhibiteurs nucléosidiques, à la différence près qu'ils sont déjà monophosphorylés et que les charges négatives des phosphates sont masquées pour le franchissement de la membrane cellulaire. Ces molécules permettent de contourner les étapes limitantes de la phosphorylation intracellulaire des NRTI, la première phosphorylation étant souvent limitante (sauf pour l'AZT où c'est la seconde).

Une seule molécule de cette classe est actuellement commercialisée, il s'agit du PMPA (Ténofovir®). Le Ténofovir® est un analogue nucléotidique de l'adénine. Le Ténofovir® est également actif sur le HIV-2 et sur le virus de l'hépatite B.

1.3. Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTI)

1.3.1. Mécanisme d'action des NNRTI

Les analogues non nucléosidiques de la transcriptase NNRTI ont une structure différente de celle des NRTI. Ce sont des inhibiteurs non compétitifs de la transcriptase inverse (RT). Ils n'ont pas besoin de modification chimique préalable pour être actifs. Leur action est donc indépendante des capacités de phosphorylation intracellulaire, contrairement aux NRTI. Les NNRTI se fixent au niveau d'une poche hydrophobe de la sous-unité p66 de la RT constituée par les résidus aromatiques des acides aminés 181 et 188. Une interaction au niveau de ces 2 acides aminés, proches du site catalytique de la RT, affecte la mobilité du site polymérasique, inhibant ainsi la polymérisation des acides nucléiques viraux.

Cette famille regroupe des molécules très diverses : la névirapine (NVP, Viramune®), l'éfavirenz (EFV, DMP266, Sustiva®), et la delavirdine (DLV, Rescriptor®)

Les NNRTI sont exclusivement actifs sur les HIV-1 du groupe M et n'ont d'activité ni sur les HIV-1 des groupes O et N, ni sur le HIV-2.

La principale limitation dans l'utilisation des NNRTI réside dans le développement très rapide de mutations de résistance. Or, une seule mutation peut suffire à conférer une résistance de niveau élevé à toutes les molécules de cette classe. D'où la nécessité de toujours utiliser les NNRTI en association avec des ARV des autres classes.

1.3.2. Principales caractéristiques des NNRTI commercialisés

Les principales caractéristiques des NNRTI actuellement commercialisés sont rassemblées dans le **Tableau 2**.

DCI	Névirapine	Efavirenz	Delavirdine
Nom commercial	Viramune®	Sustiva® Stocrin®	Rescriptor® (disponible en ATU nominative)
Présentation	Comprimés à 200 mg Suspension per os à 50 mg / 5 ml	Gélules à 50, 100, et 200 mg	Comprimés pelliculés à 100 mg, dispersibles Comprimés à 200 mg, non dispersibles
Posologie moyenne (adulte / 24h)	200 mg x 1 pendant 14 jours puis 200 mg x 2	600 mg x 1 au coucher	400 mg x 3
Biodisponibilité	> 90 %	Absorption peu modifiée par un repas normal, augmentée de 50 % après un repas riche en lipides.	85 %
Demi-vie plasmatique	25 à 30 h	40 à 55 h	5,8 h
Métabolisme	Métabolisé par le cytochrome P450 (CYP) Excrétion urinaire (80 %) et fécale (10 %)	Métabolisé par le cytochrome P450 Excrétion urinaire (14 à 34 %) et fécale (16 à 61 %)	Métabolisé par le cytochrome P450 Excrétion urinaire (51 %) et fécale (44 %)
Interactions médicamenteuses	Inducteur du CYP3A <u>Médicaments dont la concentration est diminuée</u> : carbamazépine, dexaméthasone, lansoprazole, phénobarbital, phénytoïne, prednisone, primidone, rifabutine, rifampicine, éthinylestrodiol, clindamycine <u>Médicaments dont les effets indésirables sont accrus</u> : azolés, cimétidine, macrolides	Inhibiteur / inducteur mixte du CYP3A <u>Médicaments contre-indiqués</u> : astémizole, terféndine, cisapride, midazolam, triazolam, ergotamine <u>Médicaments dont la concentration est modifiée</u> : clarythromycine, rifabutine (diminuée), éthinylestrodiol (augmentée), lopinavir (diminuée)	Inhibiteur du CYP3A <u>Médicaments contre-indiqués</u> : astémizole, terféndine, cisapride, midazolam, triazolam, ergotamine, simvastatine, rifampicine, rifabutine, inhibiteurs calciques <u>Médicaments diminuant la concentration de Delavirdine</u> : rifabutine, rifampicine, carbamazépine, phénobarbital <u>Médicaments dont la concentration est augmentée</u> : clarythromycine, dapsonne, rifabutine, quinidine, warfarine, indinavir, saquinavir
Principaux effets secondaires	Eruptions et rashes cutanés Hépatites Fièvre, nausées, vomissements, céphalées	Eruptions cutanées (dans les 2 premières semaines) Troubles neuro-sensoriels (50 % dans les premières semaines) Augmentation des transaminases	Eruptions cutanées Céphalées Augmentation des transaminases

Tableau 2 : Principales caractéristiques des inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse

2. Les inhibiteurs de la protéase (IP)

2.1. Mécanisme d'action des IP

Contrairement aux NRTI et aux NNRTI, qui agissent à la phase précoce du cycle de réplication du HIV, les IP agissent pendant la phase tardive, en empêchant la production de particules virales matures à partir des cellules infectées. L'inhibition de la protéase aboutit à la production de nouvelles particules virales défectueuses et incapables d'infecter de nouvelles cellules cibles. La protéase virale est de structure différente des nombreuses protéases humaines qui existent. Les IP n'interfèrent donc pas avec les protéases humaines. Cette observation est à la base du principe du traitement par des IP spécifiques de virus.

Tous les inhibiteurs de protéase actuellement commercialisés sont des peptidomimétiques qui se lient de façon compétitive et avec une forte affinité au site actif de la protéase (**Figure 9**). Ils sont au nombre de 6, divisés en 3 classes : **(1) les analogues de transition** : saquinavir (R0-31-8959, Invirase[®], Fortovase[®]), indinavir (MK-639 ou L -735.534, Crixivan[®]), ritonavir (ABT-538, Norvir[®]), **(2) les inhibiteurs non peptidiques** : nelfinavir (AG-1343, Viracept[®]), amprénavir (VX-478 ou 141 W94, Agenerase[®]), et **(3) le lopinavir**. D'autres inhibiteurs sont en cours d'évaluation clinique, comme l'atazanavir et le tipranavir (**figure 10**).

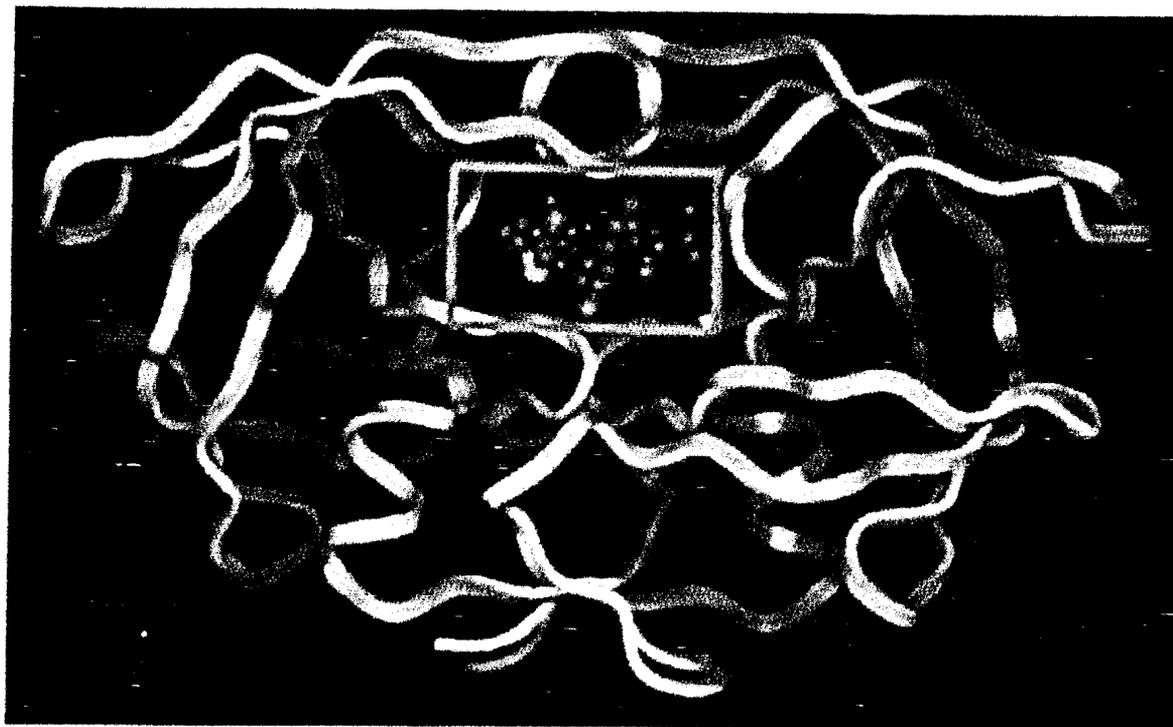


Figure 9 : Représentation de l'interaction d'un IP avec le site actif de la protéase du HIV-1. Les IP sont des peptidomimétiques qui se lient de façon compétitive et avec une forte affinité au site actif de la protéase. Cette enzyme virale est responsable du clivage des précurseurs protéiques Gag et Pol. Son inhibition conduit à la production de particules virales défectueuses incapables d'infecter de nouvelles cellules (Abbott Pharmacie, 1998).

Les IP possèdent des caractéristiques pharmacocinétiques qui déterminent leur action antirétrovirale. Ils doivent être administrés à des doses relativement élevées, et avec un rythme d'administration fréquent (en pratique 2 à 3 prises par jour). Ce dernier point est en rapport avec une demi-vie plasmatique courte (inférieure à 10 heures). Ils subissent un important métabolisme pré-systémique (intestinal et hépatique) par l'intermédiaire des isoenzymes du cytochrome P450 (CYP1A2, CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 et CYP 3A4). Ils induisent des interactions médicamenteuses complexes et réciproques. Ils présentent une variabilité inter et intra-individuelle très importante, ainsi qu'une marge thérapeutique relativement étroite. Certains médicaments sont donc contre-indiqués avec les IP, d'autres nécessitent des ajustements de posologie. Les associations entre IP, ou entre IP et NNRTI peuvent également nécessiter des ajustements de posologie. Leur usage est associé, à des degrés divers, à une redistribution des graisses en rapport avec l'apparition de lipodystrophies, à des troubles de la glycorégulation et à une hyperlipidémie.

Tout comme les ARV des autres classes, les IP sont virostatiques, et ils n'ont aucune action sur les virus déjà intégrés au génome cellulaire hôte.

2.2. Les IP analogues de l'état de transition

Les premières recherches sur la production des antiprotéases du HIV-1 ont été fondées sur la création de peptides courts, ressemblant aux substrats naturels, mais au sein desquels la liaison peptidique hydrolysée a été remplacée par une liaison non hydrolysable contenant un groupement hydroxyle au niveau de l'intermédiaire de transition (modification de la liaison CO-NH) (Dreyer *et al.* 1989; Tomasselli *et al.* 2000).

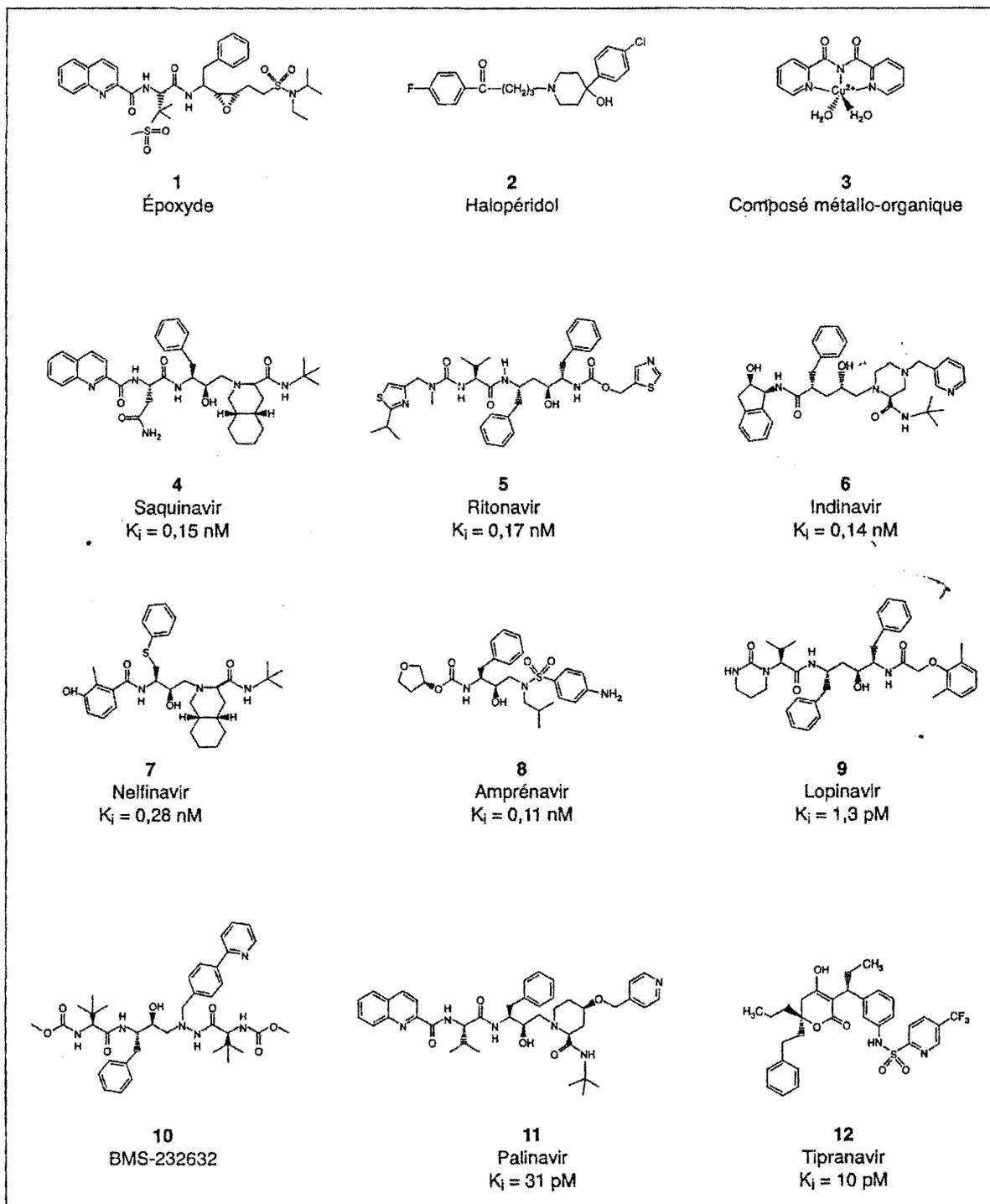


Figure 10 : Représentation des inhibiteurs de la PR. 1. Epoxyde sulfoné, inhibiteur irréversible ; 2. Halopéridol ; 3. diaqua[bis(2-pyridylcarbonyl)amido]cuivre (II) nitrate dihydrate ; 4 à 8 : IP de première génération ; 9 à 12 : IP de deuxième génération (d'après N. Boggetto et M Reboud-Ravaux, La protéase du HIV et le développement d'inhibiteurs, Virologie 2001, 5 : S9-18).

La formule du premier IP, le **saquinavir (SQV)**, a été publiée par le laboratoire Roche en 1990. Cette molécule a été commercialisée en 1995. Elle se compose de 5 acides aminés (Leu-Asn-Phe-Pro-Ile). Des modifications ont été apportées par la suite afin d'optimiser sa solubilité, sa stabilité et son activité antirétrovirale. Néanmoins, le SQV présente une très mauvaise biodisponibilité, et il est dégradé par le cytochrome P450.

C'est pourquoi il doit être maintenant prescrit avec le **ritonavir (RTV)**. Le RTV constitue le deuxième IP apparu sur le marché en 1996, commercialisé par le laboratoire Abbott. La construction du RTV est basée sur la symétrie du site actif de la protéase et l'absence de symétrie des protéases cellulaires, permettant ainsi de n'inhiber que la protéase virale. Sa biodisponibilité après prise orale (600 mg) est d'au moins 60 %. Il est lié à 98 % à 99 % aux protéines plasmatiques, et sa demi-vie plasmatique est de l'ordre de 3 à 5 heures. Du fait d'une haute affinité pour plusieurs isoenzymes du cytochrome P450, cet antiprotéase présente de nombreuses interactions avec d'autres médicaments conduisant, soit à une baisse d'activité des molécules qui sont inductrices du CYP3A (carbamazépine, dexaméthasone, phénobarbital, prédnisone, rifabutine, rifampicine, ...), ou substrats du CYP3A (Ethinylestradiol, Morphine, Méthadone, ...) ; soit à une augmentation des effets secondaires du Ritonavir (cimétidine, interféron alpha, fluoxétine) ou des autres substrats du CYP3A. Certaines associations seront donc contre-indiquées, d'autres nécessiteront des adaptations posologiques.

En monothérapie, le RTV est assez bien toléré et a un puissant effet antirétroviral, objectivé par une baisse de la virémie dans le plasma après 4 semaines de traitement et par une remontée significative du nombre de CD4 (Danner *et al.* 1995; Lea *et al.* 1996; Markowitz *et al.* 1995).

L'interaction du RTV avec les autres IP, liée à une action inhibitrice très importante du CYP3A4, a des répercussions cliniques importantes. Prescrit à de faibles doses, le RTV favorise la diminution de la clairance hépatique des autres IP. Prescrit en association à des doses de l'ordre de 100 mg, il permet de réduire le nombre de prises (augmentation de l'intervalle des prises) et de comprimés (diminution des doses unitaires d'Indinavir), tout en s'affranchissant de la plupart de ses effets indésirables (qui dépendent des doses et des concentrations plasmatiques). Cette indication permet également d'augmenter les concentrations plasmatiques des autres IP associés. Ceci est en rapport avec un ralentissement de l'élimination hépatique, une augmentation de leurs demi-vies et de leurs biodisponibilités.

L'Indinavir (IDV) a été développé peu après par la firme Merck, en 1996. En association à d'autres ARV, l'efficacité de cet IP a été démontrée dans de très nombreux essais (Bani-Sadr

et al. 2001; Gulick *et al.* 1997; Hammer *et al.* 1997; Plosker *et al.* 1999; Roberts 1995; Vacca *et al.* 1994).

2.3. Les IP non peptidiques

Ces inhibiteurs n'ont pas les inconvénients des peptides en terme d'absorption orale ou de stabilité. Parmi les IP, le **Nelfinavir** est la quatrième molécule à avoir été mise sur le marché en 1997. Structurellement, cet IP ressemble au SQV mais avec des liaisons non peptidiques au niveau des chaînes latérales. Il emprunte également la voie métabolique hépatique du cytochrome P450, de façon comparable au SQV, mais moindre que l'IDV et le RTV. Il existe un métabolite hépatique "M8" du Nelfinavir qui est également doté d'une activité antirétrovirale.

L'**Amprénavir** est également un inhibiteur non peptidique de la protéase, développé par le laboratoire VERTEX et commercialisé en 1998-1999. Il se présente sous forme de solution buvable (15 mg/ml) ou de capsules molles de 50 mg ou 150 mg. C'est une molécule hydrosoluble dont la biodisponibilité est supérieure à 70 %. De plus, sa demi-vie est relativement longue (7 à 10 h), autorisant des prises moins fréquentes que les autres IP. Il est actif sur le HIV-1 et sur le HIV-2.

La posologie recommandée chez l'adulte est de 1200 mg 2 fois par jour. En cas de co-administration de ritonavir, il est recommandé de réduire la posologie d'amprénavir (600 mg 2 fois par jour) avec administration de faibles doses de ritonavir (100 mg 2 fois par jour). Mais il existe de grandes variations interindividuelles obligeant parfois à effectuer des dosages pharmacologiques pour adapter la posologie. La concentration moyenne cible résiduelle est de 1250 ng/ml.

Chez des patients prétraités par des IP, en utilisant la corrélation entre le phénotype et le génotype des souches virales, Schmidt *et al.* a proposé un score utilisant la mutation 84V et/ou deux parmi les mutations suivantes (10I/R/V/F, 46I/L, 54L/V et 90M) pour prédire la résistance à l'APV (Schmidt *et al.* 2000). Cependant, les résultats obtenus *in vitro* n'ont pas été confirmés *in vivo*. D'autre part, en utilisant sa base de données, l'ANRS, a récemment proposé un score génotypique basé sur la corrélation entre le génotype et la réponse virologique. Selon ce score, la présence de plus 4 parmi les mutations suivantes (L10I, V32I, M46I/L, I47V, I54V, G73S, V82A/F/T/S, I84V) est associée à une mauvaise réponse virologique chez les patients lourdement prétraités recevant de l'APV (Descamps *et al.* 2001). En combinant les paramètres virologiques et pharmacologiques, Marcelin *et al.* a défini chez des patients prétraités par des IP et en échec virologique, un quotient dénommé «Genotypic

Inhibitory Quotient » (GIQ) représenté par le rapport entre le nombre de mutations sur le gène de la protéase avant la mise sous amprénavir et la concentration résiduelle plasmatique d'amprénavir à la 8^e semaine (Marcelin et al. 2003) . Ce quotient est prédicteur de la réponse au traitement à la 12^e semaine : les patients qui ont un GIQ élevé avaient une bonne réponse au traitement.

$$\text{GIQ} = \frac{\text{Concentration minimale d'APV associée à une diminution de plus de 1 log de CV}}{\text{Nombre de mutations dans le gène de la protéase associée à une diminution de plus de 1 log de CV.}}$$

→ Pour l'APV, le GIQ associé à une diminution de CV HIV $\geq \log_{10} = 1250 / 5$

→ Les patients sont classés comme ayant 1 x GIQ, 2 x GIQ, 3 x GIQ or 4 x GIQ.

L'amprénavir est principalement métabolisé dans le foie par le cytochrome P450 3A4 dont il est à la fois substrat et inhibiteur. Par conséquent, les médicaments qui utilisent cette même voie métabolique ou qui modifient l'activité du cytochrome P450 3A4 peuvent entraîner des modifications des paramètres pharmacocinétiques de l'amprénavir. Les effets secondaires fréquemment associés à la prise d'amprénavir sont représentés par une éruption cutanée et des troubles gastro-intestinaux. Contrairement à d'autres IP comme l'indinavir, l'amprénavir entraîne rarement des symptômes liés à une redistribution anormale de la masse graisseuse (bosse de bison, atrophie graisseuse).

2.4. Le lopinavir

Le **Lopinavir** est un IP disponible depuis le début de l'année 2000. Il a la même structure centrale que le RTV mais avec des chaînes latérales peptidiques modifiées. Ces modifications entraînent la perte d'interaction entre le résidu valine en position 82 (V82) de la protéase et l'inhibiteur. L'activité de cet inhibiteur est moins affectée par la liaison aux protéines plasmatiques que celle du RTV et il est approximativement 10 fois plus efficace *in vitro* (Sham *et al.* 1998). D'autre part, sa biodisponibilité est relativement basse (25 %) lorsqu'il est prescrit seul. En revanche elle augmente de façon significative en cas de coadministration avec de faibles doses de RTV (Lopinavir + RTV = Kaletra^R) (Sham *et al.* 1998).

2.5. Principales caractéristiques des IP commercialisés

Les principales caractéristiques des IP actuellement commercialisés sont rassemblées dans le **Tableau 3**.

DCI	Indinavir	Ritonavir	Saquinavir HGC	Saquinavir SGC	Nelfinavir	Amprénavir	ABT 378 / r (Lopinavir / r)
Nom commercial	Crixivan®	Norvir®	Invirase®	Fortovase®	Viracept®	Agénérase®	Kaletra®
Présentation	Gél à 200 et 400 mg	Gél à 100 mg Sol per os à 600 mg / 7,5 ml	Gél à 200 mg	Gél à 200 mg	Cp à 250 mg Poudre à 50 mg / 1g	Cp à 150 mg Sol per os à 15 mg / ml	Capsules contenant 133,3 mg de lopinavir et 33,3 mg de ritonavir Sol per os 80 mg/ml lopi. + 20 mg/ml de ritonavir
Posologie moyenne (adulte / 24 h)	800 mg x 3 à jeun ou repas léger et avec un apport hydrique ≥ 1,5 l / 24 h	600 mg x 2 (dose croissante les 14 premiers jours)	600 mg x 3	1200 mg x 3 au cours d'un repas	750 mg x 3 au cours d'un repas ou 1250 mg x 2	1200 mg x 2 éviter les repas très gras	3 capsules x 2
Biodisponibilité	30 à 60 %	> 60 %	4 %	?	20 à 80 %	> 70 %	?
Demi-vie plasmatique	1,5 à 2 h	3 à 5 h	1 à 2 h	1 à 2 h	3,5 à 5 h	7,1 à 10,6 h	3 à 5 h 5 à 6 h avec le ritonavir
Métabolisme	Hépatique par le cytochrome P450 Inhibition du CYP3A4	Hépatique par le cytochrome P450 Inhibition du CYP3A4, du CYP2D6 et du CYP2C9/10	Hépatique par le cytochrome P450, élimination biliaire Inhibition du CYP3A4	Hépatique par le cytochrome P450, élimination biliaire Inhibition du CYP3A4	Hépatique par le cytochrome P450, élimination biliaire Inhibition du CYP3A4	Hépatique par le cytochrome P450, élimination biliaire Inhibition du CYP3A4	Hépatique par le cytochrome P450 Inhibition du CYP3A4
Conservation	Température ambiante	Réfrigérateur	Température ambiante	Température fraîche	Température ambiante	Température ambiante	
Principaux effets secondaires	Lithiases rénales Augmentation de la bilirubine indirecte Troubles digestifs Anémie hémolytique Augmente acide urique, transaminases CPK	Troubles digestifs (diarrhée, vomissements) Paresthésies péri-orales Dysgueusies Lipodystrophie Augmentation des transaminases	Troubles digestifs Céphalées Augmentation des transaminases	Troubles digestifs (diarrhée, nausées, vomissements, douleurs) Céphalées Augmentation des transaminases	Diarrhée Rashs cutanés Augmentation des transaminases et des CPK Lipodystrophie Neutropénie	Troubles digestifs (diarrhée, nausées, vomissements) Eruptions cutanées Paresthésies orales Anomalies du bilan hépatique	Troubles digestifs (diarrhée, nausées, vomissements) Eruptions cutanées Augmentation des transaminases, amylase et GGT

Tableau 3 : Principales caractéristiques des inhibiteurs de la protéase du HIV-1.

3. Les inhibiteurs de fusion

De structure peptidique, le T20 (phase II / III) et le T-1249 (phase I) se lient à la gp41 (inhibition compétitive) et bloquent ainsi la fusion du HIV avec la membrane cellulaire. Ce blocage a lieu car le peptide produit une interférence dans les réarrangements structuraux requis pour permettre au HIV de rentrer dans la cellule. Ils inhibent donc la fusion entre le HIV (ou une cellule infectée par le HIV) et une cellule non infectée, réduisant ainsi la réplication virale.

Des études sont actuellement en cours afin de définir les principales caractéristiques pharmacologiques, ainsi que les profils de résistance, associés à ces deux peptides.

Cette nouvelle voie thérapeutique présente, *a priori*, l'intérêt de ne pas être concernée par les mutations de résistance observées avec les inhibiteurs de la transcriptase inverse et les IP. Le T20 est actuellement en essai clinique sous forme injectable.

4. Principes et objectifs d'un traitement antirétroviral

Les deux objectifs principaux d'un traitement antirétroviral sont d'une part un contrôle efficace et durable de la réplication virale, et d'autre part la préservation du plus large éventail possible d'options thérapeutiques ultérieures en évitant l'émergence de mutants résistants. Il est également important de retarder l'évolution vers le stade SIDA en préservant le système immunitaire.

En pratique, le traitement antirétroviral doit rendre la CV plasmatique indétectable, c'est-à-dire inférieure au seuil de détection de la technique utilisée par le laboratoire assurant le suivi virologique, car il existe une relation linéaire entre le degré de réduction de la CV et le bénéfice clinique.

Les monothérapies ayant fait la preuve de leur inefficacité du fait d'un contrôle très partiel de la réplication virale, toutes les molécules sont utilisées aujourd'hui au sein de bithérapies ou de multithérapies (HAART : traitements antirétroviraux hautement efficaces), le plus souvent des trithérapies.

VI. MECANISMES DE RESISTANCE AUX TRAITEMENTS ANTIRETROVIRAUX ET MUTATIONS ASSOCIEES

La résistance virale peut être définie comme la capacité du virus à se multiplier en présence d'une molécule antirétrovirale à des concentrations qui normalement inhibent la réplication d'un virus sensible. Elle est fortement associée à l'échec thérapeutique mais n'explique pas à elle seule tous les échappements retrouvés en clinique. De 20 à 60 % des patients traités par une combinaison d'antirétroviraux comportant un IP, présentent un échappement thérapeutique (Ledergerber *et al.* 1999; Lucas *et al.* 1999). En effet, les difficultés d'observance, dues surtout à une galénique peu maniable et à des effets secondaires mal supportés, constituent une cause majeure de l'échec thérapeutique.

1. Mécanisme général de la résistance virale

Il existe plusieurs manifestations de la résistance : la résistance génotypique, phénotypique et biochimique (Erickson *et al.* 1999). La **résistance génotypique** est liée à la présence de mutations sur les gènes de la RT et/ou de la protéase. En modifiant ces enzymes, ces mutations rendent alors les souches virales insensibles aux antirétroviraux concernés. Dans la majorité des cas (> 80 %), la résistance est due à l'apparition de mutations dans la séquence du génome viral (Erickson *et al.* 1999). La **résistance phénotypique** est définie comme l'augmentation de la concentration d'inhibiteurs nécessaire pour inhiber un certain pourcentage de la réplication du virus dans les tissus en culture. Enfin, la **résistance biochimique** est définie comme la réduction de l'affinité de la liaison entre le mutant et l'inhibiteur.

Cette résistance virale peut se manifester par un rebond de l'ARN viral dans le plasma (échec virologique) et/ou par une baisse des CD4 (échec immunologique). Cette résistance est le reflet de nombreux mécanismes médiés par le virus et le patient à un niveau génétique, biochimique, cellulaire et pharmacologique.

1.1. Variabilité génétique des HIV

La variabilité génétique des HIV a été décrite peu de temps après leur découverte. Les virus isolés chez différents patients varient génétiquement entre eux et chez un même patient, il existe de multiples formes virales. On parle de quasi-espèces de virus.

La base moléculaire de cette variabilité est supportée par la transcriptase inverse. En effet, cette enzyme virale commet beaucoup d'erreurs lors de la réplication du génome viral. L'enzyme a une vitesse d'élongation 10 à 1000 fois inférieure à celle des autres ADN polymérase ADN dépendantes. Son fonctionnement est irrégulier, marqué par des pauses avant l'incorporation de nouveaux nucléotides. De ce fait, elle peut se décrocher facilement de la matrice, interrompant la synthèse du nouveau brin d'ADN en cours de formation. Les mutations qui apparaissent dans le génome viral sont des substitutions, des insertions et des délétions. Or, le HIV ne possède pas d'exonucléase capable de corriger ces erreurs. Cela signifie qu'elles vont subsister de manière définitive dans le génome car la matrice (ARN génomique viral) a disparu, hydrolysée par l'ARNase H. Ces modifications peuvent être muettes (sans changement dans les protéines virales), neutres (sans retentissement sur les capacités de réplication du virus) ou au contraire létales (mutations interrompant la séquence virale ou modifiant les protéines). En moyenne, la transcriptase inverse commet une erreur toutes les 10^4 paires de bases, soit environ une erreur par génome et par cycle de réplication. Un grand nombre de variants va donc être créé puisqu'un sujet infecté produit, en moyenne, 10^{10} particules virales par jour.

Les gènes viraux vont être atteints par les mutations avec des fréquences différentes. Les zones conservées du génome sont généralement peu touchées, contrairement aux zones variables, comme par exemple le gène codant la glycoprotéine d'enveloppe gp160, et plus particulièrement la partie du gène codant la gp120 qui est 3 fois plus variable que celle codant la gp41. Les gènes gag et pol semblent moins être le siège de mutations que le gène env.

Il existe un second mécanisme pouvant expliquer la genèse de variants. Il s'agit de la recombinaison rétrovirale. Lorsque 2 ARN génomiques coinfectent une cellule, la transcriptase inverse, lors de l'étape de rétrotranscription, va créer des ADN hybrides en transférant un brin d'ADN naissant d'un virus sur le brin de l'autre virus. Le génome viral résultant est un hybride des 2 génomes présents simultanément dans la cellule. Il s'agit donc d'un nouveau variant.

Le fait que le HIV produise un grand nombre de variants lors de sa réplication le rend capable de s'adapter rapidement à un changement de la pression de sélection. Cela constitue actuellement un problème majeur en thérapeutique.

Les analyses de séquences nucléotidiques, associées aux résultats des sérotypages, ont permis de classer les HIV en types et sous-types.

Le groupe des HIV-1 est subdivisé en 3 groupes comportant chacun différentes souches virales : les HIV-1 du groupe M (Major), correspondant aux virus les plus répandus dans le

monde, les HIV-1 du groupe O (Outlier), et les HIV-1 du groupe N (New). A ce jour, 11 sous-types distincts de HIV-1 ont été identifiés à l'intérieur du groupe M (notés de A à K) (**figures 11 et 12**).

En 1999, on a montré que les HIV-1 des groupes M, N et O étaient proches d'une souche simienne SIV_{cpz} (Simian Immunodeficiency Virus) de chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes*. Cette souche pourrait être à l'origine de l'introduction du virus dans la population humaine (Müller-Trutwin *et al.* 1999).

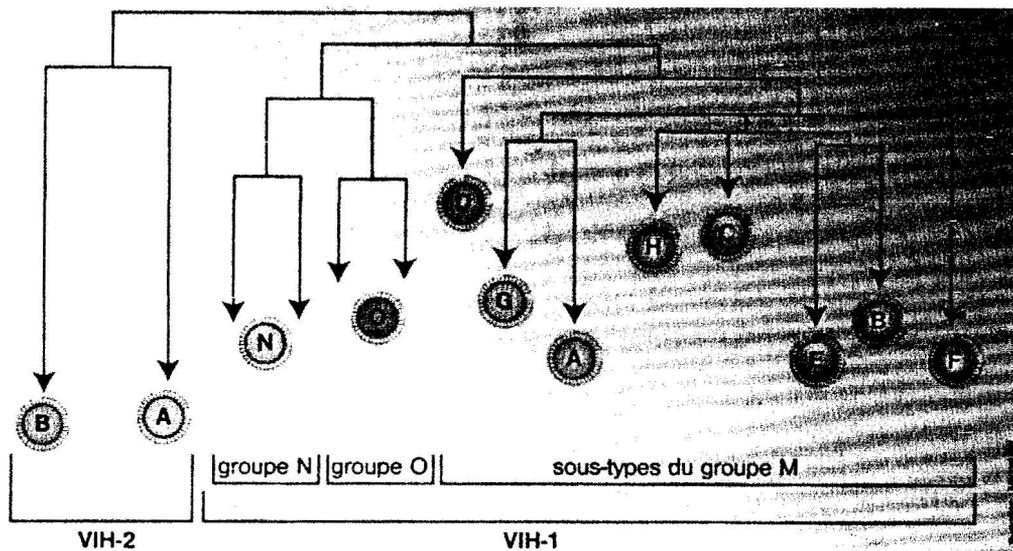


Figure 11 : Arbre généalogique des HIV. Deux virus responsables du SIDA chez l'homme ont été identifiés, le HIV-1 et le HIV-2. Trois groupes de HIV-1 ont été identifiés : les HIV-1 du groupe M, ceux du groupe O et ceux du groupe N. Plusieurs sous-types de HIV-2 ont également été décrits (d'après F. Barré-Sinoussi, Les VIH, rappel virologique, Impact Médecin Guide Infection à HIV 2001, 17-26, illustration : M. Bui).



Figure 12 : Distribution des HIV-1 dans le monde. Les HIV-1 sont ubiquitaires. Les HIV-1 du groupe M sont les virus les plus répandus dans le monde (d'après F. Barré-Sinoussi, Les VIH, rappel virologique, Impact Médecin Guide Infection à HIV 2001, 17-26, illustration : M. Bui).

La situation est encore plus complexe en ce qui concerne le HIV-2. Ce virus montre également une grande diversité génétique avec 6 sous-types décrits à ce jour (de A à F). Le HIV-2 est très proche de souches simiennes, notamment SIV_{sm} retrouvée chez le singe mangabé et SIV_{mac} chez le macaque. Ces arguments plaident, comme dans le cas du HIV-1, en faveur d'une probable origine simienne de l'infection humaine à HIV.

1.2. Avantage sélectif des variants mutés (sélection et amplification)

L'émergence de mutants résistants et la variabilité génétique sont étroitement liées. L'émergence des mutations de résistance dépend de trois facteurs : sa fréquence dans la population virale, son avantage sélectif par rapport aux virus sauvages et aux autres mutations. Cet avantage sélectif peut être affecté par la nature de cette mutation, par les mutations préexistantes dans le génome viral ou par le traitement lui-même (nature, concentration, nombre ou différentes combinaisons des inhibiteurs).

En d'autres termes, certaines des mutations préexistantes sont sélectionnées, en présence d'inhibiteur, parce qu'elles confèrent un avantage répliatif au virus muté qui va prendre le dessus sur le virus sauvage. En revanche, ces mêmes mutations ne sont pas sélectionnées en absence d'inhibiteur, car elles n'entraînent pas d'avantage pour le virus mais souvent au contraire un désavantage.

2. Les tests de résistance aux antirétroviraux

La résistance des virus a un rôle direct dans les échecs virologiques, d'où l'utilité de disposer de tests permettant de prédire la réponse au traitement à partir des mutations observées. Les tests de résistance ont donc un intérêt prospectif dans la prise en charge thérapeutique du patient (Brun-Vezinet *et al.* 2001).

Les tests de résistance aux antirétroviraux appartiennent à 2 groupes : les tests phénotypiques et les tests génotypiques.

2.1. Tests phénotypiques de résistance *in vitro*

In vitro, les tests phénotypiques de résistance sont basés sur la capacité d'un virus à se multiplier en présence d'un inhibiteur en comparaison avec une souche virale dite sauvage et sensible à cet inhibiteur.

Cette susceptibilité *in vitro* à un inhibiteur est définie par la concentration inhibant 50 % (CI50) ou 90 % (CI90) de la réplication virale. Plusieurs types de tests ont été adaptés à partir de ce principe de base.

2.1.1. Tests de réduction du nombre de foyers infectieux

Le principe de cette technique est simple. Des isolats de HIV-1 sont cultivés, dans un premier temps, sur des PBMC provenant de sujets séronégatifs et utilisés, dans un second temps, pour infecter une monocouche de cellules HeLa CD4+ en présence et en absence d'inhibiteur. Après 3 jours d'incubation, les cellules sont fixées par du formaldéhyde et colorées par du cristal violet afin de visualiser les foyers infectieux. La CI50 est déduite directement en établissant un rapport en le nombre de foyers infectieux en présence et en absence de molécule antirétrovirale.

Ce test est quantitatif et précis, mais il présente l'inconvénient de ne pas détecter certaines souches virales. Cet inconvénient devrait disparaître, du moins en partie, avec l'utilisation de lignées cellulaires exprimant à la fois le CD4 et le co-récepteur CCR5.

2.1.2. Tests d'inhibition de la production d'antigène p24 ou d'activité transcriptase inverse par les PBMC

Le principe de cette technique consiste en l'utilisation d'isolats de HIV-1 mis en culture dans des PBMC provenant de sujets séronégatifs et préalablement stimulées par la phytohéماغglutinine (PHA). La mise en culture a lieu en l'absence et en présence d'inhibiteur à différentes concentrations. On mesure ensuite l'antigénémie p24 ou la présence d'une activité transcriptase inverse dans les surnageants de culture.

Ce test présente l'inconvénient d'être long (4 à 6 semaines en moyenne) et coûteux à réaliser. De plus, il a été démontré que des sous-populations virales de variants HIV-1 peuvent être sélectionnées *in vitro*, introduisant un biais potentiel dans la technique. Ce biais existe d'ailleurs avec toute technique de culture cellulaire procédant à plus d'un cycle de réplication virale.

L'avantage de la technique est la possibilité de tester l'intégralité du matériel génétique viral présent dans le prélèvement d'un patient.

2.1.3. Production de virus recombinant à partir de l'ARN viral plasmatique (Recombinant virus assay ou RVA)

Ces techniques font partie de la deuxième génération de tests phénotypiques, introduits à partir de 1993. Les seuls tests phénotypiques utilisés actuellement sont basés sur la technique RVA. Le RVA repose sur l'emploi de la recombinaison génétique pour produire un stock de virus utilisé par la suite pour tester la sensibilité à différentes molécules.

Le principe de cette technique est le suivant. On récupère, à partir des PBMC d'un patient, un pool de séquences d'ARN viral codant la transcriptase inverse (RT) et/ou la protéase. Ce pool est rétrotranscrit en ADNc, amplifié par PCR, et placé, par recombinaison dans des lignées cellulaires T, dans un clone proviral déficient en transcriptase inverse. La population virale obtenue est une population de clones d'ADN HIV complet et infectieux, contenant des séquences de la protéase et/ou de la RT provenant de l'ARN plasmatique du patient. Cette population de clones est ensuite mise en culture *in vitro* dans des cellules permissives. Le virus recombinant infectieux obtenu est alors cultivé en présence de différentes concentrations de l'antirétroviral dans une lignée de cellules contenant un gène cellulaire rapporteur dont l'activité est induite par la réplication virale. Une autre firme utilise la technique du clonage pour insérer les gènes de la protéase et de la RT de l'ARN viral plasmatique du patient dans un vecteur HIV-1 modifié qui porte le gène de la luciférase à la place du gène d'enveloppe. La réplication en présence d'inhibiteurs est évaluée en mesurant l'expression du gène de la luciférase.

Le RVA présente de nombreux avantages. Elle permet l'étude d'un grand nombre de souches virales. La variabilité est bien moindre qu'avec les techniques utilisant une culture en PBMC, peut-être parce que les lignées cellulaires sont moins variables que les PBMC provenant de différents donneurs. Un autre avantage de la RVA est qu'elle permet l'étude directe de l'ARN viral plasmatique après RT-PCR, permettant de ce fait une évaluation directe du phénotype viral à partir du même prélèvement que la CV.

2.2. Tests génotypiques de résistance

Le génotype de résistance peut être défini comme la comparaison de la séquence en nucléotides et en acides aminés d'une souche virale par rapport à la séquence d'une souche de référence sauvage. Tout changement de nucléotide par rapport à la séquence de référence est traduit en acide aminé, ce qui engendre dans certains cas des mutations au niveau du codon. Par exemple, le changement ATG en GTG dans le génotype au niveau du codon 184 du gène de la transcriptase inverse sera rapporté comme le remplacement de la méthionine par un résidu valine en position 184. En utilisant la nomenclature internationale, cette mutation sera notée M184V.

Les tests génotypiques de résistance aux antirétroviraux étudient généralement les gènes de la transcriptase inverse et de la protéase qui sont les 2 principales cibles des molécules utilisées en thérapeutique. Il faut rappeler ici que ces tests génotypiques ne permettent pas d'étudier des souches virales minoritaires représentant moins de 20 % de la population virale totale.

On distingue 2 groupes de tests génotypiques : les tests de séquençage de l'ADN et les tests recherchant une mutation en un point particulier d'une séquence cible (Calvez 1998).

2.2.1. Tests de séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN fournit des informations sur tous les nucléotides de la région séquencée (RT et PR en pratique courante).

2.2.2.1. Méthode enzymatique des didéoxynucléotides

Lors d'une étape préalable, l'ARN est rétrotranscrit en ADNc et les segments d'ADNc codant la transcriptase inverse et la protéase sont amplifiés par PCR afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le séquençage.

Quatre réactions sont ensuite conduites parallèlement. Pour chaque réaction, le milieu comprend une amorce, le fragment d'ADN étudié, une polymérase, un mélange des 4 nucléosides triphosphates naturels, et, pour chaque réaction, un des 4 dideoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Chaque dideoxynucléotide (ddNTP) agit comme un terminateur de chaîne. Lorsqu'il est incorporé dans la chaîne d'ADN, la synthèse s'interrompt puisqu'il ne possède pas de groupement hydroxyle en 3', aucune élongation n'est donc plus possible après son incorporation. Cette incorporation se faisant à différents moments de la

synthèse, on obtient des fragments d'ADN de longueur différente. Dans cette réaction, la synthèse d'un brin d'ADN commence à l'amorce et s'interrompt lors de l'incorporation d'un ddNTP. Les brins néosynthétisés sont marqués par des dNTP radioactifs ou par une amorce fluorescente ou enfin par des ddNTP fluorescents. La dernière évolution de cette technique utilise des marqueurs fluorescents de différentes couleurs, une pour chaque ddNTP. Cela autorise la réalisation simultanée des 4 réactions dans le même tube, et leur séquençage sur la même piste du gel de polyacrylamide. Les différents brins sont alors distingués par la couleur de leur fluorescence correspondant aux 4 ddNTP.

Les ddNTP utilisés dans cette technique sont en concentration telle, par rapport aux dNTP, qu'après incorporation par l'ADN polymérase on obtient des fragments dont la longueur ne diffère que d'un nucléotide. Ces ddNTP sont porteurs d'une 6-carboxyfluorescéine associée de façon spécifique pour chaque base (adénosine, guanosine, cytosine, thymine) à un radical dichlororhodamine différent et ayant un spectre d'émission propre. Ainsi, lors de la migration électrophorétique, chaque brin d'ADN est séparé selon sa taille (nombre de dNTP incorporés avant le ddNTP), et en passant devant un faisceau laser, la longueur d'onde de la fluorescence émise permet de différencier le nucléotide terminal. Le séquenceur construit un fluorogramme à partir des fluorescences lues. Chaque ddNTP fluorescent apparaît sous la forme d'un pic. Il est alors possible de déterminer la séquence du brin d'ADN originel.

Dans la plupart des cas, le séquençage est automatisé et un programme informatique interprète la séquence du brin originel à partir de l'image du gel d'électrophorèse. La lecture s'effectue en analysant chaque position connue comme associée à des mutations de résistance, par rapport à une séquence de référence ; la population virale à ce codon peut être sauvage, mutée ou mixte.

2.2.2.2. Séquençage sur puces à ADN ("gene chip sequencing")

Le séquençage ADN conventionnel établit la séquence des gènes nucléotide après nucléotide. Le séquençage sur puces à ADN, par contraste, évalue simultanément plusieurs changements de base grâce à l'hybridation de cibles d'ADN avec une librairie de sondes oligonucléotidiques contenues sur des petites puces en silice. On fixe par photolithographie environ 409 000 oligodeoxynucléotides sur une puce de 1,28 cm². Ces sondes sont fixées à des endroits précis sur la puce. La puce est placée dans une cartouche en plastique qui sert de chambre d'hybridation. Après RT-PCR du fragment d'ARN étudié, le fragment d'ADNc obtenu est fragmenté et hybridé avec les sondes de la puce. Un rayon laser mesure ensuite la

fluorescence qui apparaît à différents endroits sur la puce, là où il y a eu liaison entre l'ADN et la sonde.

2.2.2. Tests recherchant une mutation en un point précis de la séquence cible

2.2.2.1. PCR à amorces spécifiques ("Primer specific PCR")

Cette technique utilise des amorces oligonucléotidiques construites de telle façon qu'elles se lient spécifiquement à l'extrémité 3' d'une séquence cible. S'il y a concordance entre l'extrémité 3' de l'amorce et celle du fragment d'ADN cible testé, il y a génération d'un fragment d'ADN. En revanche, dans le cas où les extrémités 3' ne concordent pas, il n'y a pas de brin d'ADN néosynthétisé. Lorsque les premières mutations entraînant une résistance ont été décrites, on a mis au point des amorces reconnaissant spécifiquement les séquences mutées. Il est ainsi devenu possible de tester des patients, en recherchant si les virus les infectant possèdent telle ou telle mutation.

Cette technique a été validée par l'étude de souches sauvages et résistantes de séquences connues. Elle est applicable à un grand nombre d'individus pour dépister des mutations connues entraînant une résistance au traitement. Cependant, elle devient impraticable lorsque le nombre de positions du génome à explorer est trop élevé.

2.2.2.1. Hybridation différentielle

Cette technique a été introduite en 1995. Elle permet, grâce à des sondes radiomarquées, de détecter des séquences correspondant à des virus mutants et sauvages dans l'ARN HIV-1 plasmatique. Peu après, on a développé une variante de cette technique utilisant une amorce biotinylée et des sondes marquées par la phosphatase alcaline pour détecter les produits de PCR par colorimétrie ou chémiluminescence en microplaques.

Cette méthode consiste à produire par PCR une séquence ADN cible biotinylée. Cette séquence d'ADN est hybridée dans un second temps avec une sonde marquée par une enzyme. Cette sonde, fixée aux puits d'une microplaque, est spécifique d'une séquence sauvage ou mutée. Elle est détectée par chémiluminescence.

Contrairement aux tests précédents peu aptes à distinguer de faibles quantités de virus mutants, l'hybridation différentielle permet de tester rapidement de nombreux échantillons, tout en détectant des sous-populations minoritaires de virus mutants.

2.3. Indications des tests génotypiques

Elles ont été récemment précisées dans les recommandations d'un groupe d'experts (Pr J.F.Delfraissy) en 1999 et réactualisées en 2002.

Les principales indications du génotypage dans l'infection à HIV-1 sont :

→ La primo-infection et l'infection récente (date du contage inférieure à 1 an) : la recherche de mutations associées à une résistance primaire est recherchée en France dans le cadre d'une surveillance épidémiologique nationale sous l'égide de l'ANRS.

→ Un échec d'un traitement de première intention : même si dans ce cas on incrimine des problèmes d'observance ou de puissance insuffisante des molécules plutôt que la résistance au traitement. Dans ce cas, le génotypage peut être utile pour éliminer du traitement de relais les antirétroviraux qui s'avèreraient inefficaces du fait de résistances croisées.

→ Dans les échecs multiples, chez les patients multitraités, les tests génotypiques peuvent sembler inutiles du fait des profils multirésistants souvent observés. Ils peuvent néanmoins servir à éliminer du traitement les molécules inefficaces mais responsables d'effets indésirables. Ils mettent également en évidence des problèmes d'observance ou de mauvaise absorption de molécules (absence de mutations lors d'un échappement virologique). Enfin, le génotypage aide au choix des combinaisons de molécules utilisées dans les méga et gigathérapies.

3. Résistance aux inhibiteurs de la transcriptase inverse

3.1. Résistance aux inhibiteurs nucléosidiques

La résistance aux analogues nucléosidiques (NRTI) a été décrite pour la première fois en 1989 (Larder *et al.* 1989) et reste un phénomène complexe. Les variants résistants sont sélectionnés pendant des thérapies prolongées et contiennent une série de substitutions et/ou

d'insertions dans le gène de la RT. Les caractéristiques et les mécanismes de la résistance varient selon les inhibiteurs. La résistance peut être le résultat d'une simple mutation ou de l'accumulation progressive de plusieurs mutations.

3.1.1. Analyse génotypique

L'AZT a été le premier inhibiteur contre le VIH à obtenir l'AMM en 1987. Cette molécule provoquait une forte inhibition de la réplication virale *in vitro* et une amélioration clinique des patients traités. Pourtant, en moins d'un an de traitement, un développement de la résistance à cet inhibiteur a été observé (Brun-Vezinet 1999; Loveday 2001). La résistance à l'AZT est associée à au moins 6 mutations dans la RT : M41L, DQ67N, K70R, L210W, T215F/Y et K219Q. Ces mutations apparaissent graduellement. La mutation T215Y sélectionnée plus tardivement, engendre un fort niveau de résistance associée aux autres mutations de résistance (Larder 1994).

Ces mutations de résistance à l'AZT sont également retrouvées dans les virus de patients traités par d4T. C'est pourquoi, elles sont appelées TAMs ("Thymidine Associated Mutations ") (Mouroux *et al.* 2000; Ross *et al.* 2001).

En revanche, ces TAMs diffèrent des mutations de résistance au ddI (codons 65, 74, 184) et au ddC (codons 65, 69, 74, 184). Cependant, l'accumulation des mutations de résistance entraîne une résistance croisée entre tous les inhibiteurs de cette classe.

Le nombre de mutations engendrant la résistance varie selon les inhibiteurs. Par exemple, l'accumulation de multiples mutations est nécessaire pour conférer la résistance à l'AZT, contrairement au 3TC où une seule mutation suffit (M184V) (Boucher *et al.* 1993). En effet, cette mutation suffit à elle seule à conférer un haut niveau de résistance au 3TC (augmentation de 200 à 1000 fois de l'IC 50).

La résistance croisée peut être définie comme la conséquence de la perte de la sensibilité du virus résistant à un ou plusieurs antirétroviraux de la même classe ne figurant pas dans le traitement. Il n'y a pas de résistance croisée entre les différentes classes d'inhibiteurs (NRTI, NNRTI et IP). En revanche, au sein de chacune des classes, et particulièrement les IP, la résistance croisée est fréquente chez les patients en échec de traitement (Race *et al.* 1999).

Deux profils génotypiques particuliers ont été décrits comme responsables d'une résistance croisée entre les inhibiteurs nucléosidiques: les mutations MDR (multidrug resistance) et l'insertion de plusieurs sérines entre les résidus 69 et 70 de la RT.

3.1.2. Mécanisme de la résistance aux NRTI

Les NRTI agissent de manière compétitive avec les déoxynucléosides naturels et provoquent l'arrêt de la synthèse de la chaîne d'ADN. Deux mécanismes biochimiques, impliquant des mutations dans la RT, expliquent la résistance à ces inhibiteurs. Dans le premier mécanisme, la RT résistante différencie les NRTI de leurs analogues naturels (baisse d'affinité pour les NRTI), empêchant leur incorporation dans l'ADN (Huang *et al.* 1998; Selmi *et al.* 2001). Le second mécanisme implique une augmentation de l'excision des NRTI, permettant de continuer la synthèse de l'ADN viral malgré la présence de l'inhibiteur (Arion *et al.* 1998; Gotte *et al.* 2000; Meyer *et al.* 1998; Selmi *et al.* 2001; Sluis-Cremer *et al.* 2000).

3.2. Résistance aux inhibiteurs non nucléosidiques

Les inhibiteurs non nucléosidiques (NNRTI) interagissent avec une poche hydrophobe proche du site actif de la RT. Les mutations de résistance aux NNRTI sont toutes situées dans cette poche où se fait la liaison avec l'inhibiteur. Une seule mutation suffit à conférer un haut niveau de résistance à un ou plusieurs NNRTI (Deeks 2001; Larder 2001). L'émergence de ces variants résistants est rapide, suggérant la sélection de mutants préexistants. Ils remplacent les virus sauvages en deux à trois semaines. De plus, contrairement aux inhibiteurs de la protéase, ces mutations ne sont pas situées dans le site actif, et n'entraînent pratiquement pas de baisse de la capacité répliquative du virus. D'autre part, même si les NNRTI sont des molécules biochimiquement différentes, toutes les mutations de résistance de l'ensemble de ces composés sont localisées dans le même endroit. Il n'est alors pas surprenant d'observer une très forte résistance croisée entre les différents NNRTI.

4. Résistance aux inhibiteurs de la protéase

Les inhibiteurs de la protéase (IP) sont parmi les molécules les plus actives et sont largement prescrits dans les thérapies les plus efficaces (HAART) contre le HIV-1. Toutefois, lorsque les IP n'arrivent pas à supprimer complètement la réplication du HIV-1, de nombreux variants porteurs de mutations de résistance dans la protéase sont sélectionnés (Condra *et al.* 1995; 1996; Molla *et al.* 1996; Shafer *et al.* 1999). Il existe au moins 21 positions dans la protéase qui sont impliquées dans la diminution de la réponse aux IP (figure 28) (Boden *et al.* 1998; Shafer *et al.* 1999). Ces mutations sont situées, soit dans le site actif de l'enzyme, soit à distance mais peuvent modifier son activité. C'est pourquoi d'autres mutations compensatrices situées dans la protéase ou dans le précurseur Gag sont sélectionnées par la suite.

4.1. Effet des mutations sur la sensibilité du HIV

En général, la résistance aux IP est un phénomène progressif et cumulatif. Cette accumulation de mutations se fait par étapes, accompagnée d'une augmentation graduelle du niveau de résistance (Condra *et al.* 1995; Erickson 1995; Molla *et al.* 1996; Tisdale *et al.* 1993).

Parfois, une mutation spécifique peut être responsable de la résistance. C'est le cas de la mutation I50V pour l'**Amprénavir**. (Partaledis *et al.* 1995). Cette mutation s'accompagne ensuite de mutations secondaires.

La résistance croisée aux IP a été décrite dès 1995. Condra *et al.* a montré que cinq variants, isolés à partir de quatre patients en échappement de traitement à l'IDV, étaient également résistants à 6 autres IP (Condra *et al.* 1995). L'IDV n'est pas le seul inhibiteur à engendrer une résistance croisée. En effet, dans une étude plus large incluant 6000 échantillons cliniques, 59 % à 80 % des virus de ces échantillons résistants à un IP sont également résistants à un autre IP (Hertogs *et al.* 2000).

Cependant, l'Amprénavir semble peu affecté par la résistance croisée. Chez les patients en première ligne d'APV, 4 profils de mutations ont été décrits comme associés à l'échappement. Ce sont les mutations I50V, I54L/M, I84V ou V32I + I47V (Maguire *et al.* 2002). Chez ces patients, les mutations décrites comme associées aux autres IP ne sont pas

retrouvées. Il n'existe pas de données concernant les profils d'échappement à l'APV chez les patients prétraités par les IP.

A l'inverse, certains variants résistants à un IP peuvent être hypersensibles aux autres IP (Miller 2001). Par exemple, un virus porteur des mutations M46L/I50V (sélectionnées par l'Amprénavir) est de 2 à 4 fois plus sensible au SQV et à l'IDV *in vitro* que le virus sauvage (Tisdale *et al.* 1995). De même, la mutation N88S entraîne une hypersensibilité à l'Amprénavir. Enfin, une autre étude clinique plus récente, menée par Larder *et al.*, montre que les virus contenant les mutations aux résidus 48 et 82 sont plus sensibles au Tipranavir (Larder *et al.* 1999).

4.2. Effet des mutations sur les capacités répliquatives du HIV-1

Les mutations de résistance entraînent des changements dans la structure de la protéase qui réduisent l'affinité entre l'inhibiteur et l'enzyme résistante. Plusieurs équipes ont montré que ces variants, porteurs de mutations de résistance, sont moins infectieux que le virus sauvage *in vitro* (Borman *et al.* 1996; Croteau *et al.* 1997; Kaplan *et al.* 1993) et chez les patients traités aux IP (Zennou *et al.* 1998; Zhang *et al.* 1997). En effet, la protéase du HIV est une petite molécule compacte dont le site actif est de taille limitée et ne pourra alors supporter qu'un nombre restreint de mutations compatibles avec la persistance de sa fonction catalytique (Loeb *et al.* 1989). De plus, la plupart des résidus impliqués dans la résistance sont hautement conservés pour les différents HIV, suggérant que ces résidus sont essentiels pour une fonction optimale de l'enzyme (Barrie *et al.* 1996; Winslow *et al.* 1995). En déstabilisant la structure de la protéase, ces mutations de résistance perturbent les interactions entre l'enzyme résistante et le substrat et provoquent une maturation incomplète des protéines structurales et enzymatiques du virus.

Certaines de ces substitutions, d'un ou plusieurs acides aminés, ont des effets plus drastiques sur la capacité répliquative du virus (Clavel *et al.* 2000; Miller 2001). Ces mutations dites "primaires" apparaissent assez tôt dans la résistance. Elles sont relativement spécifiques de chacun des inhibiteurs et sont corrélées avec l'échec virologique (Kaufmann *et al.* 2001). La majorité de ces mutations est située dans le site actif de l'enzyme (résidus 30, 48, 50, 82 et 84) et diminue l'interaction de l'enzyme avec le substrat. D'autres mutations, comme celles affectant le résidu 90, interagissent indirectement sur la conformation de l'enzyme et altèrent

ainsi la liaison entre l'enzyme et son substrat. D'autre part, toutes ces mutations sont nécessaires mais pas suffisantes pour l'émergence d'un haut niveau de résistance. Elles confèrent en effet une modeste réduction de la sensibilité aux IP (de 3 à 10 fois) (Jacobsen *et al.* 1996). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces mutations primaires entraînent une perte de la capacité répliquative du virus ("fitness") (Erickson *et al.* 1999).

B. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les inhibiteurs de protéase (IP), du fait de leur puissante activité anti-rétrovirale, ont beaucoup amélioré le traitement de l'infection à HIV. Cette activité est en rapport avec une diminution importante de la charge virale et une restauration immunitaire qui ont pour conséquences une progression plus lente de la maladie et une amélioration de la survie des patients. Cependant, l'émergence de souches virales mutantes résistantes aux molécules utilisées et la survenue de résistance croisée aux molécules auxquelles le patient n'avait jamais été exposé, entraînent un nombre croissant d'échec au traitement anti-rétroviral. Cela rend difficile une prise en charge en 2^e ou 3^e ligne de traitement, avec des options thérapeutiques restreintes. Actuellement, il est recommandé d'effectuer un génotype de résistance avant tout changement thérapeutique pour échec virologique, afin d'adapter au mieux le nouveau traitement antirétroviral (Delfraissy, 2002). C'est pourquoi, il est indispensable d'avoir des données sur les bases génétiques de la résistance aux antirétroviraux, afin de comprendre les phénomènes d'émergence de mutants résistants et de mieux traiter les patients. Récemment, un nouvel inhibiteur de protéase, l'APV, a été développé et est utilisé dans de nombreux pays. Quelques études ont permis de caractériser les profils de résistance à l'APV chez des patients n'ayant jamais reçu d'IP auparavant (Maguire, 2002). Cependant, peu d'études ont été menées chez des patients prétraités par des IP et en échec de traitement.

Cette étude se propose donc d'étudier les mutations de résistance sélectionnées par l'APV, utilisé en association avec le Ritonavir (RTV) après 24 semaines de traitement chez des patients prétraités par d'autres IP. Pour cela, nous avons utilisé les prélèvements recueillis pour le protocole GENOPHAR qui avait pour but d'évaluer l'intérêt des tests de résistance et des dosages pharmacologiques dans la prise en charge de patients en échec thérapeutique. On s'attachera également à déterminer s'il existe des relations entre les mutations sélectionnées sous APV, le niveau de la réplique virale (CV plasmatique) et les concentrations plasmatiques d'APV.

C. PATIENTS ET METHODES

I. PATIENTS

1. Protocole Génophar

L'étude **Génophar** s'est déroulée à l'Hôpital de la Pitié Salpêtrière à Paris entre novembre 1999 et juin 2000. Elle avait pour but d'évaluer l'apport des dosages pharmacologiques associés à l'étude génotypique du HIV-1 dans l'adaptation des traitements antirétroviraux chez les patients en échappement virologique (CV supérieure à 1000 copies/ml) notamment dans le but d'une épargne de nouvelles molécules. Il s'agit d'une étude comparative, ouverte, randomisée, prospective, monocentrique comportant deux groupes de patients traités pendant 6 mois. Les patients recevaient à J0, 2 ou 3 NRTI associés à 1 ou 2 IP. Le choix des NRTI et des IP était basé sur le génotype de résistance du HIV-1 réalisé pendant le recrutement des patients. La randomisation est faite à J0 en deux bras :

• Groupe 1 : résultats pharmacologiques immédiats

Dans ce groupe, l'adaptation thérapeutique est faite à S4 en fonction des résultats des dosages pharmacologiques des NRTI et des IP et de l'étude génotypique réalisés à J0.

Groupe 2 : Résultats pharmacologiques différés

Dans ce groupe, l'adaptation thérapeutique n'est faite qu'à S12 en fonction des résultats des dosages pharmacologiques des NRTI et des IP à S8 et de l'étude génotypique réalisés à J0.

1.1. Critère principal

L'efficacité du traitement antirétroviral était définie par une charge virale HIV-1 inférieure à 200 copies/ml à S12 et S24.

1.2. Critères secondaires

Ils étaient au nombre de six :

- Le pourcentage de patients ayant une CV HIV-1 inférieure à 200 copies/ml à S12 et S24.
- L'évolution de la CV entre la valeur à l'inclusion, S12 et S24.
- L'évolution des concentrations plasmatiques après modifications du traitement.

- L'efficacité immunologique, jugée sur l'amplitude de la variation des taux de lymphocytes CD4+ entre J0, S12 et S24.
- La tolérance clinique et biologique des associations utilisées.
- Le nombre de nouvelles molécules utilisées

1.3. Critères d'éligibilité des patients de l'étude

1.3.1. Critères d'inclusion

Les patients inclus répondent aux critères suivants :

- Patient âgé d'au moins 18 ans, séropositif pour le VIH-1 confirmé par Western Blot.
- Patient traité par au moins une trithérapie non modifiée depuis au moins 3 mois, comprenant au moins un inhibiteur de la protéase et/ou un analogue non nucléosidique de la transcriptase inverse.
- Patient en échappement virologique défini par une CV supérieure à 1000 copies/ml évaluée en préinclusion.
- Suivi possible pendant toute la durée de l'étude

1.3.2. Critères de non inclusion

Ne sont pas inclus dans l'étude les patients :

- participant à un autre essai thérapeutique
- ayant une infection opportuniste en phase aiguë
- n'ayant pas eu d'étude génotypique antérieure
- ayant une CV supérieure à 50000 copies/ml, un nombre de CD4 inférieur à $200/\text{mm}^3$ depuis au moins 6 mois.

2. Sélection des patients pour notre étude

Parmi les patients inclus dans l'étude Génophar, nous avons sélectionné les patients prétraités par IP, mais n'ayant jamais reçu d'APV avant l'entrée dans l'étude. Parmi ceux-ci, les patients qui recevaient 2 ou 3 NRTI en association avec du RTV (100 mg x 2) et de l'APV (600 mg x 2) ont été retenus. Cette combinaison d'antirétroviraux ne devait pas comporter d'inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (NNRTI). Au total, 49 patients répondant à ces critères ont été sélectionnés.

Les prélèvements des patients étaient effectués à chaque visite durant les 6 mois du suivi du protocole Génophar, c'est-à-dire J0, S8, S12, S18 et S24 et sur chaque prélèvement, la charge

virale plasmatique a été mesurée. Tous les patients ont bénéficié d'une étude génotypique avant l'entrée dans l'étude (J0) et nous avons réalisé un test génotypique pour tous les patients qui présentaient une charge virale supérieure à 200 copies/ml à S24 afin de mettre en évidence l'apparition de mutations de résistance sélectionnées par l'APV chez des patients qui présentaient une réplication virale résiduelle sous pression de sélection antirétrovirale. Une étude génotypique intermédiaire à S12 a également été effectuée sur les prélèvements provenant de patients ayant reçu la combinaison RTV plus APV jusqu'à S12 et ayant changé d'IP pour des raisons d'échec virologique ou plus rarement d'intolérance.

Des dosages pharmacologiques ont été systématiquement réalisés sur tous les prélèvements par le Dr G. Peytavin (Pharmacie, service du Pr Farinetti de l'hôpital Bichat).

II. .TECHNIQUES VIROLOGIQUES

1. Charge virale HIV-1 plasmatique

La détermination de la CV plasmatique est réalisée sur un aliquot de 200 µl de plasma. La trousse utilisée est l'Amplior HIV-1 Monitor[®] v 1.5 des laboratoires Roche Diagnostic. C'est une technique automatisée qui comprend 4 étapes :

- la lyse des particules virales par un agent chaotrope et l'extraction de l'ARN viral,
- la transcription inverse et l'amplification d'une séquence cible très conservée du gène gag avec des amorces biotinylées en 5',
- la dénaturation des amplicons, puis leur transfert dans des puits tapissés d'une sonde oligonucléotidique spécifique,
- après lavage, l'ajout d'un conjugué avidine-péroxydase. La présence d'un complexe amplicon / conjugué est révélée après addition d'un substrat chromogène. L'intensité de la coloration jaune qui apparaît alors est évaluée par spectrophotométrie.

Un standard interne de quantification (QS) permet de déterminer la quantité d'ARN viral présente dans l'échantillon analysé en utilisant la formule suivante :

$$(\text{DO}_{\text{HIV-1}} / \text{DO}_{\text{QS}}) \times \text{nombre de copies du QS par réaction de PCR} \times 40 = \text{nombre de copies d'ARN HIV-1 / ml de l'échantillon analysé}$$

Le seuil de détection de la technique est de 200 copies d'ARN viral / ml (2,3 log).

2. Génotypage du HIV-1

2.1. Extraction des acides nucléiques viraux

Un volume de 1 ml d'échantillon est centrifugé 1 heure à 19200 tours / min et 4°C, puis le culot obtenu est conservé à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN viraux plasmatiques. Pour cela, dans un premier temps, les particules virales sont lysées par mise en suspension puis incubation de 10 min du culot dans 500 µl de tampon de lyse (HCV specimen preparation kit, Amplicor). Dans un deuxième temps, l'ARN viral est précipité par ajout de 500 µl d'isopropanol. Après centrifugation de ce mélange 15 min à 13000 tours / min et 20°C, le culot obtenu est lavé dans 1 ml d'éthanol à 70 %, séché puis mis en suspension dans 50 µl d'eau stérile (Fresenius, France Pharma). L'ARN extrait est conservé à -80°C jusqu'à son amplification.

2.2. Amplification

L'amplification comprend 2 réactions successives de polymérisation en chaîne (PCR) effectuées sur thermocycleurs Biometra ou 9600 Perkin Elmer.

La première amplification (RT-PCR) consiste en la rétrotranscription de l'ARN viral extrait en ADN complémentaire. Cette RT-PCR est suivie d'une PCR dite nichée, avec utilisation d'amorces plus internes encadrant plus précisément le gène de la protéase que l'on désire amplifier.

2.2.1. RT-PCR

Le milieu réactionnel de RT-PCR, d'un volume final de 45 µl, contient 5 µl d'ARN viral extrait, 0,4 mM de chaque désoxynucléoside triphosphate 0,4 µM de chacune des deux amorces, et les réactifs suivants du kit Titan™ One Tube RT-PCR System (Roche) : 24,5 µl d'eau ultra pure, 2,5 µl de DTT, 10 µl de tampon, 1 µl d'inhibiteur de RNAses et 1 µl d'enzyme. La réaction de RT-PCR comprend 40 cycles d'amplification (2 min de dénaturation à 94°C, 30 s d'hybridation à 55°C, 3 min d'élongation à 68°C) et une élongation finale (7 min à 68°C). L'ADNc ainsi obtenu est conservé à -20°C jusqu'à son amplification par PCR nichée.

2.2.2. PCR nichée

Le milieu réactionnel de PCR, d'un volume final de 45 μ l, contient 5 μ l d'ADNc, 0,6 mM de chaque désoxynucléoside triphosphate, 1 μ M d'amorce sens, 0,2 μ M d'amorce anti-sens, 24 μ l d'eau ultra pure, 1 μ l d'ADN polymérase et 10 μ l de tampon du kit TAQ DNA polymerase (Roche). La réaction de PCR nichée comprend une étape de dénaturation initiale (3 min à 94°C), 40 cycles d'amplification (1 min de dénaturation à 94°C, 1 min d'hybridation à 55°C, 1 min d'élongation à 72°C) et une élongation finale (7 min à 68°C).

La pureté de l'ADN amplifié et sa présence en quantité suffisante sont contrôlées en analysant 5 μ l des produits de PCR par électrophorèse dans un gel à 1,5 % d'agarose (Sigma) en tampon TBE. Après coloration du gel par le bromure d'éthidium, les produits d'amplification sont visualisés sous lumière ultraviolette à une taille respective de 750 pb pour la transcriptase inverse et de 300 pb pour la protéase. L'intensité du signal observé est caractérisée comme étant faible, moyenne ou forte. Les produits d'amplification sont congelés à -20°C jusqu'à détermination de leur séquence nucléotidique.

2.3. Détermination de la séquence nucléotidique des produits de PCR

2.3.1. Purification des produits de PCR

La purification des ADN précédemment amplifiés est effectuée sur colonnes Microcon^R 100 (Millipore). Les produits de PCR sont déposés sur la membrane d'une colonne qui est ensuite centrifugée 20 min à 3000 tours / min et 4°C. Après ajout de 20 μ l de tampon Tris HCl 5 mM pH8, ce dernier est laissé en contact avec la membrane pendant 1 à 2 min. Puis, la colonne est retournée et centrifugée 3 min à 3000 tours / min et 4°C. Les produits de PCR purifiés alors obtenus sont dilués dans un volume de 50, 250 ou 500 μ l d'eau, selon l'intensité du signal respectivement faible, moyenne ou forte observée lors de leur analyse en gel d'agarose avant purification. Les produits de PCR purifiés sont congelés à -20°C jusqu'à la réaction de séquence.

2.3.2. Réaction de séquence

Après purification des produits de PCR, on procède à la réaction de séquence proprement dite. La méthode utilisée dérive de la technique de Sanger utilisant des didéoxynucléotides marqués avec des fluorochromes distincts.

La réaction d'élongation d'amorce nucléotidique sens ou anti-sens, effectuée sous un volume de 7 μ l contenant 3 μ l d'ADN purifié, 1,6 pmol d'amorce et 2 μ l de mélange réactionnel (DNA Sequencing kit/ Big Dye Terminator Cycle Sequencing, Perkin Elmer), comporte 25 cycles d'amplification (10 s de dénaturation à 94°C, 10 s d'hybridation à 55°C, 4 min d'élongation à 60°C).

Les produits de séquence sont ensuite précipités par ajout de 25 μ l d'éthanol absolu et 1 μ l d'acétate de sodium 3M pH 4,6 (Perkin Elmer). Après 10 min d'incubation dans la glace, le mélange précédent est centrifugé 20 min à 13000 tours / min et 4°C. Le culot ainsi obtenu est lavé avec 250 μ l d'éthanol à 70 %, séché 1 min à 94°C de façon à obtenir un résidu sec, puis conservé à -20°C sans dépasser 10 jours.

2.4. Séquençage

Le gel de séquence est préparé extemporanément à partir du kit Long Ranger Single Pack (TEBU) selon les recommandations du fabricant. Le gel est coulé entre deux plaques de verre ABI 377 (Perkin Elmer), puis placé sur le séquenceur ABI 377 PE (Perkin Elmer). Les échantillons à analyser sont préparés en remettant en suspension les culots obtenus après la réaction de séquence dans 3 μ l d'un mélange composé de 5 volumes de formamide désionisé (Perkin Elmer) et d'un volume de bleu dextran (Perkin Elmer). Les échantillons sont ensuite dénaturés en les plaçant 2 min à 95°C puis, pour éviter une réhybridation des brins dénaturés, immédiatement dans la glace. Ils sont ensuite déposés dans le gel de séquence à raison de 2 μ l par puits, puis soumis à une électrophorèse pendant 9 heures dans les conditions préconisées par le fabricant.

2.5. Analyse des résultats

La gestion des réactions de séquence est effectuée par le logiciel ABI Prism 377 version 3.0 (Perkin Elmer), l'analyse des signaux de migration et leur transcription en fluorogrammes par le logiciel Sequence Analysis.

L'interprétation des fluorogrammes est effectuée à l'aide des logiciels Sequence Navigator (Perkin Elmer) et Edit View. Les séquences des produits de PCR à étudier sont ensuite comparées à une séquence consensus B du HIV-1 qui regroupe les principaux variants répertoriés.

III. DOSAGES PHARMACOLOGIQUES

Le dosage d'APV a été effectué par le Dr G. Peytavin dans le service de la Pharmacie de l'hôpital Bichat du Pr Farinetti.

Après une extraction liquide/liquide à partir du plasma de patients infectés par le HIV, le dosage de l'APV est effectué par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en polarités de phase inversées, avec une détection UV. La limite de quantification a été calculée à environ 5 ng/ml (Marcelin et al. 2003).

IV. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS

L'ensemble des résultats a été analysé par le logiciel Statview. Un test non paramétrique de Mann Whitney a été effectué pour étudier la relation entre le nombre de mutations à J0 et l'acquisition ou non de mutations. Nous avons également fait un test de corrélation de Spearman pour étudier la relation entre la diminution de la charge virale et la concentration plasmatique résiduelle d'APV. Le seuil de significativité de ces tests est à fixé à 5%.

D. RESULTATS

I. Caractéristiques des patients

La plupart des patients inclus dans l'étude ont un passé thérapeutique relativement lourd (2 IP reçus en médiane). Le virus présent chez ces patients est porteur d'un grand nombre de mutations de résistance (en médiane 4 mutations dans le gène de la transcriptase inverse et 6 mutations dans le gène de la protéase). Les mutations de résistance qui ont été prises en compte sont celles qui sont répertoriées par l'IAS (International AIDS Society, cf annexes).

Les caractéristiques des patients à l'entrée dans notre étude sont résumées dans le **tableau 4**:

Caractéristiques	Valeur
Nombre de patients	N = 49
Sexe	M/F = 44/5
Age médian (années)	45 (28-57)
Charge virale VIH-1 (log copies/ml)	4.13 (3.0-5.2)
Nombre médian de lymphocytes CD4 /mm ³	286 (48-700)
Médiane du nombre d'IP reçus dans les régimes antérieurs	2 (1-6)
RTV	15
IDV	46
SQV	6
NFV	30
SQV/RTV	24
IDV/RTV	6
Médiane du nombre de mutations sur le gène de la protéase	
<i>Total des mutations = majeures + mineures</i>	6 (1-10)
<i>Majeures</i>	2 (0-4)
<i>Mineures</i>	4 (1-7)
Médiane du nombre de mutations sur le gène de la transcriptase inverse	4

Tableau 4: Caractéristiques des patients à l'entrée dans notre étude

II. Réponse virologique

L'évolution de la CV chez les patients de notre étude est résumée ci-dessous :

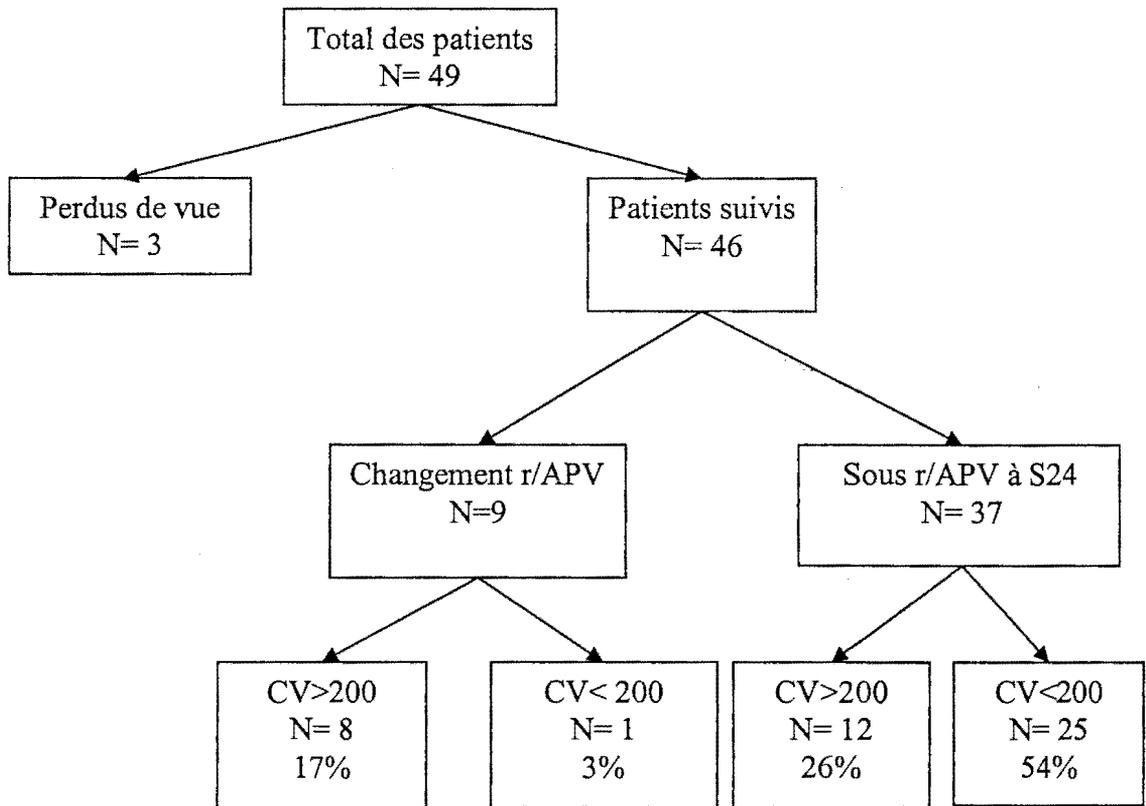


Figure 13 : Evolution de la CV chez les patients de notre étude.

Sur les 49 patients sélectionnés, 46 ont été suivis jusqu'à S24. Parmi eux, 37 sont restés sous RTV plus APV (r/APV) jusqu'à S24, 8 ont reçu du lopinavir (LPV) en remplacement de l'APV après S12, et un patient a reçu du saquinavir (SQV) en remplacement de l'APV après S12. A S24, sur les 37 patients sous RTV plus APV, 25 ont une charge virale (CV) indétectable avec la technique utilisée (< 200 copies/ml) et 12 ont une CV > 200 copies/ml. Nous avons étudié l'émergence de mutations de résistance chez ces 12 patients par séquençage du gène de la protéase, en comparant la séquence à S24 à celle qui avait été obtenue à J0. Parmi les 8 patients qui étaient sous LPV à S24, seul un patient était indétectable à S24 et le patient qui était sous SQV avait une charge virale > 200 copies/ml à S24.

Par ailleurs, la médiane de diminution de la CV chez l'ensemble des patients est de $- 1.26$ log à S8, $- 1.32$ log à S12 et $- 1.46$ log à S24 (analyse en intention de traiter).

Parmi les patients qui ont reçu la combinaison r/APV jusqu'à S24, il existe une corrélation entre la diminution de la CV à S24 et la concentration résiduelle d'APV mesurée à S24 ($r=0.35$, $p=0.05$). C'est-à-dire que les patients qui avaient une concentration plasmatique résiduelle d'APV élevée à S24 présentaient une diminution de CV plus importante que les patients qui avaient une concentration d'APV basse.

III. Résistance

Les mutations présentes dans le gène de la protéase avant l'entrée dans l'étude chez les patients qui ont une CV < 200 à S24 sont récapitulées dans le **tableau 5**.

Patients	Mutations présentes à J0 chez les patients ayant une CV < 200 à S24
1	L10I E35D M36I I62V L63P A71V V82A L90M I93L
2	K20R E35D M36I R41K I62V L63P H69K A71V G73S L90M I93M
3	K20I E35D M46I I62V L63P A71V G73S L90M
4	I15L D25V D30N E35V L63P V77I N88D
5	I15V L63P
6	L10I I13V M46L I84V L63P A71T V82A
7	L10F S37D K43R M46L I84V L63P A71V V82A L90M Q92K
8	K20I M46I L63P A71V G73S V77I L90M I93L
9	I13V M46I D60E Q61D I62V L63P Q92E
10	I13V D30N R41K M46I L63P A71T V77I N88D
11	L10F I13V D30N E35D M36I R41K Y59F I62V L63P N88D I93L
12	D30N L63P N88D
13	I13V I15V K20T E35D M36L S37T I62V L63P I64V L90M I93L
14	L10I I13V L24I L33F M36I R41K I84V I62V L63P A71V T74A V82S
15	L10I E35D S37D K43T M46L I84V K55R I62V L63P C67D A71V I72V V82A L90M I93L
16	I3N T4S A28T D29V R57K L63P I93L
17	L10T K14R R41K M46L L63P A71V V82T L90M I93L
18	L10I I13V R41K G48V I84V L63P A71T V82A I84V I93L
19	L10I K20R E35D M36I I84V R57K D60E I62V L63P V77I L90M I93L
20	M46I Q61E L63P A71V I84V I93L
21	L10I I15V R41K I62V L63T A71T I72T V82A I93L
22	S37D M46I R57K L63P H69Y A71V V77I L90M I93L
23	L10I S37D L63P G73S V77I L90M I93L
24	L10I E34K R41K G48W I84V Q61E L63P K70R A71V V82A L90M I93L
25	L10I L63A A71V G73S V77I L90M I93L

Tableau 5: Mutations présentes à J0 dans le gène de la protéase chez les patients ayant une CV < 200 à S24 (en orange, les mutations classiquement associées à l'APV et en bleu les mutations majeures aux autres IP).

Le séquençage à J0 du gène de la protéase du HIV-1 chez les patients qui ont une CV < 200 copies/ml montre que le virus présent chez ces patients est en général porteur de mutations majeures classiquement décrites comme associées à la résistance aux IP de première génération.

Patients	Mutations à J0	Mutations acquises à S24	Reversion
1	L10I E35D M36V S37D M46L I54V R57K I62V L63P I64V A71V I85V L90M	PT non amplifiable	
2	E35D S37N R57K L63P A71V G73S V77I L90M I93L	Pas d'acquisition	Pas de reversion
3	L10I E35D S37E M46I I62V L63P A71V I72L G73S L90M I93L	L33F V82F	I10L
4	K20R V32I E35D M36I S37D R41K M46I I47V L63P A71T V82A L90M I93L	Pas d'acquisition	Pas de reversion
5	S37C R41K I54V L63P A71V V77I V82A L90M I93L	L33F M46L I85V	Pas de reversion
6	I13V L23I L33F S37N M46L F53L I54V L63P A71V V82A I85V L90M I93L	L10I H69Y V77I	L53F
7	L10I I13V K14R I15V K20M E35D M36I S37D T12S E21Q L33F M46I I50A I54V R41K I64A I62V L63P I66F A71V V82T Q92K	L90M	Pas de reversion
8	I13V V32I M36I S37N M46L L63P A71V L89V L90M	L38W	Pas de reversion
9	L10I K14R I15V V77I E35D S37D M46I I72I L63P V82A I85V I93L	I50A	R14K
10	L10I S37N R57K L63P	N88S	I10L
11	L10F I13V K14R K20T D30N E35D M36I S37D L63P I64V A71V N88D	D35E M46L I62V I66F L90M	N30D P63L D88N
12	L10I E35D S37D M46L L63P A71V G73S I50A L90M	D35E, D37N	Pas de reversion

Tableau 6: Résultats du séquençage du gène de la protéase du HIV-1 chez les patients sous APV jusqu'à S24.

Les mutations acquises et les reversions de mutations sur le gène de la protéase chez les patients restés sous APV jusqu'à S24 sont résumées dans le **tableau 6**.

La mutation M46I/L est la mutation majeure le plus souvent acquise (3 fois). Les mutations I84V et L90M ont été retrouvées dans 2 souches virales. Un patient a acquis les mutations I50V et I54V et un autre a acquis la mutation V82F. Par ailleurs, une ou plusieurs mutations mineures ont été acquises par 8 patients. Parmi celles-ci, la mutation L33F est la plus fréquemment retrouvée (3 fois). Trois patients ayant une CV détectable à S24 n'ont acquis aucune mutation dans le gène de la protéase. En revanche, les souches virales de 5 patients sont revenues à l'état sauvage notamment au niveau des positions 10, 14, 30, 53, 63, 88.

Les patients étudiés ont donc sélectionné des mutations majeures impliquées dans les échecs à l'APV en première ligne (I50V, I54V, I84V), ainsi que d'autres mutations classiquement impliquées dans les échecs à d'autres IP.

Pour des raisons d'échec virologique ou plus rarement d'intolérance, certains patients ont reçu la combinaison RTV plus APV jusqu'à S12 et ont changé d'IP par la suite. Une étude génotypique intermédiaire à S12 a également été effectuée sur les prélèvements disponibles pour ces patients. Les caractéristiques génotypiques du HIV-1 de ces patients sont réunies dans le **tableau 7**.

Patients	Mutations à J0	Mutations acquises à S12	Reversion
1	L10I K14R K20R E35D M36I S37D M46L I54V R57K Q61N L63P A71V T74S V82A L90M	I84V I93L	Pas de reversion
2	L10I K20I S37N D60E I62V L63P A71V G73S V77I P79A I84V L90M	I15V/I G40E/G M46I/M I54M L89V/L	Pas de reversion
3	L10I K20R V32I E35D M36I S37N K43T M46I F53L I54V L63C I66F A71V V82A L90M	G16E/G L33I I50V F53L/F	A82V V89L
4	L10I V32I E35D M36I S37E M46I K55N I62V L63P I66F A71V V82A L89V L90M	K20R/K L33F/L I54L/I I66F/I V82A/V	Pas de reversion
5	I13V V32I M36I S37N M46I L63P A71V L89V L90M	Non disponible	Non disponible
6	L10I S37N G48V I54V L63P A71V V77I V82A L90M	G48V/G I54V/I I62V/I I84V/I I93L	Pas de reversion
7	L10V S37N R41K F53L I54V K55R D60E L63P A71V V82VA I84V	Non disponible	Non disponible
8	L10V M36V S37D R41K M46L I54V L63P I64V V82A	I13V/I K20R/K M36I/V I85V/I	Pas de reversion

Tableau 7: Mutations acquises à S12 chez les patients pour lesquels r/APV a été remplacé après S12 par un autre IP.

La mutation I54A/L/M/V est la mutation majeure la plus souvent acquise (3 fois). Les mutations M46I, I50V, V82A et I84V n'ont été retrouvées qu'une fois. La mutation à la position 90 n'est acquise chez aucun patient ; la plupart des patients possédant déjà cette mutation avant l'entrée dans l'étude. Chez 2 patients, on a observé une resélection de la souche sauvage notamment pour les positions 82 et 89.

IV. Relation pharmacologie et sélection de mutations

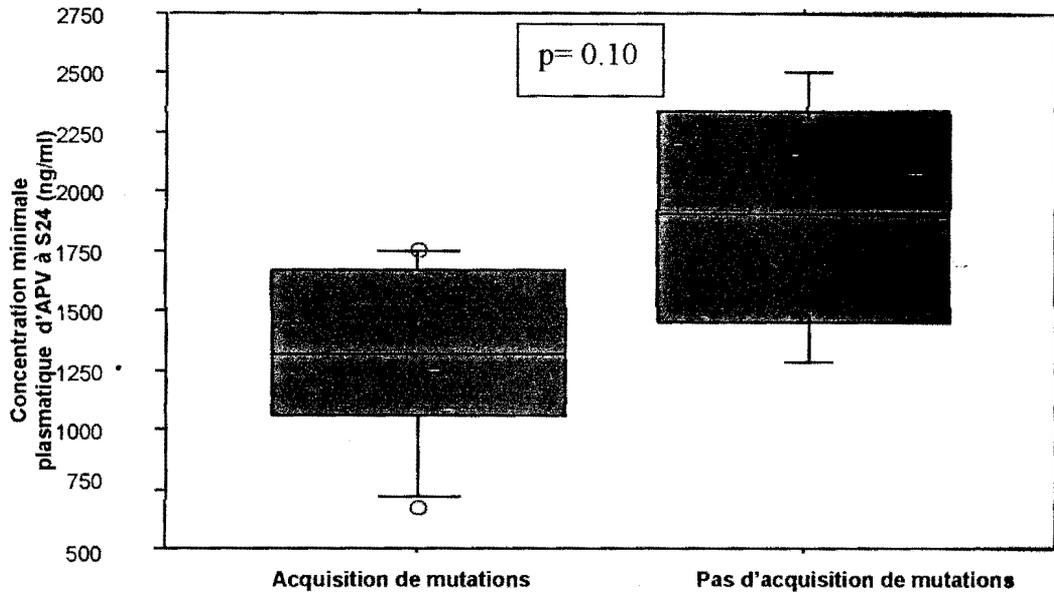


Figure 14: Distribution de la concentration résiduelle d'APV à S24 en fonction de l'acquisition ou non de mutations.

La médiane de la concentration minimale d'APV à S24 chez les patients qui ont acquis au moins une mutation dans le gène de la protéase est de 1300 ng/ml. Cette médiane est sensiblement inférieure à celle observée chez les patients qui n'ont pas acquis de mutations à S24 ($p= 0.10$) **figure 14**.

V. Relations entre mutations et échappement virologique à S24

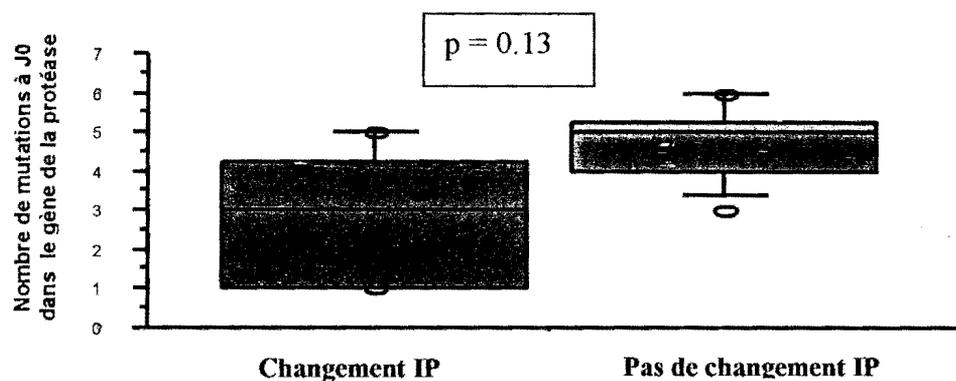


Figure 15: Relations entre le nombre de mutations dans le gène de la protéase à J0 et le changement de la combinaison r/APV par un autre IP.

L'étude de la relation entre le nombre de mutations présentes sur le gène de la protéase à J0 et le changement de la combinaison antiretrovirale r/APV pour un autre IP montre qu'il existe une tendance à un plus grand nombre de changement thérapeutique avant S24 chez les patients infectés par les virus ayant un plus grand nombre de mutations (figure 15).

E. DISCUSSION

Les inhibiteurs de la protéase du HIV-1 (IP) sont parmi les antirétroviraux actuellement utilisés les plus puissants contre ce virus. Ils permettent, en association avec les inhibiteurs de la transcriptase inverse, une diminution profonde et durable de la CV plasmatique, ainsi qu'une élévation du taux de lymphocytes CD4+ et une diminution très significative des infections opportunistes et du nombre de décès (Gulick *et al.* 1997 ; Schapiro *et al.* 1996). Cependant, chez un certain nombre de patients traités, le déclin de la CV après la mise en route du traitement antirétroviral, est parfois transitoire. Un défaut de puissance antirétrovirale ou un défaut d'observance pourra alors être à l'origine de l'émergence de souches virales résistantes porteuses de mutations spécifiques dans le gène de la protéase.

Peu de données sont actuellement disponibles concernant les mutations de résistance sélectionnées sous APV chez les sujets prétraités par d'autres IP. D'où l'intérêt de mieux caractériser les mutations sélectionnées par cet IP chez ces patients afin de mieux les traiter. En effet, il est important de connaître les profils d'échappement à une molécule notamment afin de savoir s'il existe des résistances croisées avec d'autres IP dans le but de définir quels traitements de relais proposer.

Dans cette étude, nous avons étudié les mutations apparues dans le gène de la protéase, chez des sujets prétraités par des IP et mis sous une association APV (600 mg 2 fois par jour) et RTV (100 mg 2 fois par jour). Nous avons également tenté de mettre en évidence les éventuelles relations existant entre ces mutations de résistance, les CV plasmatiques et les concentrations plasmatiques d'APV.

Nous avons tout d'abord retrouvé l'effet bénéfique de la mise en route de l'APV sur la CV plasmatique. Dans notre étude, 54% des patients ont une CV < 200 copies/ml à S24. Cela montre que l'APV garde une bonne efficacité même chez des sujets multitraités et constitue un IP utilisable après plusieurs lignes thérapeutiques. Cette efficacité est probablement en rapport avec la plus faible fréquence de résistance croisée entre l'APV et les autres IP (Schmidt *et al.* 2000).

Nos résultats sont comparables à ceux observés dans une étude allemande. Dans cette étude, Bogner *et al.* a retrouvé une CV < 400 copies/ml chez la moitié des sujets prétraités par des IP après 24 semaines d'APV associé ou non au RTV (Bogner *et al.* 2003). Arvieux *et al.* à Rennes (France) a retrouvé des résultats similaires : après 24 semaines de traitement, 53% des patients prétraités par des IP et mis sous r/APV avait une CV < 200 copies/ml (Arvieux *et al.* 2002).

La diminution de la CV observée dans notre étude (médiane = - 1.46 log à S24) est similaire à celle trouvée par Bogner *et al.* (- 1.4 log) et DeJesus (- 1.50 log) qui ont étudié une population

de patients semblable (Bogner et al.2003 ; DeJesus 2003). En revanche, chez les patients naïfs d'IP, les études montrent une réduction plus importante de la CV. Le pourcentage de patients ayant une CV indétectable après 24 semaines d'APV associé ou non au RTV chez des patients naïfs d'IP varie selon les études entre 30 et 89% (Nadler et al. 2003 ; Noble et Goa 2000 ; Haubrich et al.1999 ; Murphy et al.1998). Cela s'explique par l'hétérogénéité des patients étudiés et des combinaisons d'antirétroviraux utilisés. D'autre part, aucune étude pharmacologique n'était présente dans ces travaux et certains aspects comme l'observance n'étaient pas explorés. Murphy et al. a retrouvé une diminution de la CV de - 1.95 log tandis que Nadler a observé une diminution de - 2.2.log. Cette réduction plus importante de la CV chez les patients naïfs d'IP montre que malgré la moindre fréquence de résistance croisée entre l'APV et les autres IP, l'efficacité d'APV est plus importante lorsque les patients n'ont jamais été traités par des IP.

Dans notre étude de recherche d'acquisition de mutations de résistance sous r/APV, nous avons observé chez les patients étudiés que les mutations sélectionnées pouvaient être celles qui ont été décrites dans les échappements de première ligne à l'APV : I50V, I54M/L, V32I + I47V et I84V (Maguire et al. 2002).

De plus, nous avons montré la possibilité de sélection de mutations classiquement associées à l'échappement aux IP de première génération (IDV, NFV, SQV), comme les mutations L90M et M46I/L. Plusieurs hypothèses sont envisageables : l'APV peut lui-même favoriser l'émergence de ces mutations. En effet, elles peuvent être déjà présentes au sein des quasi-espèces virales et apparaître sous la pression de sélection exercée par l'APV. Il n'est également pas exclu que le RTV à faible dose puisse participer à la sélection de certaines de ces mutations ; ce qui expliquerait la présence de certaines positions mutées : 82 et 90, qui ont été décrites dans les échappements au ritonavir lorsqu'il était utilisé à pleine dose (Markowitz et al. 1995 ; Molla et al. 1996).

L'analyse génotypique à S12 montre que la sélection de certaines mutations de résistance chez les patients sous r/APV peut être très rapide. Ceci est donc très différent de ce qui a été observé chez des patients traités en première ligne par r/APV (Mcmanus, 2003). Dans cette étude, les patients qui recevaient une nouvelle formulation d'APV en association avec du RTV ne présentaient en général pas de mutations au moment de l'échappement.

Nous avons également montré que les patients présentant des concentrations résiduelles élevées d'APV avaient un taux de sélection de mutations plus faible. Ceci avait été montré en monothérapie avec le ritonavir (Molla et al. 1996), mais n'avait jamais été décrit pour l'APV.

Enfin, nous avons montré qu'il existait une relation entre le nombre de mutations de résistance présentes dans le gène de la protéase à J0 et le nombre de changement thérapeutique à S24. Les mutations prises en compte étaient celles qui avaient été incluses dans un score génotypique qui permettait de prédire la réponse après 12 semaines de traitement par r/APV (Marcelin et al. 2003). Dans cette étude, les patients qui avaient à J0 plus de 5 mutations parmi L10F/I/R/V, K20M/R, E35D, R41K, I54V, L63P, V82A/F/T/S, I84V avaient une moins bonne réponse virologique à S12 que les patients qui avaient moins de 5 mutations à J0. Ce score génotypique semble donc être également prédicteur de l'échec à S24, car il existe une tendance à plus de changement thérapeutique chez les patients porteurs de virus ayant un plus grand nombre de mutations.

Si nous n'avons pas pu mettre en évidence de sélection de profils de résistance différents selon les concentrations résiduelles d'APV, comme cela avait été suggéré par Elston et al. (2th workshop on clinical pharmacology in HIV therapy, 2001, poster 5.1), nous avons en revanche montré que de faibles taux résiduels d'APV mesurés à S24 s'accompagnaient d'acquisitions de mutations de résistance et donc d'échec virologique.

En conclusion, cette étude montre que les patients prétraités par des IP et mis sous r/APV sélectionnent aussi bien des mutations décrites dans les échappements à l'APV en première ligne que les mutations classiquement associées à la résistance aux IP de première génération. Enfin, nos résultats confirment les données de la littérature en montrant l'importance de la relation entre mutations de résistance, pharmacologie et réponse virologique.

F. ANNEXES

ANNEXE 1

LE CODE GENETIQUE ET LE SYMBOLISME DES ACIDES AMINES

1 ^{re} position (extrémité 5')	2 ^{ème} position				3 ^{ème} position (extrémité 3')
	U	C	A	G	
U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } Ser UCC } UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Stop UAG } Stop	UGU } Cys UGC } UGA } Stop UGG } Trp	U C A G
C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	CCU } Pro CCC } CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } Arg CGC } CGA } CGG }	U C A G
A	AUU } Ile AUC } AUA } Met AUG }	ACU } Thr ACC } ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } Ala GCC } GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } Gly GGC } GGA } GGG }	U C A G

A	ala	alanine
C	cys	cystéine
D	asp	ac. aspartique
E	glu	ac. glutamique
F	phé	phénylalanine
G	gly	glycine
H	his	histidine
I	ile	isoleucine
K	lys	lysine
L	leu	leucine
M	met	méthionine
N	asn	asparagine
P	pro	proline
Q	gln	glutamine
R	arg	arginine
S	sér	sérine
T	thr	thréonine
V	val	valine
W	trp	tryptophane
Y	tyr	tyrosine

Les codons stop représentent l'arrêt de l'élongation de la chaîne polypeptidique

R = A ou G	N = A,C,G ou T
Y = C ou T	B = C,G, ou T
K = G ou T	D = A,G, ou T
M = A ou C	H = A, C, ou T
S = G ou C	V = A,C, ou G
W = A ou T	

ANNEXE 2

**Séquence consensus B nucléotidique de la souche sauvage du HIV-1 :
gène de la protéase.**

	10	20	30	40	50
1 HIV Prot d	CCTCAGATCA	CTCTTTGGCA	ACGACCCCTC	GTCACAATAA	AGATAGGGGG
	60	70	80	90	100
1 HIV Prot d	GCAACTAAAG	GAAGCTCTAT	TAGATACAGG	AGCAGATGAT	ACAGTATTAG
	110	120	130	140	150
1 HIV Prot d	AAGAAATGAA	TTTGCCAGGA	AGATGGAAAC	CAAAAATGAT	AGGGGGAATT
	160	170	180	190	200
1 HIV Prot d	GGAGGTTTTA	TCAAAGTAAG	ACAGTATGAT	CAGATACTCA	TAGAAATCTG
	210	220	230	240	250
1 HIV Prot d	TGGACATAAA	GCTATAGGTA	CAGTATTAGT	AGGACCTACA	CCTGTCAACA
	260	270	280	290	300
1 HIV Prot d	TAATTGGAAG	AAATCTGTTG	ACTCAGATTG	GTTGCACTTT	AAATTTT

Nom de l'amorce	Réaction utilisant l'amorce	RT/protéase	Sens / Antisens	Tm °C	Taille (Pb)	Structure nucléotidique
MJ3	RT-PCR	RT	Sens	60	20	5'-AGT AGG ACC TAC ACC TGT CA-3'
Mj4	RT-PCR	RT	Antisens	48	21	5'-CTG TTA GTG CT TGG TTC CTC-3'
RT18	RT-PCR 2 ^{ème} choix	RT	Sens	68	31	5'-GGA AAC CAA AAA TGA TAG GGG GAA TTG GAG G-3'
RT21	RT-PCR 2 ^{ème} choix	RT	Antisens	59	31	5'-CTG TAT TTC TGC TAT TAA GTC TTT TGA TGG G-3'
A35	Nested PCR et séquence	RT	Sens	64	35	5'-TTG GTT GCA CTT TAA ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT-3'
NE135	Nested PCR et séquence	RT	Antisens	63	35	5'-CCT ACT AAC TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CAG CT-3'
RT1	Nested PCR 2 ^{ème} choix et séquence 2 ^{ème} choix	RT	Sens	63	29	5'-CCA AAA GTT AAA CAA TGG CCA TTG ACA GA-3'
RT4	Nested PCR 2 ^{ème} choix et séquence 2 ^{ème} choix	RT	Antisens	56	20	5'-AGT TCA TAA CCC ATC CAA AG-3'
5'prot1	RT-PCR	protéase	Sens	60	28	5'-TAA TTT TTT AGG GAA GAT CTG GCC TTC C-3'
3'prot1	RT-PCR	protéase	Antisens	58	30	5'-GCA AAT ACT GGA GTA TTG TAT GGA TTT TCA-3'
5'prot2	Nested PCR et séquence	protéase	Sens	72	28	5'-TCA GAG CAG ACC AGA GCC AAC AGC CCC A-3'
3'prot2	Nested PCR et séquence	protéase	Antisens	60	30	5'-AAT GCT TTT ATT TTT TCT TCT GTC AAT GGC-3'

ANNEXE 3 : Caractéristiques des couples d'amorces utilisés pour la RT-PCR, la PCR nichée (Nested PCR), et la réaction de séquence en fonction du fragment à amplifier.

ANNEXE 4

ANRS - AC 11 : GROUPE RESISTANCE
INTERPRÉTATION DU GENOTYPE : Analogues nucléosidiques et nucléotidiques

	Mutations associées la résistance	Mutations associées une "résistance possible"
AZT	<ul style="list-style-type: none"> T215Y/F > 2 mutations parmi : M41L, D67N, K70R, L210W, K219Q/E Q151M Insertion au codon 69 	
3TC	<ul style="list-style-type: none"> M184V/I Insertion au codon 69 	<ul style="list-style-type: none"> Q151M
ddl	<ul style="list-style-type: none"> L74V > 2 TAMs dont T215Y/F Q151M Insertion au codon 69 	<ul style="list-style-type: none"> K65R
ddC (1)	<ul style="list-style-type: none"> T69D/N/S Q151M Insertion au codon 69 	<ul style="list-style-type: none"> K65R
d4T	<ul style="list-style-type: none"> V75M/S/A/T T215Y/F Q151M Insertion au codon 69 	<ul style="list-style-type: none"> L210W et au moins 2 parmi : M41L, D67N, K70R, K219Q/E
ABC	<ul style="list-style-type: none"> > 5 mutations parmi : M41L, K65R, D67N, K70R, L74V, Y115F, M184V/I, L210W, T215Y/F, 219Q/E Q151M Insertion au codon 69 	<ul style="list-style-type: none"> 4 ou 5 mutations parmi : M41L, K65R, D67N, K70R, L74V, Y115F, M184V/I, L210W, T215Y/F, 219Q/E
TDF	<ul style="list-style-type: none"> Insertion au codon 69 3 TAMs dont M41L ou L210W 	<ul style="list-style-type: none"> K65R

(1) : manque de données sur la résistance la ddC si présence de mutations de résistance aux analogues nucléosidiques.
TAMs = M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, K219Q/E

INTERPRÉTATION DU GENOTYPE : Inhibiteurs non nucléosidiques de la RT

	Mutations associées la résistance
EFV	<ul style="list-style-type: none"> L100I K101E K103N Y181C/I Y188C/L G190A/C/E/Q/S/T/V P225H
NVP	<ul style="list-style-type: none"> L100I K101E K103N V106A Y181C/I Y188C/H/L G190A/C/E/Q/S/T/V
DLV	<ul style="list-style-type: none"> L100I K101E K103N V106A Y181C Y188C/L G190E P236L

INTERPRÉTATION DU GENOTYPE : Inhibiteurs de protase

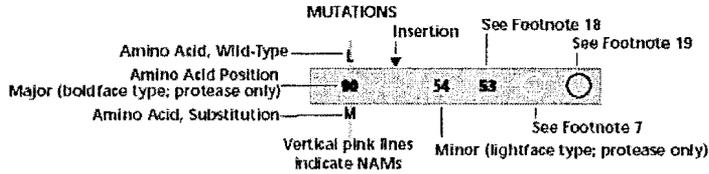
	Mutations associées la résistance	Mutations associées une "résistance possible"
IDV	<ul style="list-style-type: none"> M46I/L V82A/F/S/T I84V L90M et au moins 2 parmi : K20M/R, L24I, V32I, M36I, I54V, A71V/T, G73S/A, V77I 	<ul style="list-style-type: none"> L90M
8QV	<ul style="list-style-type: none"> G48V I84V L90M 	<ul style="list-style-type: none"> V82A/F/S/T et au moins 2 parmi : I54V/L, A71V/T, G73S, V77I
NPV	<ul style="list-style-type: none"> D30N I84V N88S/D L90M 	<ul style="list-style-type: none"> V82A/F/S/T et au moins 2 parmi : M36I, M46I/L, A71V/T, V77I
RTV	<ul style="list-style-type: none"> V82A/F/S/T I84V 	<ul style="list-style-type: none"> L90M et au moins 2 parmi : K20M/R, V32I, L33F, M36I, M46I/L, I54L/V, A71V/T, V77I
APV	<ul style="list-style-type: none"> I50V > 3 mutations parmi : L10I, V32I, M46I/L, I47V, I54L/M/V, G73S, V82A/F/H/T/S, I84V, L90M 	
APV/RTV	<ul style="list-style-type: none"> I50V > 5 mutations parmi : L10I, V32I, M46I/L, I47V, I54L/M/V, G73S, V82A/F/H/T/S, I84V, L90M 	
LPV/r	<ul style="list-style-type: none"> > 7 mutations parmi : L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, M46I/L, I50V, F53L, I54L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, V82A/F/T, I84V, L90M 	<ul style="list-style-type: none"> 6 ou 7 mutations parmi : L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, M46I/L, I50V, F53L, I54L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, V82A/F/T, I84V, L90M

ANNEXE 5

MUTATIONS IN THE PROTEASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO PROTEASE INHIBITORS

Protease Inhibitors¹⁵

	L				M		I			V	I	L						
Multi-Protease Inhibitor Resistance (accumulation of mutations) ¹⁶	10				48		54			82	84	90						
	F R V				L		V M L			A P T S	V	M						
Indinavir ¹⁷	L	K	L		Y	M	M		I	A	G	V	V	I	L			
	10	20	24		32	35	48		54	71	73	77	82	84	90			
	F R V	M R	I		I	I	L		V	V T	S A	I	A P T	V	M			
Ritonavir	L	K			Y	L	M		I	A		V	V	I	L			
	10	20			32	33	36		46	54		71	77	82	84	90		
	F R V	M R			I	F	I		L	V L		V T	I	A P T S	V	M		
Saquinavir	L							G	I	A	G	V	V	I	L			
	10							48	54	71	73	77	82	84	90			
	F R V							V	V L	V T	S	I	A	V	M			
Nelfinavir	L			D		M	M			A		V	V	I	N	L		
	10			30		36	46			71		77	82	84	88	90		
	F I			N		I	L			V T		I	A P T S	V	D S	M		
Amprenavir	L			V		M	I		I			G		I	L			
	10			32		46	47		50	54		73		84	90			
	F R V			I		L	V		V	L		S		V	M			
Lopinavir/ Ritonavir ^{18,19}	L	K	L		Y	L		M	I	I	F	I	L	A	G	V	I	L
	10	20	24		32	33		46	47	50	53	54	55	71	73	82	84	90
	F I R V	M R	I		I	F		L	V	V	L	V	L	V T	S	A P T S	V	M



Amino acid abbreviations are: A, alanine; C, cysteine; D, aspartate; E, glutamate; F, phenylalanine; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; K, lysine; L, leucine; M, methionine; N, asparagine; P, proline; Q, glutamine; R, arginine; S, serine; T, threonine; V, valine; W, tryptophan; Y, tyrosine.

G. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agut, H. 2000. Les réservoirs cellulaires du VIH : mythe ou réalité ? *Virologie* 4: 201-5.

Agut, H., V. Calvez and A. Gautheret-Dejean. 2001. Virologie médicale et infection VIH. *In* VIH édition 2001 (éd. Doin): 11-20.

Amiel, C. 2001. Histoire naturelle immunologique de l'infection à VIH. *Impact Médecine - Guide Infection à VIH 2001*: 79-85.

Arion, D., N. Kaushik, S. McCormick, G. Borkow and M. A. Parniak. 1998. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry* 37(45): 15908-17.

Arvieux, C., P. Tattevin, F. M. Souala, P. Jaccard, A. Ruffault, D. Bentue-Ferrer, O. Tribut, J. M. Chaplain, M. Dupont, C. Bouvier, C. Michelet. 2002. Salvage therapy with amprenavir and ritonavir : prospective study in 17 heavily pretreated patients. *HIV Clin Trials* 3 (2): 125-32

Bani-Sadr, F., P. Perre, G. Peytavin, L. Bernard, J. C. Melchior, C. Perronne and P. de Truchis. 2001. [Indinavir-ritonavir combination: pharmacologic results and tolerance in patients infected by HIV]. *Presse Med* 30(15): 731-5.

Barre-Sanoussi, F. 2001. Virologie fondamentale de l'infection VIH. *In* VIH édition 2001 (éd. Doin): 3-10.

Bafre-Sanoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamarct, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220(4599): 868-71.

Barrie, K. A., E. E. Perez, S. L. Lamers, W. G. Farmerie, B. M. Dunn, J. W. Sleasman and M. M. Goodenow. 1996. Natural variation in HIV-1 protease, Gag p7 and p6, and protease cleavage sites within gag/pol polyproteins: amino acid substitutions in the absence of protease inhibitors in mothers and children infected by human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 219(2): 407-16.

Bazan, J. F. and R. J. Fletterick. 1988. Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: structural and functional implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(21): 7872-6.

Boden, D. and M. Markowitz. 1998. Resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 42(11): 2775-83.

Bogetto N. Boggetto et M Reboud-Ravaux. 2001 La protéase du HIV et le développement d'inhibiteurs. *Virologie* 2001, 5 : S9-18

Bogner J. R., J. Eberle, U. Troendle, F.-D. Goebel. 2003. Amprenavir in pre-treated patients: virological and immunological response in a cohort of 45 patients. *Eur J Med Res* 8: 49-55.

Borman, A. M., S. Paulous and F. Clavel. 1996. Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to protease inhibitors: selection of resistance mutations in the presence and absence of the drug. *J Gen Virol* 77(Pt 3): 419-26.

Boucher, C. A., N. Cammack, P. Schipper, R. Schuurman, P. Rouse, M. A. Wainberg and J. M. Cameron. 1993. High-level resistance to (-) enantiomeric 2'-deoxy-3'-thiacytidine in vitro is due to one amino acid substitution in the catalytic site of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 37(10): 2231-4.

Brun-Vezinet, F. 1999. Résistance aux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH. *Virologie*(3): 55-59.

Brun-Vezinet, F. and D. Descamps. 2001. Résistance aux antirétroviraux. *In* VIH édition 2001 (éd. Doin): 337-349.

Bukrlusky, M. I., N. Sharova, M. P. Dempsey, T. L. Stanwick, A. G. Bukrinskaya, S. Haggerty and M. Stevenson. 1992. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(14): 6580-4.

Calvez, V. 1998. Section 2 : Resistance. *In HIV Resistance and Implications for Therapy* (éd Brendan Larder, Douglas Richman and Stefano Vella.), GILEAD SCIENCES: 211-94.

Carcelain, G. and B. Autran. (2001a). Mécanismes immuno-pathologiques de l'infection VIH. . *In VIH édition 2001* (éd. Doin): 21-34.

Clavel, F. 2001. Résistance du HIV aux inhibiteurs de protéase. *Virologie* 5: 19-27.

Clavel, F., E. Race and F. Mammano. 2000. HIV drug resistance and viral fitness. *Adv Pharmacol* 49: 41-66.

Condra, J. H., W. A. Schleif, O. M. Blahy, L. J. Gabryelski, D. J. Graham, J. C. Quintero, A. Rhodes, H. L. Robbins, E. Roth, M. Shivaprakash and et al. 1995. In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature* 374(6522): 569-71.

Croteau, G., L. Doyon, D. Thibeault, G. McKercher, L. Pilote and D. Lamarre. 1997. Impaired fitness of human immunodeficiency virus type 1 variants with high-level resistance to protease inhibitors. *J Virol* 71(2): 1089-96.

Danner, S. A., A. Carr, J. M. Leonard, L. M. Lehman, F. Gudiol, J. Gonzales, A. Raventos, R. Rubio, E. Bouza, V. Pintado et al. 1995. A short-term study of the safety, pharmacokinetics, and efficacy of ritonavir, an inhibitor of HIV-1 protease. European-Australian Collaborative Ritonavir Study Group. *N Engl J Med* 333(23): 1528-33.

Darke, P. L., C. T. Leu, L. J. Davis, J. C. Heimbach, R. E. Diehl, W. S. Hill, R. A. Dixon and I. S. Sigal. 1989. Human immunodeficiency virus protease. Bacterial expression and characterization of the purified aspartic protease. *J Biol Chem* 264(4): 2307-12.

Deeks, S. G. 2001. International perspectives on antiretroviral resistance. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26(Suppl 1): S25-33.

DeJesus, E., A. LaMarca, M. Sension, C. Beltran, P. Yeni. 2003. The context study : efficacy and safety of GW433908/RTV in PI-experienced subjects with virological failure (24 week results). 10^e conférence Retrovirus Opportunistic Infections fev 10-14, Boston Massachusetts USA abstract 178.

Delfraissy, J. F. Prise en charge des personnes infectées par le VIH. Recommandations du groupe d'experts. Rapport 2002. Médecine-Sciences.

Descamps, D., B. Masquelier, J. P. Mamet, V. Calvez, A. Ruffault, F. Telles, A. Goeschtel, P. M. Girard, F. Brun-Vezinet, D. Costagliola. 2001. 5th Int workshop HIV Drug Resist Treat strat Abstr 136.

Dreyer, G. B., B. W. Metcalf, T. A. Tomaszek, Jr., T. J. Carr, A. C. Chandler, 3rd, L. Hyland, S. A. Fakhoury, V. W. Magaard, M. L. Moore, J. E. Strickler et al. 1989. Inhibition of human immunodeficiency virus 1 protease in vitro: rational design of substrate analogue inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(24): 9752-6.

Elston et al. 2001. 2th workshop on clinical pharmacology in HIV therapy, poster 5.1.

Erickson, J. HIV Resistance and Implications for Therapy, 2nde édition, Section 1 : Virology, Gilead Science.

Erickson, J. W. and S. K. Burt. 1996. Structural mechanisms of HIV drug resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 545-71.

Fontenot, G., K. Johnston, J. C. Cohen, W. R. Gallaher, J. Robinson and R. B. Luftig. 1992. PCR amplification of HIV-1 proteinase sequences directly from lab isolates allows determination of five conserved domains. *Virology* 190(1): 1-10.

Gotte, M., D. Arion, M. A. Parniak and M. A. Wainberg. 2000. The M184V mutation in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 impairs rescue of chain-terminated DNA synthesis. *J Virol* 74(8): 3579-85.

Guedj, R. 1999. Mode d'action des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH. *Virologie* 3: 17-28.

Gulick, R. M., J. W. Mellors, D. Havlir, J. J. Eron, C. Gonzalez, D. McMahon, D. D. Richman, F. T. Valentine, L. Jonas, A. Meibohm, E. A. Emini and J. A. Chodakewitz. 1997. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 337(11): 734-9.

Gustchina, A. and I. T. Weber. 1990. Comparison of inhibitor binding in HIV-1 protease and in non-viral aspartic proteases: the role of the flap. *FEBS Lett* 269(1): 269-72.

Hammer, S. M., K. E. Squires, M. D. Hughes, J. M. Grimes, L. M. Demeter, J. S. Currier, J. J. Eron, Jr., J. E. Feinberg, H. H. Balfour, Jr., L. R. Deyton, J. A. Chodakewitz and M. A. Fischl. 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. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med* 337(11): 725-33.

Haubrich, R., M. Thompson, R. Schooley, W. Lang, A. Stein, D. Sereni, M. E. van der Ende, F. Antunes, D. Richman, G. Pagano, L. Kahl, A. Fetter, D. J. Brown, N. Clumck. 1999. *AIDS* 13 (17): 2411-20

Hertogs, K., S. Bloor, S. D. Kemp, C. Van den Eynde, T. M. Alcorn, R. Pauwels, M. Van Houtte, S. Staszewski, V. Miller and B. A. Larder. 2000. Phenotypic and genotypic analysis of clinical HIV-1 isolates reveals extensive protease inhibitor cross-resistance: a survey of over 6000 samples. *Aids* 14(9): 1203-10.

Huang, H., R. Chopra, G. L. Verdine and S. C. Harrison. 1998. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* 282(5394): 1669-75.

Jacobsen, H., M. Hanggi, M. Ott, I. B. Duncan, S. Owen, M. Andreoni, S. Vella and J. Mous. 1996. In vivo resistance to a human immunodeficiency virus type 1 proteinase inhibitor: mutations, kinetics, and frequencies. *J Infect Dis* 173(6): 1379-87.

Kaplan, A. H., J. A. Zack, M. Knigge, D. A. Paul, D. J. Kempf, D. W. Norbeck and R. Swanstrom. 1993. Partial inhibition of the human immunodeficiency virus type 1 protease results in aberrant virus assembly and the formation of noninfectious particles. *J Virol* 67(7): 4050-5.

Kohl, N. E., E. A. Emini, W. A. Schleif, L. J. Davis, J. C. Heimbach, R. A. Dixon, E. M. Scolnick and I. S. Sigal. 1988. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(13): 4686-90.

Larder, B. A. 1994. Interactions between drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Gen Virol* 75(Pt 5): 951-7.

Len, A. P. and D. Faulds. 1996. Ritonavir. *Drugs* 52(4): 541-6; discussion 547-8.

Ledergerber, B., M. Egger, M. Opravil, A. Telenti, B. Hirschel, M. Battegay, P. Vernazza, P. Hudre, M. Flepp, H. Furrer, P. Francioli and R. Weber. 1999. Clinical progression and virological failure on highly active antiretroviral therapy in HIV-1 patients: a prospective cohort study. *Swiss HIV Cohort Study. Lancet* 353(9156): 863-8.

Loeb, D. D., R. Swanstrom, L. Everitt, M. Manchester, S. E. Stamper and C. A. Hutchison, Jr. 1989. Complete mutagenesis of the HIV-1 protease. *Nature* 340(6232): 397-400.

Loveday, C. 2001. International perspectives on antiretroviral resistance. Nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26(Suppl 1): 10-24.

Lucas, G. M., R. E. Chaisson and R. D. Moore. 1999. Highly active antiretroviral therapy in a large urban clinic: risk factors for virologic failure and adverse drug reactions. *Ann Intern Med* 131(2): 81-7.

Macmanus, S., P. Yates, S. White, N. Richards, W. Snowden. 2003. GW433908 in ART-naïve subjects: absence of resistance at 48 weeks with boosted regimen and APV-like profile with unboosted regimen. 10^e conférence Retrovirus Opportunistic Infections fev 10-14, Boston Massachusetts USA abst 598.

Maguire, M., D. Shortino, A. Klein, W. Harris, V. Manohitharajah, M. Tisdale, R. Elston, J. Yeo, S. Randall, F. Xu, H. Parker, J. May, W. Snowden. 2001. Emergence of resistance to protease inhibitor amprenavir in human immunodeficiency virus type 1-infected patients: selection of viral susceptibility to coadministrated reverse transcriptase nucleoside inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (3): 731-38.

Marcelin, A.-G., C. Lamotte, C. Delaugerre, N. Ktorza, H. Ait Mohand, R. Cacace, M. Bonmarchand, M. Wirden, A. Simon, P. Bossi, F. Bricaire, D. Costagliola, C. Katlama, G. Peytavin, V. Calvez. 2003. Genotypic Inhibitory Quotient as predictor of response to ritonavir-amprenavir in human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (2): 594-600.

Markowitz, M., H. Mo, D. J. Kempf, D. W. Norbeck, T. N. Bhat, J. W. Erickson and D. D. Ho. 1995. Selection and analysis of human immunodeficiency virus type 1 variants with increased resistance to ABT-538, a novel protease inhibitor. *J Virol* 69(2): 701-6.

Meyer, P. R., S. E. Matsuura, A. G. So and W. A. Scott. 1998. Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23): 13471-6.

Miller, V. 2001. International perspectives on antiretroviral resistance. Resistance to protease inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26(Suppl 1): 34-50.

Molla, A., M. Korneyeva, Q. Gao, S. Vasavanonda, P. J. Schipper, H. M. Mo, M. Markowitz, T. Chernyavskiy, P. Niu, N. Lyons, A. Hsu, G. R. Granneman, D. D. Ho, C. A. Boucher, J. M. Leonard, D. W. Norbeck and D. J. Kempf. 1996. Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Nat Med* 2(7): 760-6.

Mouroux, M., J. Izopet, D. Descamps, C. Delaugerre, A. Yvon-Groussin, F. Angleraud, A. Coutellier, M. Bonmarchand, M. A. Valantin, S. Matheron, H. Agut, C. Katlama, F. Brun-Vezinet and V. Calvez. 2000. [Conditions of "thymidine analog mutations" (TAMs) in naive patients treated with different combinations of d4T]. *Pathol Biol (Paris)* 48(5): 508-12.

Mous, J. E. P. Heimer and S. F. Le Grice. 1988. Processing protease and reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type I polyprotein in *Escherichia coli*. *J Virol* 62(4): 1433-6.

Müller-Trutwin, M. and F. Barre-Sinoussi. 1999. Origine du VIH-1, de nouvelles pièces au puzzle. *Virologie* 3: 636-65.

Nadler, J. P., J. C. Jr Gathe, R. B. Jr. Pollard, G. J. Richmond, Q. Liao, S. Griffith, T. Lancaster, J. E. Hernandez, K. A. Pappa. 2003. Twice-daily Amprenavir 1200 mg versus Amprenavir 600 mg/Ritonavir 100 mg, in combination with at least 2 others antiretroviral drugs in HIV-1 infected patients. *BMC Infect Dis*.

Noble, S., K. L. Goa. 2000. Amprenavir : a review of its clinical potential in patients with HIV infection. *Drugs* 60 (6): 1383-410.

Partaledis, J. A., K. Yamaguchi, M. Tisdale, E. E. Blair, C. Falcione, B. Maschera, R. E. Myers, S. Pazhanisamy, O. Futer, A. B. Cullinan and et al. 1995. In vitro selection and characterization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates with reduced sensitivity to hydroxyethylamino sulfonamide inhibitors of HIV-1 aspartyl protease. *J Virol* 69(9): 5228-35.

- Patick, A. K. and K. E. Potts.** 1998. Protease inhibitors as antiviral agents. *Clin Microbiol Rev* 11(4): 614-27.
- Plosker, G. L. and S. Noble.** 1999. Indinavir: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs* 58(6): 1165-203.
- Race, E., E. Dam, V. Obry, S. Paulous and F. Clavel.** 1999. Analysis of HIV cross-resistance to protease inhibitors using a rapid single-cycle recombinant virus assay for patients failing on combination therapies. *Aids* 13(15): 2061-8.
- Roberts, N. A.** 1995. Drug-resistance patterns of saquinavir and other HIV proteinase inhibitors. *Aids* 9(Suppl 2): 27-32.
- Ross, L., K. Henry, D. Paar, P. Salvato, M. Shafer, R. Fisher, Q. Liao and M. St Clair.** 2001. Thymidine-analog and multi-nucleoside resistance mutations are observed in both zidovudine-naive and zidovudine-experienced subjects with viremia after treatment with stavudine-containing regimens. *J Hum Virol* 4(4): 217-22
- Seelmeier, S., H. Schmidt, V. Turk and K. von der Helm.** 1988. Human immunodeficiency virus has an aspartic-type protease that can be inhibited by pepstatin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(18): 6612-6.
- Selmi, B., J. Boretto, J. M. Navarro, J. Sire, S. Longhi, C. Guerreiro, L. Mulard, S. Sarfati and B. Canard.** 2001. The valine-to-threonine 75 substitution in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and its relation with stavudine resistance. *J Biol Chem* 276(17): 13965-74.
- Shafer, R. W., P. Hsu, A. K. Patick, C. Craig and V. Brendel.** 1999. Identification of biased amino acid substitution patterns in human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with protease inhibitors. *J Virol* 73(7): 6197-202.
- Sham, H. L., D. J. Kempf, A. Molla, K. C. Marsh, G. N. Kumar, C. M. Chen, W. Kati, K. Stewart, R. Lal, A. Hsu, D. Betebenner, M. Korneyeva, S. Vasavanonda, E. McDonald, A. Saldivar, N. Wideburg, X. Chen, P. Niu, C. Park, V. Jayanti, B. Grabowski, G. R. Granneman, E. Sun, A. J. Japour, D. W. Norbeck *et al.*** 1998. ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease. *Antimicrob Agents Chemother* 42(12): 3218-24.
- Schmidt, B., K. Korn, B. Moschik, C. Paatz, K. Uberla, H. Walter.** 2000. Low level of cross-resistance to amprenavir (141W94) in samples from patients pretreated with other protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 44 (11): 3213-16.
- Sluis-Cremer, N., D. Arion and M. A. Parniak.** 2000. Molecular mechanisms of HIV-1 resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs). *Cell Mol Life Sci* 57(10): 1408-22.
- Tisdale, M., R. E. Myers, B. Maschera, N. R. Parry, N. M. Oliver and E. D. Blair.** 1995. Cross-resistance analysis of human immunodeficiency virus type 1 variants individually selected for resistance to five different protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 39(8): 1704-10.
- Tomasselli, A. G. and R. L. Heinrikson.** 2000. Targeting the HIV-protease in AIDS therapy: a current clinical perspective. *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2): 189-214.
- Vacca, J. P., B. D. Dorsey, W. A. Schleif, R. B. Levin, S. L. McDaniel, P. L. Darke, J. Zugay, J. C. Quintero, O. M. Blahy, E. Roth and et al.** 1994. L-735,524: an orally bioavailable human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9): 4096-100.
- Winslow, D. L., S. Stack, R. King, H. Scarnati, A. Bincsik and M. J. Otto.** 1995. Limited sequence diversity of the HIV type 1 protease gene from clinical isolates and in vitro susceptibility to HIV protease inhibitors. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11(1): 107-13.
- Zennou, V., F. Mammano, S. Paulous, D. Mathez and F. Clavel.** 1998. Loss of viral fitness associated with multiple Gag and Gag-Pol processing defects in human immunodeficiency virus type 1 variants selected for resistance to protease inhibitors in vivo. *J Virol* 72(4): 3300-6.

Zhang, Y. M., H. Imamichi, T. Imamichi, H. C. Lane, J. Falloon, M. B. Vasudevachari and N. P. Salzman. 1997. Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its Gag substrate cleavage sites. *J Virol* 71(9): 6662-70.

TABLE DES MATIERES

A. INTRODUCTION.....	1
I. EPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION A HIV DANS LE MONDE EN 2002.....	2
1. Modes de transmission de l'infection à HIV.....	2
2. Epidémiologie de la pandémie de HIV en 2002.....	2
II. BASES VIROLOGIQUES DE L'INFECTION A HIV.....	5
1. Définition et classification des rétrovirus.....	5
2. Morphologie et structure du HIV.....	6
2.1. Morphologie du HIV-1.....	6
2.2. Structure du génome.....	8
2.3. La transcriptase inverse (ou reverse transcriptase ou RT).....	10
2.4. La protéase (PR).....	10
2.4.1. Classification des protéases virales.....	10
2.4.2. Structure de la protéase du HIV.....	11
2.4.3. Biochimie de la protéase du HIV.....	13
3. Cycle de réplication du HIV.....	15
3.1. Evénements précoces du cycle de réplication du HIV.....	17
3.1.1. Reconnaissance et entrée du virus dans la cellule cible.....	17
3.1.2. Rétrotranscription de l'ARN viral en ADN viral complémentaire.....	17
3.1.3. Import nucléaire et intégration de l'ADN viral à l'ADN cellulaire.....	19
3.2. Evénements tardifs du cycle de réplication du HIV.....	19
3.2.1. Etapes transcriptionnelles.....	19
3.2.2. Etapes post-transcriptionnelles.....	20
4. Tropisme cellulaire des HIV : rôle des co-récepteurs.....	21
III. IMMUNOPATHOLOGIE DE L'INFECTION A HIV.....	21
1. Déficit immunitaire associé à l'infection à HIV.....	21
2. Evolution immunologique naturelle de l'infection à HIV.....	22
2.1. Phase initiale : primo-infection.....	22
2.2. Phase secondaire : réponse immunitaire.....	23
2.3. Phase terminale : déficit immunitaire profond.....	24
3. Restauration du système immunitaire sous traitement antirétroviral combiné.....	26
IV. DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE D'UNE INFECTION A HIV.....	26
1. Diagnostic virologique indirect.....	26
1.1. Tests de dépistage.....	26
1.2. Tests de confirmation.....	27
2. Diagnostic virologique direct.....	28
2.1. Détection de l'antigène p24.....	28
2.2. Isolement du HIV: co-culture lymphocytaire.....	28
2.3. Détection des acides nucléiques viraux.....	29

V.	LES THERAPIES ANTIRETROVIRALES CONTRE LE HIV.....	30
1.	Les inhibiteurs de la transcriptase inverse.....	31
1.1.	Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (NRTI).....	31
1.1.1.	Mécanisme d'action des NRTI.....	31
1.1.2.	Principales caractéristiques des NRTI commercialisés.....	32
1.2.	Les inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse.....	34
1.3.	Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTI).....	34
1.3.1.	Mécanisme d'action des NNRTI.....	34
1.3.2.	Principales caractéristiques des NNRTI commercialisés.....	35
2.	Les inhibiteurs de la protéase (IP).....	37
2.1.	Mécanisme d'action des IP.....	37
2.2.	Les IP analogues de l'état de transition.....	39
2.3.	Les IP non peptidiques.....	42
2.4.	Le lopinavir.....	43
2.5.	Principales caractéristiques des IP commercialisés.....	44
3.	Les inhibiteurs de fusion.....	46
4.	Principes et objectifs d'un traitement antirétroviral.....	46
VI.	MECANISMES DE RESISTANCE AUX TRAITEMENTS ANTIRETROVIRAUX ET MUTATIONS ASSOCIEES.....	47
1.	Mécanisme général de la résistance virale.....	47
1.1.	Variabilité génétique des HIV.....	47
1.2.	Avantage sélectif des variants mutés (sélection et amplification).....	51
2.	Les tests de résistance aux antirétroviraux.....	51
2.1.	Tests phénotypiques de résistance <i>in vitro</i>	51
2.1.1.	Tests de réduction du nombre de foyers infectieux.....	52
2.1.2.	Tests d'inhibition de la production d'antigène p24 ou d'activité transcriptase inverse par les PBMC.....	52
2.1.3.	Production de virus recombinant à partir de l'ARN viral plasmatique (Recombinant virus assay ou RVA).....	53
2.2.	Tests génotypiques de résistance.....	54
2.2.1.	Tests de séquençage de l'ADN.....	54
2.2.2.1.	Méthode enzymatique des didéoxynucléotides.....	54
2.2.2.2.	Séquençage sur puces à ADN ("gene chip sequencing").....	55
2.2.2.	Tests recherchant une mutation en un point précis de la séquence cible.....	56
2.2.2.1.	PCR à amorces spécifiques ("Primer specific PCR").....	56
2.2.2.1.	Hybridation différentielle.....	56
2.3.	Indications des tests génotypiques.....	57
3.	Résistance aux inhibiteurs de la transcriptase inverse.....	57
3.1.	Résistance aux inhibiteurs nucléosidiques.....	57
3.1.1.	Analyse génotypique.....	58

3.1.2. Mécanisme de la résistance aux NRTI.....	59
3.2. Résistance aux inhibiteurs non nucléosidiques.....	59
4. Résistance aux inhibiteurs de la protéase.....	60
4.1. Effet des mutations sur la sensibilité du HIV.....	60
4.2. Effet des mutations sur les capacités réplcatives du HIV-1.....	61
B. OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	63
C. PATIENTS ET METHODES.....	65
I. PATIENTS.....	66
1. Protocole Génophar.....	66
1.1. Critère principal.....	66
1.2. Critères secondaires.....	66
1.3. Critères d'éligibilité des patients de l'étude.....	67
1.3.1. Critères d'inclusion.....	67
1.3.2. Critères de non inclusion.....	67
2. Sélection des patients pour notre étude.....	67
II. TECHNIQUES VIROLOGIQUES.....	68
1. Charge virale HIV-1 plasmatique.....	68
2. Géotypage du HIV-1.....	69
2.1. Extraction des acides nucléiques viraux.....	69
2.2. Amplification.....	69
2.2.1. RT-PCR.....	69
2.2.2. PCR nichée.....	69
2.3. Détermination de la séquence nucléotidique des produits de PCR.....	70
2.3.1. Purification des produits de PCR.....	70
2.3.2. Réaction de séquence.....	70
2.4. Séquençage.....	71
2.5. Analyse des résultats.....	71
III. DOSAGES PHARMACOLOGIQUES.....	72
IV. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS.....	72
D. RESULTATS.....	73
I. CARACTERISTIQUES DES PATIENTS.....	74
II. REPOSE VIROLOGIQUE.....	75
III. RESISTANCE.....	76
IV. RELATION PHARMACOLOGIE ET SELECTION DE MUTATIONS.....	81
V. RELATIONS ENTRE MUTATIONS ET ECHAPPEMENT VIROLOGIQUE A S24.....	82
E. DISCUSSION- CONCLUSION.....	83
F. ANNEXES.....	87
G. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	95

RESUME

Les inhibiteurs de protéase (IP), du fait de leur puissante activité antirétrovirale, ont beaucoup amélioré le traitement de l'infection à HIV. Cependant, l'émergence des mutants résistants aux molécules utilisées et la survenue de résistance croisée aux molécules auxquelles le patient n'avait jamais été exposé, entraînent un nombre croissant d'échec au traitement antirétroviral. Il est donc recommandé d'effectuer un génotype de résistance avant tout changement thérapeutique pour échec virologique, afin d'adapter au mieux le traitement antirétroviral. Récemment, un nouvel inhibiteur de protéase, l'Amprénavir (APV), a été développé. Cette étude se propose d'étudier les mutations de résistance sélectionnées par l'APV, utilisé en association avec le Ritonavir (RTV) après 24 semaines de traitement chez des patients prétraités par d'autres IP et de déterminer s'il existe des relations entre les mutations sélectionnées sous APV, le niveau de la répliquon virale et les concentrations plasmatiques d'APV.

Quarante-six patients prétraités par des IP et mis sous une combinaison Amprénavir (600 mg 2 fois par jour) et Ritonavir (100 mg 2 fois par jour) ont été suivis pendant 24 semaines. Les résultats montrent que les patients prétraités par des IP et mis sous APV et RTV sélectionnent aussi bien des mutations décrites dans les échappements à l'APV en première ligne que les mutations classiquement associées à la résistance aux IP de première génération (Nelfinavir, Zalcitabine, Indinavir). Cette étude montre également l'efficacité de l'APV chez les patients ayant plus de 4 mutations majeures dans le gène de la protéase et confirme les données de la littérature en montrant l'importance de la relation entre mutations de résistance, pharmacologie et réponse virologique.

DISCIPLINE

Virologie

MOTS CLES

HIV-1, amprénavir, inhibiteur de protéase, résistance

ADRESSE DE L'AUTEUR

Laboratoire de Virologie
Hôpital Pitié Salpêtrière Paris
diso@vip.avu.org