



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*  
Discipline ou spécialité : *Immunologie et maladies infectieuses*

---

Présentée et soutenue par *Stéphanie RAYMOND*  
Le *18 novembre 2010*

Titre :

*CARACTERISATION DU TROPISME DU HIV-1 :  
IMPLICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES ET THERAPEUTIQUES*

---

### JURY

*Madame le Professeur Valérie GIORDANENGO (Rapporteur)*  
*Monsieur le Docteur Jean-Pierre VENDRELL (Rapporteur)*  
*Monsieur le Professeur Vincent CALVEZ (Examineur)*  
*Monsieur le Docteur Bernard MASQUELIER (Examineur)*  
*Monsieur le Professeur Jacques IZOPET (Directeur de thèse)*

---

**Ecole doctorale** : *Biologie-Santé-Biotechnologies*  
**Unité de recherche** : *Laboratoire de Virologie - INSERM U563*  
**Directeur(s) de Thèse** : *Pr Jacques IZOPET*  
**Rapporteurs** : *Pr GIORDANENGO et Dr VENDRELL*

**Au Jury :**

**Madame le Professeur Valérie GIORDANENGO**

**Professeur des Universités – Praticien Hospitalier**

Je voudrais vous remercier d'avoir accepté la charge d'être rapporteur de cette thèse, et de me faire ainsi partager votre connaissance de la physiopathologie de l'infection par le HIV.

**Monsieur le Dr Jean-Pierre VENDRELL**

**Maître de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier**

Je vous remercie de participer à mon jury de thèse en tant que rapporteur et de me faire ainsi bénéficier de votre expertise en recherche fondamentale dans le domaine de l'immunologie du HIV. Je vous remercie pour votre disponibilité.

**Monsieur le Docteur Bernard MASQUELIER**

**Praticien Hospitalier**

Je vous remercie d'avoir accepté d'être examinateur de mon travail de thèse. Nous avons initié des collaborations dans le domaine du tropisme du HIV qui devraient nous conduire à d'autres travaux scientifiques intéressants.

**Monsieur le Professeur Vincent CALVEZ**

**Professeur des Universités – Praticien Hospitalier**

Je voudrais vous remercier d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse en tant qu'examinateur et de me faire ainsi bénéficier de votre expertise dans le domaine du HIV et des tests phénotypiques.

**Monsieur le Professeur Jacques IZOPET**

**Professeur des Universités – Praticien Hospitalier**

Jacques, tu m'as donné l'opportunité de travailler dans ton équipe et ainsi j'ai pu bénéficier de ton expérience dans le domaine de la recherche scientifique et clinique. J'ai apprécié ton enthousiasme pour ton travail et ton soutien dans les étapes professionnelles importantes. La perspective de continuer à travailler dans ton équipe est pour moi un privilège.

À l'équipe du SMIT et aux infectiologues de la région. J'ai plaisir à travailler avec vous tous.

À Catherine, Jean-Michel et Marcel, les « H ». Merci pour vos enseignements et nos riches échanges.

À Sabine, Florence A et Florence N, mes compagnes de recherche et de bureau, à qui je peux tout demander. Et un grand merci à Flo pour avoir passé sa thèse juste avant moi.

À Christophe et Karine, mes maîtres dans le domaine des rétrovirus et des hépatites. Merci pour votre disponibilité et votre bonne humeur.

À Maud, Michelle, Martine, Stéphanie, Patrick et Corinne, pour le travail collaboratif mais pas laborieux que nous avons réalisé ensemble.

À Pierre. Je ne te remercierai jamais assez de partager si généreusement tes compétences et ton enthousiasme... surtout lorsque les manips échouent depuis des semaines. Je serai très honorée de poursuivre notre collaboration.

À Eliane et Laurence, ainsi que toute l'équipe du laboratoire de Virologie, parce qu'il est agréable de travailler avec vous.

À mes parents et mes grands-parents, qui me soutiennent depuis le début. Merci de me laisser faire mes choix et, encore plus difficile, de me laisser partir.

À ma sœur, pour tous les bons moments passés et pour être présente en ce jour particulier.

À mes amies et amis, consoeurs et confrères, avec qui je partage les joies professionnelles autant que personnelles, avec une mention spéciale pour Clément qui est inclassable.

À Virginie, qui me connaît mieux que moi-même.

# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>6</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>9</b>
<b>1. Le HIV-1 : généralités</b>	<b>10</b>
<b>1.1. Organisation génétique</b>	<b>11</b>
<b>1.2. Structure du virion</b>	<b>11</b>
<b>1.3. Cycle de réplication</b>	<b>12</b>
<b>1.4. Variabilité génétique</b>	<b>13</b>
1.4.1. Classification moléculaire du HIV-1	14
1.4.2. Impact de la variabilité du HIV-1 sur la physiopathologie de l'infection	15
<b>2. L'entrée du HIV-1</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Enveloppe du HIV-1</b>	<b>18</b>
2.1.1. Gène de l'enveloppe	18
2.1.2. Glycoprotéines de l'enveloppe du HIV-1	18
2.1.2.1. <i>Synthèse et maturation</i>	19
2.1.2.2. <i>Structure de la gp120</i>	19
2.1.2.3. <i>Structure de la gp41</i>	22
<b>2.2. Récepteurs et corécepteurs cellulaires du HIV-1</b>	<b>23</b>
2.2.1. Récepteur CD4	23
2.2.2. Récepteurs des chimiokines	23
2.2.2.1. <i>Récepteur CCR5</i>	24
2.2.2.2. <i>Récepteur CXCR4</i>	26
2.2.2.3. <i>Régulation de l'expression des corécepteurs</i>	27
<b>2.3. Mécanismes d'entrée du HIV-1</b>	<b>28</b>
2.3.1. Adsorption virale	28
2.3.2. Interaction de la gp120 avec la molécule CD4	28
2.3.3. Interaction de la gp120 avec le corécepteur	29
2.3.4. Fusion des membranes	30
2.3.5. Influence de la composition lipidique membranaire de la cellule cible	30
2.3.6. Synapse virologique	30
2.3.7. Autres mécanismes d'entrée du HIV-1	31
<b>2.4. Signalisation induite par les interactions gp120-CD4-corécepteurs</b>	<b>31</b>
<b>3. Le tropisme et sa caractérisation in vitro</b>	<b>33</b>
<b>3.1. Déterminants du tropisme cellulaire du HIV-1</b>	<b>33</b>
3.1.1. Déterminants du tropisme viral liés aux étapes d'entrée	33

3.1.2. Déterminants du tropisme viral liés aux étapes post-entrée	35
<b>3.2. Méthodes de caractérisation du tropisme viral</b>	<b>35</b>
3.2.1. Méthodes phénotypiques	35
3.2.2. Méthodes génotypiques	38
<b>4. Evolution du tropisme viral au cours de l'infection par le HIV-1</b>	<b>39</b>
<b>4.1. Histoire naturelle de l'infection par le HIV-1</b>	<b>39</b>
<b>4.2. Prédominance des virus R5 en phase précoce de l'infection</b>	<b>40</b>
4.2.1. Transmission muqueuse préférentielle des virus R5	41
4.2.2. Réplication préférentielle des virus R5	42
4.2.3. Contrôle immunitaire des virus X4 au cours de la primo-infection	44
<b>4.3. Emergence de virus X4 au cours de l'évolution de l'infection</b>	<b>44</b>
4.3.1. Accumulation progressive de mutations dans <i>env</i>	44
4.3.2. Facteurs immunitaires impliqués dans l'émergence des virus X4	<b>45</b>
<b>5. Impact du tropisme viral sur la physiopathologie de l'infection</b>	<b>46</b>
<b>5.1. Virus R5 et compartiment lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> mémoire</b>	<b>46</b>
<b>5.2. Virus X4 et compartiments lymphocytaires cibles</b>	<b>47</b>
<b>5.3. Apoptose liée à la gp120 X4</b>	<b>47</b>
<b>5.4. Emergence de virus X4 et progression de la maladie</b>	<b>48</b>
<b>5.5. Emergence de virus X4 et restauration immunitaire sous traitement antirétroviral</b>	<b>49</b>
<b>6. Les antagonistes des corécepteurs d'entrée</b>	<b>50</b>
<b>6.1. Les antagonistes de CCR5</b>	<b>50</b>
6.1.1. Les analogues de chimiokines	50
6.1.2. Les petites molécules antagonistes de CCR5	51
<b>6.2. Les antagonistes de CXCR4</b>	<b>52</b>
6.2.1. Les petites molécules antagonistes de CXCR4	52
6.2.2. Les antagonistes peptidiques et protéiques	53
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL</b>	<b>54</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>57</b>
<b>I Caractérisation phénotypique de l'utilisation des corécepteurs d'entrée par le HIV-1</b>	
<b>ARTICLE 1 :</b>	<b>58</b>
<b>Raymond S., Delobel P., Mavigner M., Cazabat M., Souyris C., Encinas E., Bruel P., Sandres-Sauné K., Marchou B., Massip P., and Izopet J. Development and performance of a new recombinant virus phenotypic entry assay to determine HIV-1 coreceptor usage. <i>Journal of Clinical Virology</i> 2010 ;47 :126-130.</b>	

## **II Détermination génotypique du tropisme du HIV-1**

- ARTICLE 2 :** **61**
- Raymond S., Delobel P., Mavigner M., Cazabat M., Souyris C., Sandres-Sauné K., Cuzin L., Marchou B., Massip P., and Izopet J.** Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism. *AIDS* **2008** ;22 :F11-F16.
- ARTICLE 3 :** **63**
- Raymond S., Delobel P., Mavigner M., Cazabat M., Souyris C., Encinas E., Sandres-Sauné K., Pasquier C., Marchou B., Massip P., and Izopet J.** Genotypic prediction of Human Immunodeficiency Virus Type 1 CRF02-AG Tropism. *Journal of Clinical Microbiology* **2009** ;47 :2292-94.
- ARTICLE 4 :** **65**
- Raymond S., Delobel P., Mavigner M., Ferradini L., Cazabat M., Souyris C., Sandres-Sauné K., Pasquier C., Marchou B., Massip P., and Izopet J.** Prediction of HIV-1 subtype C tropism by genotypic algorithms built from subtype B viruses. *Journal of AIDS* **2010** ;53 :167-175.

## **III Caractérisation du tropisme du HIV-1 en primo-infection**

- ARTICLE 5 :** **67**
- Raymond S., Delobel P., Mavigner M., Cazabat M., Encinas E., Souyris C., Bruel P., Sandres-Sauné K., Marchou B., Massip P., and Izopet J.** CXCR4-using viruses in plasma and Peripheral blood mononuclear cells during primary HIV-1 infection and impact on disease progression. *AIDS* **2010** ;24 :2305-2312.
- DISCUSSION** **70**
- Caractérisation phénotypique de l'utilisation des corécepteurs d'entrée par le HIV-1** **71**
- Évolution des tests de détermination phénotypique du tropisme du HIV-1* 71
- Sensibilité des tests phénotypiques pour la détection des variants minoritaires X4* 72
- Détermination génotypique du tropisme du HIV-1** **73**
- Utilisation des approches génotypiques pour la détermination du tropisme viral chez les patients candidats à un traitement par antagoniste de CCR5* 73
- Sensibilité de la détection des virus X4 avec les tests génotypiques* 74
- Détermination génotypique du tropisme des virus de sous-type non-B* 75
- Caractérisation de la résistance aux antagonistes de CCR5* 77
- Prévalence des virus R5X4 et X4 chez les patients à différents stades de l'infection** **78**
- Tropisme du HIV-1 chez les patients à un stade avancé de la maladie* 78

<i>Sous-type du HIV-1 et tropisme viral</i>	78
<i>Prévalence des virus utilisant CXCR4 au stade de primo-infection</i>	80
<i>Rôle du mode de transmission dans le tropisme du virus du patient nouvellement infecté</i>	82
<b>Le tropisme du HIV-1 comme marqueur prédictif de l'évolution de la maladie</b>	<b>82</b>
<i>Evolution du tropisme du HIV-1 chez les patients chroniquement infectés et impact sur l'évolution de la maladie</i>	82
<i>Impact du tropisme du HIV-1 transmis sur l'évolution de la maladie</i>	83
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>85</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>91</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>112</b>
<b>Recordon-Pinson P, Soulié C, Flandre P, Descamps D, Lazrek M, Charpentier C, Montes B, Trabaud M.A, Cottalorda J, Schneider V, Morand-Joubert L, Tamalet C, Desbois D, Macé M, Ferré V, Vabret A, Ruffault A, Pallier C, Raymond S, Izopet J, Reynes J, Marcelin A.G, Masquelier B and the ANRS AC11 Resistance Study Group.</b> Evaluation of the genotypic prediction of HIV-1 coreceptor use versus a phenotypic assay and correlation with the virological response to maraviroc: the ANRS GenoTropism study. <i>Antimicrob Agents Chemother</i> 2010 ;54 :3335-40.	
<b>Frangé P, Chaix M.L, Raymond S, Galimand J, Deveau C, Meyer L, Goujard C, Rouzioux C, Izopet J and the French ANRS CO 06 PRIMO Cohort study group.</b> Low frequency of CXCR4-using viruses in patients at the time of primary HIV-1 non-B infection. <i>J Clin Microbiol</i> 2010 sous presse.	

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Arbre phylogénétique du gène <i>pol</i> des lentivirus des primates (HIV et SIV)	10
Figure 2. Organisation génétique du HIV-1	11
Figure 3. Cycle répliatif du HIV-1	12
Figure 4. Variabilité génétique du HIV-1	13
Figure 5. Distribution globale actuelle des sous-types et CRFs du HIV-1	15
Figure 6. Schéma de l'entrée du HIV-1	17
Figure 7. Classification des virus selon l'utilisation des corécepteurs d'entrée	18
Figure 8. Boucles V1-V2 et V3 de la gp120	20
Figure 9. Structure du gène de la gp120 du SIV et modélisation tridimensionnelle de la gp120 non liée	21
Figure 10. Modélisation de la structure tertiaire de la boucle V3 de la gp120	22
Figure 11. Modèle structural du récepteur CCR5	24
Figure 12. Modèle de l'interaction entre la gp120 trimérique fixée au récepteur CD4 soluble et le corécepteur CCR5	25
Figure 13. Interaction de l'extrémité N-terminale de CCR5 avec la gp120 du HIV-1 liée à CD4	29
Figure 14. Signalisation par les MAPKinases (A) et FAK/PYK2 (B) induite par la liaison de la gp120 sur CCR5 ou CXCR4	32
Figure 15. Relation entre phénotypes SI/NSI, R5/X4 et tropisme lymphocytaire/macrophagique	37
Figure 16. Evolution du tropisme R5/X4 au cours de l'histoire naturelle de l'infection par le HIV-1	40
Figure 17. Transmission muqueuse du HIV-1	42
Figure 18. Structure chimique du maraviroc	51



## ABBREVIATIONS

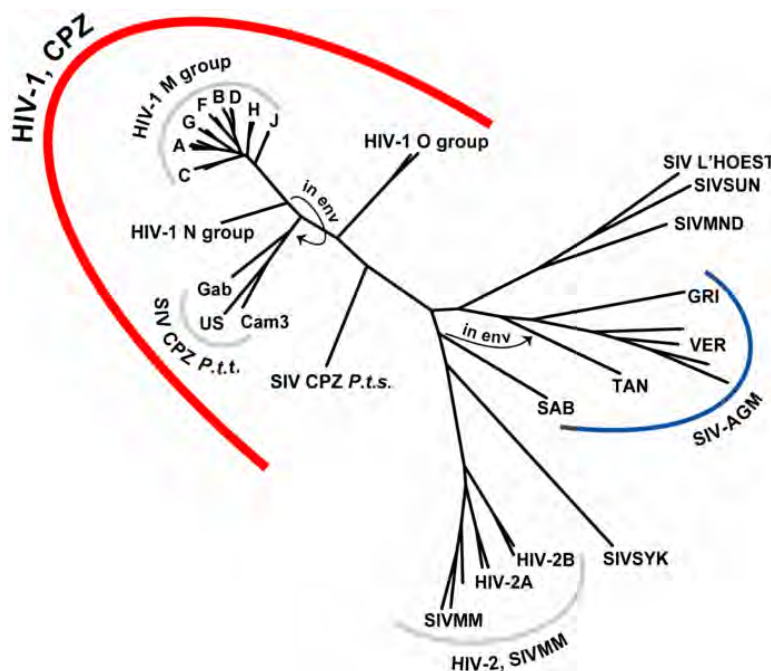
ADN	Acide désoxyribonucléique
APOBEC	<i>Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic polypeptide</i>
ARN	Acide ribonucléique
CHR	<i>C-terminal Heptad Repeat</i>
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CTL	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell Specific ICAM-3 Grabbing Non Integrin</i>
<i>env</i>	gène de l'enveloppe
ERK	<i>Extracellular signal Regulated protein Kinase</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
GALT	<i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i>
gp	glycoprotéine
GPCR	<i>G-Protein Coupled Receptor</i>
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule type 1</i>
IFN	Interféron
IL	Interleukine
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
kDa	kiloDalton
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-associated Antigen-1</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MCP2	<i>Monocyte Chemo-attractant Protein-2</i>
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor Kappa B</i>
NHR	<i>N-terminal Heptad Repeat</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NSI	<i>Non-Syncytium Inducing</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI3K	<i>Phospho-Inositide-3 Kinase</i>

PKB	<i>Protein Kinase B</i>
PYK2	<i>Proline-rich tyrosine Kinase 2</i>
RANTES	<i>Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted</i>
RVA	<i>Recombinant Virus Assay</i>
SDF-1	<i>Stromal cell Derived Factor 1</i>
SHIV	<i>Simian/Human Immunodeficiency Virus</i>
SI	<i>Syncytium Inducing</i>
SIDA	<i>Syndrome d'Immuno-Déficience Acquis</i>
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
TTT	<i>Toulouse Tropism Test</i>

## **INTRODUCTION**

## 1. Le HIV-1 : généralités

Le HIV (human immunodeficiency virus) appartient à la famille des *Retroviridae* et au genre *Lentivirus*. Il est l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Deux espèces ont été identifiées à ce jour, le HIV-1 responsable de la pandémie actuelle [Barre-Sinoussi et al., 1983], et le HIV-2 essentiellement limité à l'Afrique de l'Ouest [Clavel et al., 1986]. Les études phylogénétiques suggèrent que l'apparition du HIV-1 en pathologie humaine pourrait résulter d'évènements de transmission à l'homme à partir de chimpanzés infectés par un virus homologue simien (SIVcpz) en Afrique équatoriale (Cameroun) [Gao et al., 1999; Hirsch et al., 1989; Keele et al., 2006], tandis que l'apparition du HIV-2 résulterait d'évènements de transmission à partir de Mangabeys enfumés (SIVsm) en Afrique de l'Ouest (Côte d'Ivoire, Sierra Leone, Liberia) [Gao et al., 1992] (Figure 1). Des données récentes suggèrent l'existence d'une autre origine pour une souche de HIV de type 1 isolée au Cameroun et qui pourrait résulter de la transmission du virus simien SIVgor à l'homme [Plantier et al., 2009].



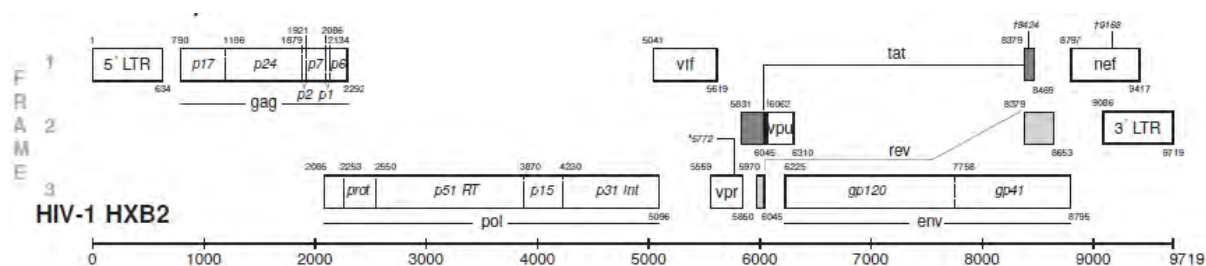
**Figure 1. Arbre phylogénétique du gène pol des lentivirus des primates (HIV et SIV)**

(Source : HIV Sequence Compendium 1999, Kuiken et al. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos Laboratory ;

<http://hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/1999/1/intro.pdf>)

## 1.1. Organisation génétique

Le génome du HIV-1 est constitué de 3 gènes principaux *gag*, *pol* et *env* codant respectivement pour les protéines de capsid, les enzymes nécessaires à la réplication virale et les glycoprotéines de l'enveloppe virale. Le génome viral possède aux deux extrémités des séquences répétées LTR (long terminal repeat) permettant l'intégration du provirus dans le génome de la cellule hôte, et contenant des régions promotrices nécessaires à l'expression des gènes viraux. Six autres petits gènes viraux, *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu* sont impliqués dans des phénomènes de régulation de l'expression des protéines du virus et de la cellule hôte (Figure 2).



**Figure 2. Organisation génétique du HIV-1.** (Source : HIV Sequence Compendium 2010, Kuiken *et al.* Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory ; <http://hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/2010/frontmatter.pdf>)

## 1.2. Structure du virion

Le HIV-1 est un virus enveloppé, comportant deux molécules d'ARN simple brin de polarité positive complexées aux protéines p7. Le complexe ribonucléoprotéique ainsi formé, ainsi que les enzymes virales, protéase, transcriptase inverse et intégrase, sont contenus dans une capsid constituée de l'assemblage de protéines p24. Une matrice constituée de protéines p17 entoure cette capsid. Enfin, l'enveloppe virale est une membrane phospholipidique issue de la cellule hôte dans laquelle sont insérées les glycoprotéines virales de surface gp120 et transmembranaire gp41.

### 1.3. Cycle de réplication

Le cycle répliatif du HIV-1 peut être décomposé en 5 étapes (Figure 3): l'entrée du virus dans la cellule cible ; la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN ; l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule cible ; la transcription de l'ADN proviral en ARN messager et la traduction des protéines virales ; et enfin l'assemblage, la maturation des protéines virales et le bourgeonnement des particules virales néo synthétisées qui seront libérées dans le milieu extracellulaire. Les mécanismes d'entrée du virus, et notamment les interactions gp120-CD4-corécepteur, seront détaillés dans un chapitre spécifique.

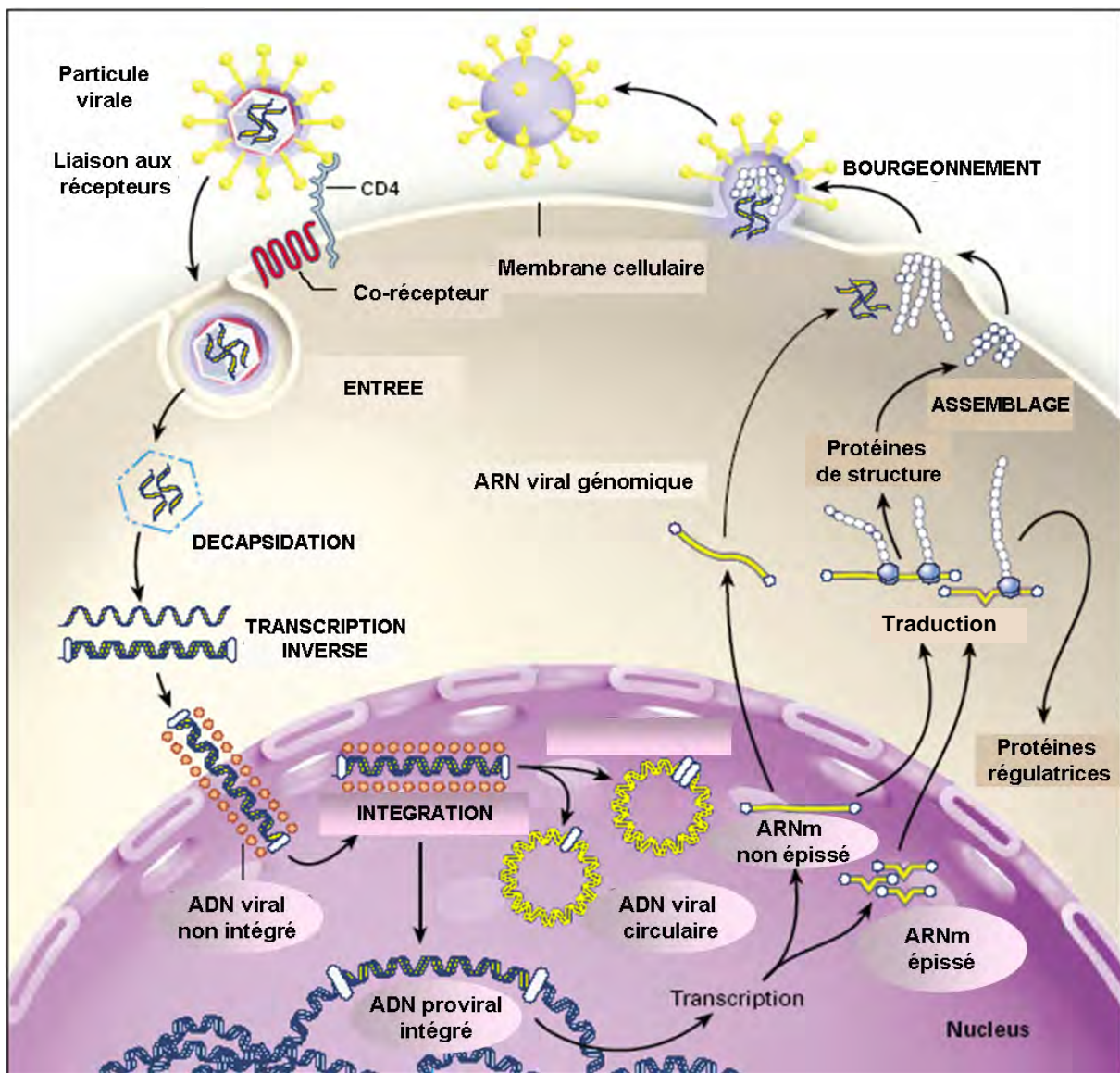
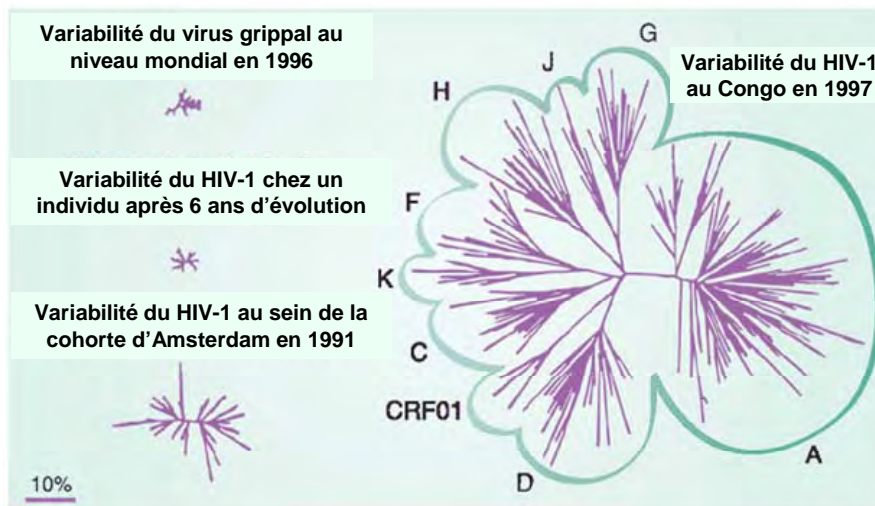


Figure 3. Cycle répliatif du HIV-1 (d'après Furtado *et al.* N Engl J Med 1999 ; 340 :1620)

#### 1.4. Variabilité génétique

La variabilité génétique du virus est due aux erreurs de la transcriptase inverse (taux moyen de 0,25 mutations ponctuelles par génome et par cycle de réplication) [Mansky and Temin, 1995] et aux recombinaisons génétiques survenant lorsqu'une cellule cible est infectée par plusieurs virus simultanément (taux moyen de 3 événements de recombinaison par génome et par cycle de réplication) [Jetzt et al., 2000; Jung et al., 2002]. En raison d'une production virale d'environ  $10^{10}$  virions par jour, des millions de variants sont donc produits chaque jour chez le sujet infecté.

Au sein d'un même individu infecté, on met en évidence une population virale, ou quasi-espèce, évoluant de façon dynamique tout au long de l'infection, témoignant de la variabilité très importante du HIV-1 (Figure 4). Les nouveaux variants ainsi générés sont ensuite sélectionnés en fonction de leur adaptation à l'environnement cellulaire, à la pression de sélection exercée par le système immunitaire, et éventuellement à celle exercée par les traitements antirétroviraux. Les pressions de sélection pouvant différer d'un compartiment à l'autre de l'organisme, l'évolution des populations virales chez un même patient peut se faire de façon indépendante entre deux compartiments [Hoetelmans, 1998].



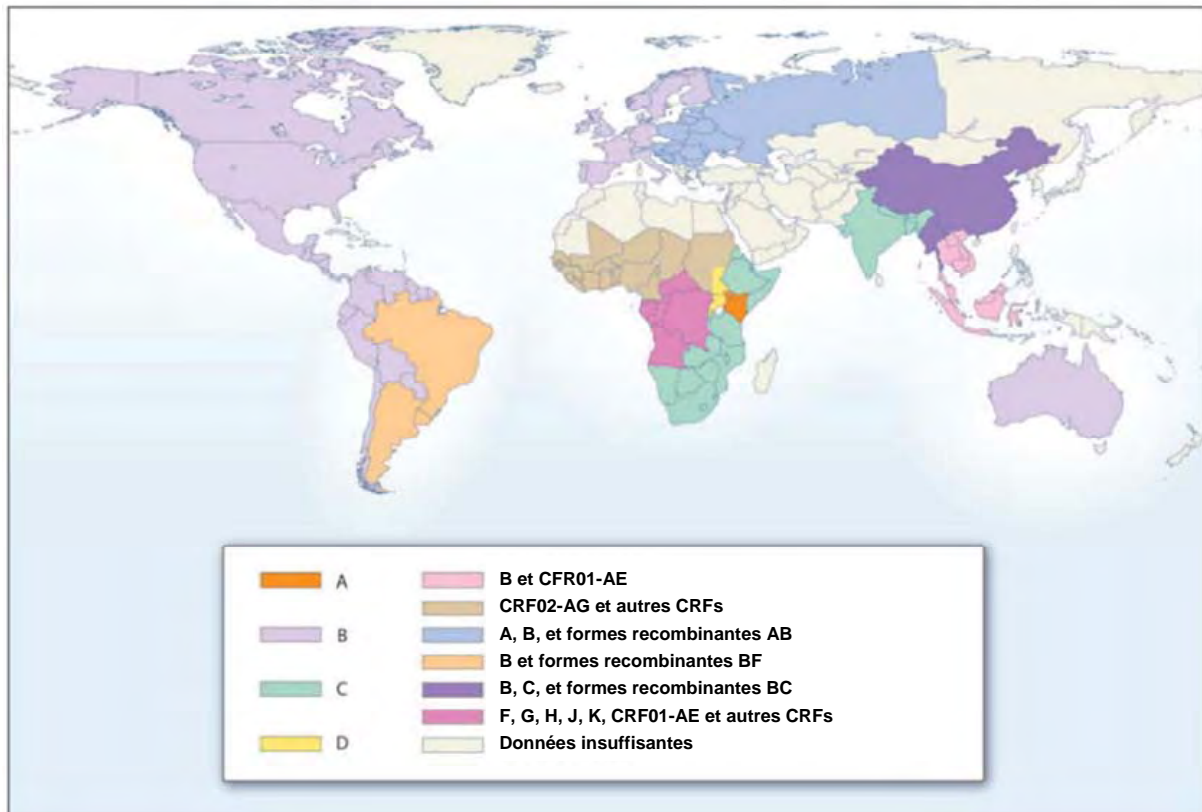
**Figure 4. Variabilité génétique du HIV-1 :** variabilité à l'échelle individuelle et collective par rapport au virus de la grippe (d'après Weiss *et al.* Nat Med 2003;9:887).

### 1.4.1. Classification moléculaire du HIV-1

Le HIV-1 se caractérise par sa très grande variabilité génétique, ayant conduit à une classification en quatre groupes M, N, O et P. Le groupe N et le groupe O, identifiés essentiellement en Afrique de l'Ouest, n'ont pas eu de diffusion épidémique large. A ce jour, un seul isolat a été identifié dans le groupe P, découvert récemment au Cameroun [Plantier et al., 2009]. Le groupe M (majoritaire) comporte actuellement 9 sous-types désignés par des lettres (A, B, C, D, F, G, H, J, K) et des sous-sous-types désignés par des chiffres (A1 à A4, F1 et F2). La variabilité génétique à l'intérieur d'un même sous-type peut être de 15 à 20%, tandis que la variabilité entre les sous-types est en général de 25 à 35%. L'analyse de génomes complets a permis de mettre en évidence des virus recombinants provenant de sous-types différents, dont certains sont retrouvés chez plusieurs patients et sont nommés CRFs pour « Circulating Recombinant Forms ». Plus de 40 CRFs ont été décrits à ce jour, certains présentant une diffusion épidémique, comme le CRF01-AE en Asie du Sud-Est.

L'analyse de la répartition géographique des sous-types appartenant au groupe M montre que le sous-type C est majoritaire dans le monde (50%), et en particulier dans le sud et l'est de l'Afrique, tandis que le sous-type B représente 10,2% des infections à HIV-1 dans le monde, mais est majoritaire dans les pays occidentaux (Figure 5). Les autres sous-types fréquents sont les sous-types A (12,3%) et G (6,3%) et les CRFs composés de sous-types A (CRF01-AE et CRF02-AG, respectivement responsables de moins de 5% des infections à HIV-1) [Taylor and Hammer, 2008].





**Figure 5. Distribution globale actuelle des sous-types et CRFs du HIV-1** (Source : Taylor et al. N Engl J Med 2008;358 :1590-602).

#### **1.4.2. Impact de la variabilité du HIV-1 sur la physiopathologie de l'infection**

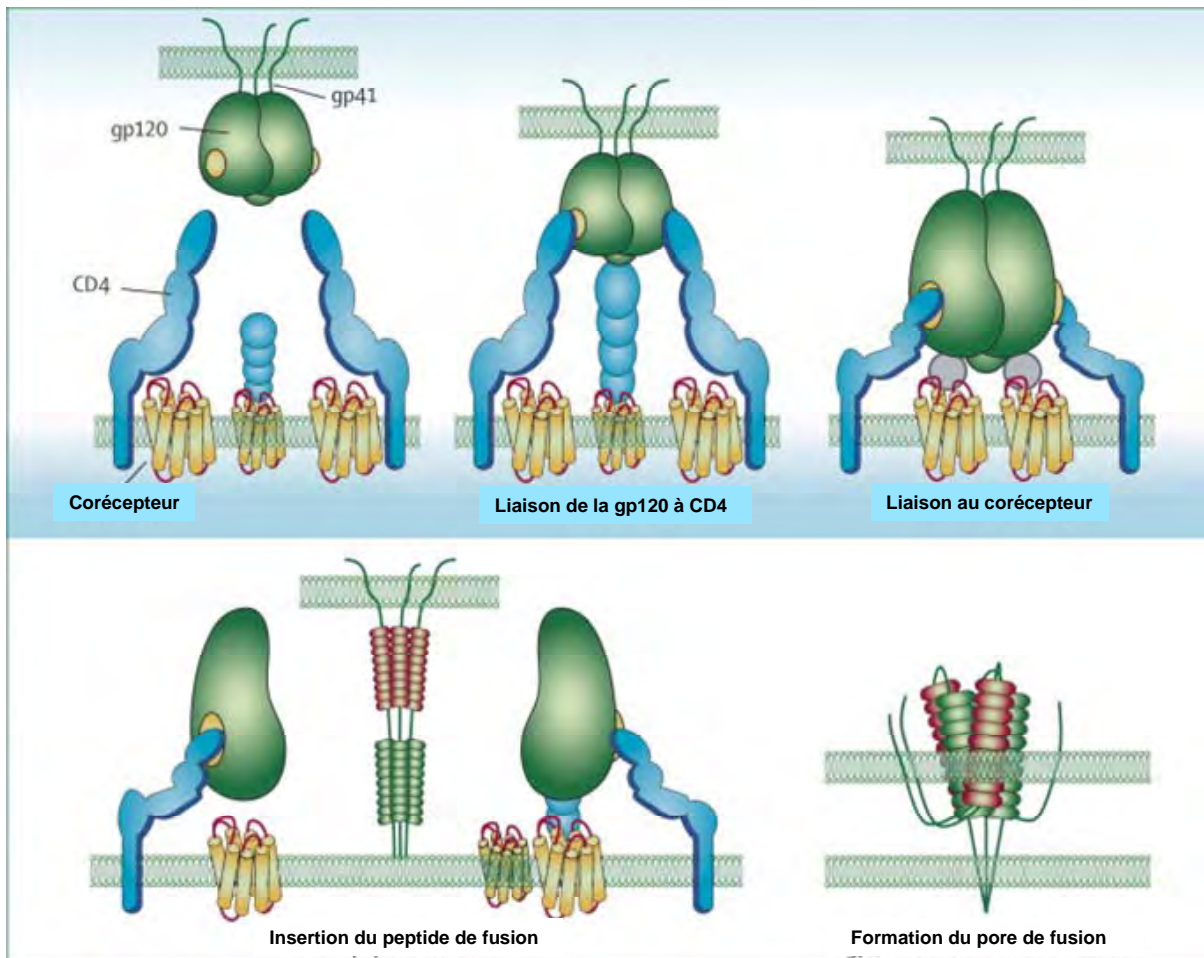
Les sous-types et les CRFs présentent des caractéristiques différentes qui peuvent influencer la transmission du HIV-1 et la progression de la maladie. La fréquence d'utilisation de CXCR4 comme corécepteur d'entrée varie selon les sous-types. La transmission préférentielle des virus R5 est bien documentée et sera détaillée dans le chapitre 4.2. Ainsi, un sous-type du HIV-1 présentant une fréquence élevée de virus X4 pourrait voir sa transmission restreinte dans la population exposée [Taylor and Hammer, 2008]. Les virus de sous-type C utiliseraient préférentiellement CCR5 [Cilliers et al., 2003] et pourraient donc avoir un avantage pour la transmission. Certains travaux suggèrent en effet que les virus de sous-type C seraient transmis avec plus de succès de la mère à l'enfant que les virus de sous-type B, ce qui pourrait expliquer en partie que ce sous-type soit prédominant dans le monde [Renjifo et al., 2004].

Les études sur la progression de la maladie n'ont pas mis en évidence de différences liées au sous-type du HIV-1 [Alaeus et al., 1999; Laurent et al., 2002] sauf pour les virus de sous-type D qui sont associés à une évolution plus rapide de la maladie [Baeten et al., 2007; Kaleebu et al., 2002]. Or, les virus de sous-type D utiliseraient plus fréquemment CXCR4 pour l'entrée [Huang et al., 2007] et les virus X4 sont associés à une progression plus rapide de la maladie.

## **2. L'entrée du HIV-1**

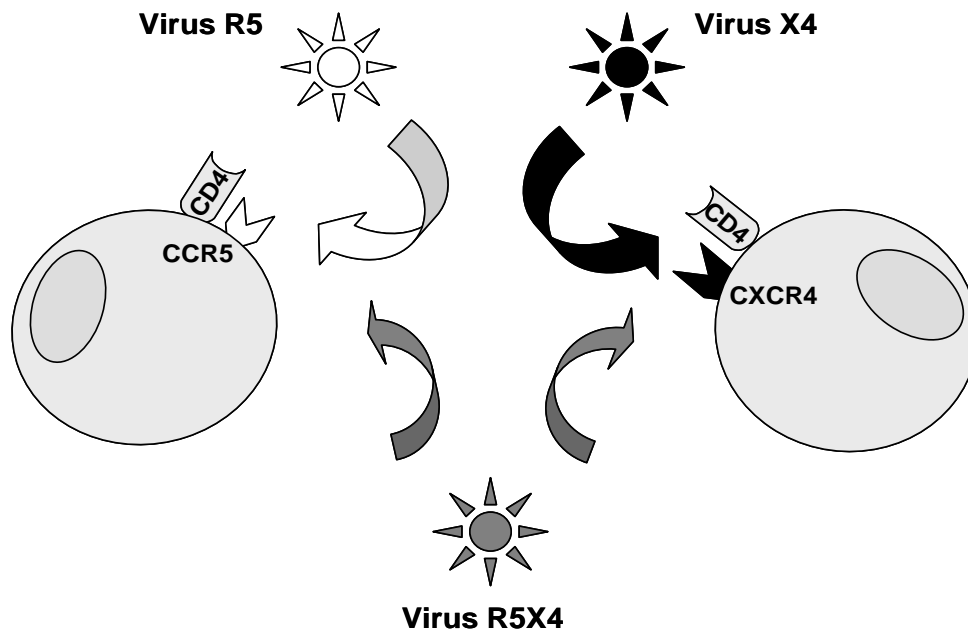
L'entrée du virus dans une cellule cible peut se décomposer en cinq étapes successives (Figure 6) :

- interaction initiale entre la gp120 et le récepteur cellulaire principal, la molécule CD4
- changement de conformation de la gp120 démasquant le site de liaison pour un corécepteur, principalement les récepteurs de chimiokines CCR5 ou CXCR4
- interaction de la gp120 avec le corécepteur
- insertion du peptide de fusion de la gp41 dans la membrane plasmique de la cellule cible
- rapprochement des membranes virale et cellulaire et formation du pore de fusion permettant la libération de la capsid virale dans le cytoplasme de la cellule infectée.



**Figure 6. Schéma de l'entrée du HIV-1** (d'après Esté *et al.* Lancet 2007; 370 : 82)

On distingue deux types de virus selon leur capacité à utiliser l'un ou l'autre des corécepteurs d'entrée : les variants viraux dont l'entrée est restreinte par le corécepteur CCR5 sont dénommés virus R5, ceux qui dépendent de l'utilisation de CXCR4 sont dénommés virus X4 (Figure 7). Certains virus sont capables d'utiliser les deux corécepteurs et sont dénommés virus R5X4 [Berger *et al.*, 1998]. Leur identification nécessite une analyse clonale à partir de la population de virus qui infecte le patient, afin de distinguer un mélange de virus R5 et X4, qui est le cas le plus fréquent, de la présence de virus R5X4 utilisant les deux corécepteurs, chez 20% des patients environ [Delobel *et al.*, 2007]. La dénomination habituelle de ces virus est D/M (dual mixte) car en pratique courante l'analyse clonale n'est pas réalisée.



**Figure 7. Classification des virus selon l'utilisation des corécepteurs d'entrée.**

## **2.1. Enveloppe du HIV-1**

### **2.1.1. Gène de l'enveloppe**

Le gène de l'enveloppe (*env*) possède un cadre de lecture unique et code pour une glycoprotéine de 160 kDa. Ce précurseur est ensuite clivé par une protéase cellulaire lors de l'étape de maturation, permettant ainsi la génération des glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41. La séquence nucléotidique de la gp120 (figure 9a) se compose de 5 régions conservées (C1 à C5) intercalées avec 5 régions hypervariables (V1 à V5). Deux motifs spécifiques permettant le clivage par une protéase cellulaire sont présents entre la séquence de la gp120 et celle de la gp41. La séquence de la gp41 se compose de quatre régions fonctionnelles : le peptide de fusion en N-terminal ; l'ectodomaine codant pour l'hélice proximale (N-terminal heptad repeat, NHR), la région de la boucle di-cystéine, et l'hélice distale (C-terminal heptad repeat, CHR) ; le domaine transmembranaire codant pour des protéines hydrophobes ; et le domaine intracellulaire en C-terminal.

### **2.1.2 Glycoprotéines d'enveloppe du HIV-1**

### **2.1.2.1 . Synthèse et maturation**

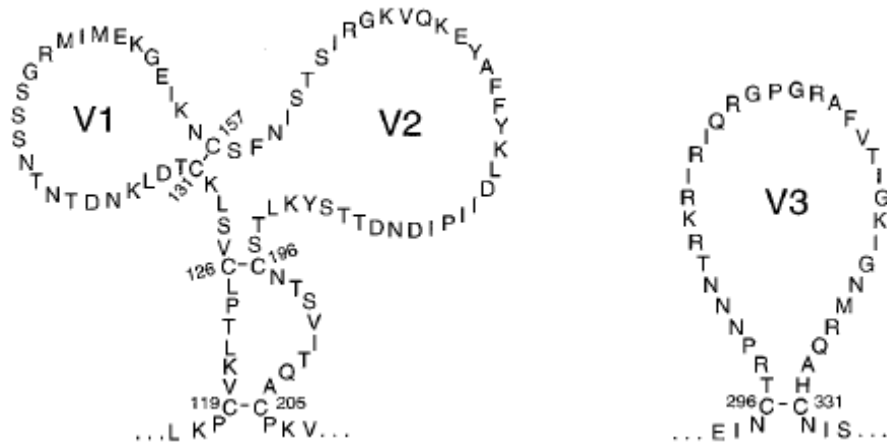
Les glycoprotéines de l'enveloppe du HIV-1 sont initialement produites sous la forme d'un précurseur protéique unique qui subit ensuite des modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Le peptide signal joue un rôle clé dans l'adressage de ce précurseur protéique vers le réticulum endoplasmique. La gp160 subit ensuite différentes étapes de maturation dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, notamment son repliement conformationnel avec formation de ponts disulfures, sa glycosylation et son clivage par une protéase cellulaire permettant la génération de la gp120 et de la gp41. Le complexe hétérodimérique formé de la gp120 et de la gp41, liées de façon non covalente, est adressé à la membrane cytoplasmique de la cellule hôte. Les complexes gp120-gp41 se retrouvent alors incorporés dans l'enveloppe des particules virales au cours du bourgeonnement à la surface de la cellule infectée [Pantophlet and Burton, 2006; Wyatt and Sodroski, 1998].

La gp160 comporte de nombreux sites de glycosylation (motifs NXS/T), dont la répartition varie au sein de la séquence de chaque virus. Le profil de glycosylation de l'enveloppe joue un rôle dans l'interaction entre le virus et les récepteurs cellulaires impliqués dans l'entrée du virus, ainsi que dans l'échappement aux anticorps neutralisants en masquant certains épitopes viraux [Wei et al., 2003].

A la surface des particules virales, les glycoprotéines d'enveloppe apparaissent organisées sous forme de trimères d'hétérodimères gp120-gp41 [Wyatt et al., 1998]. D'autres organisations non trimériques ont également été observées, mais leur fonctionnalité reste controversée.

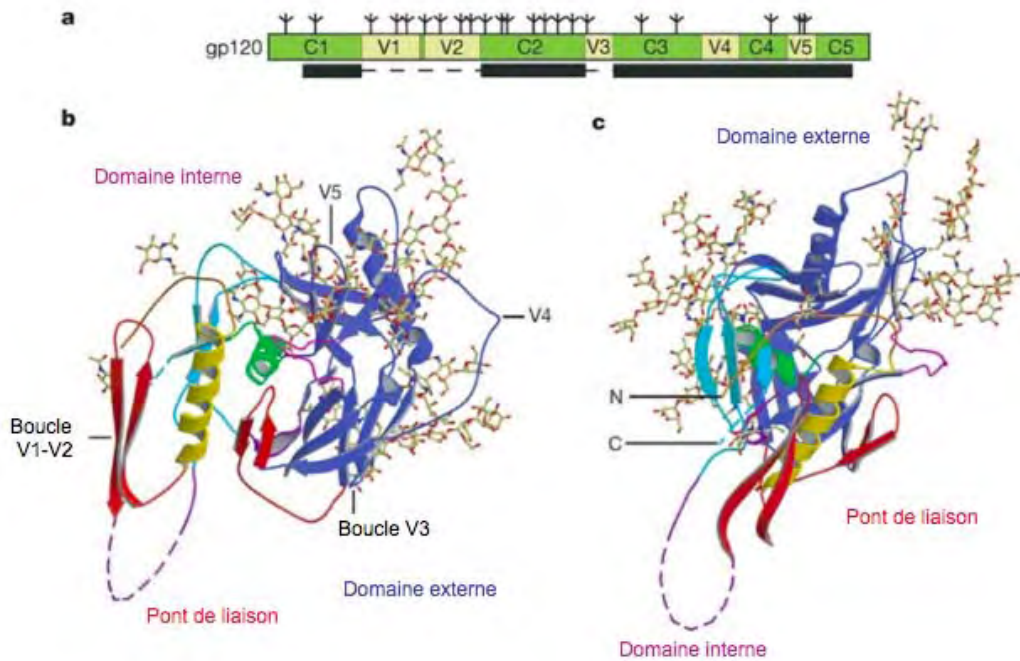
### **2.1.2.2 . Structure de la gp120**

La gp120 mature est une glycoprotéine d'environ 500 acides aminés, d'un poids moléculaire de 120 kDa dans sa forme glycosylée. La formation de ponts disulfures entre des résidus cystéine conservés permet la constitution de plusieurs boucles et stabilise la conformation spatiale de la gp120 (Figure 8). Les boucles variables V1-V2 et V3 ont en particulier un rôle critique dans les interactions virus/corécepteur, car elles sont localisées à la surface de la structure tridimensionnelle de la gp120.



**Figure 8. Boucles V1-V2 et V3 de la gp120** (séquence du virus HXB2) formées par l'établissement de ponts disulfures entre des résidus cystéines conservés (source : Wyatt et al. J Virol 1995 ;69(9) :5723)

La cristallographie a permis de déterminer la structure tertiaire de la gp120 contenant la boucle V3 [Huang et al., 2005]. La gp120 se compose d'un domaine interne et d'un domaine externe, liés entre eux par un pont de liaison (bridging sheet). Le domaine interne est principalement constitué des régions C1 et C5, présente peu de résidus glycosylés, et constitue le site de liaison à la gp41. Le domaine externe est lui largement glycosylé. Les régions variables de la gp120 sont localisées au niveau du domaine externe et forment des boucles à la surface de la protéine.

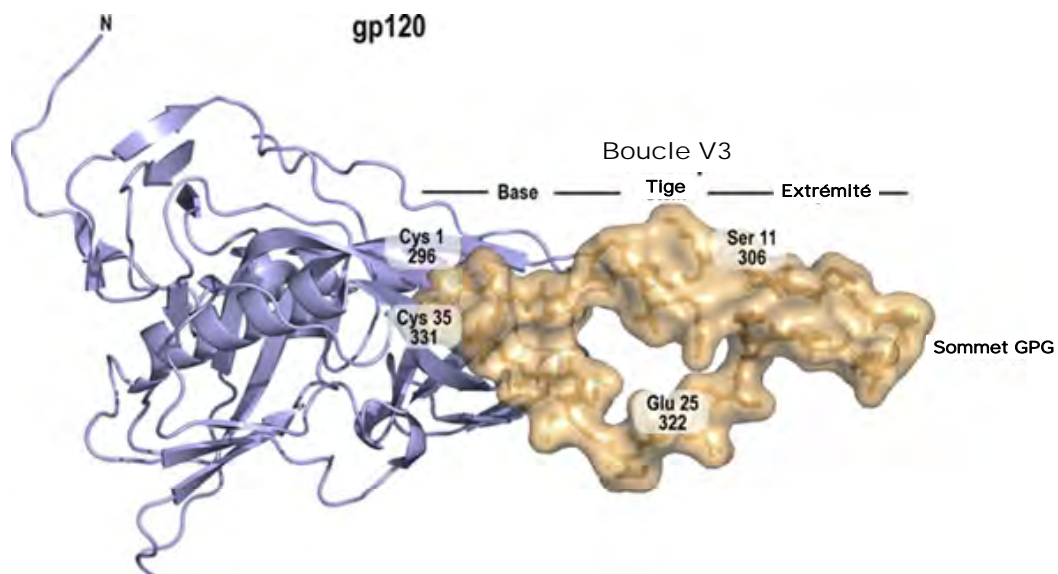


**Figure 9. Structure du gène de la gp120 du SIV et modélisation tridimensionnelle de la gp120 non liée** (D’après Chen et al. Nature 2005 ; 433 : 835).

(a) Schéma du gène de la gp120 du SIV. Les sites de glycosylation sont représentés par des branches. (b) Structure de la gp120 non liée, avec les chaînes peptidiques représentées en ruban et les sites de glycosylation par des branches. Le pont de liaison représenté en pointillés est la conformation liée au CD4. (c) La figure c est une rotation de la figure b de 90° sur un axe vertical.

La structure cristallographique de la gp120 du HIV-1 n’a pu être déterminée que sous forme de complexes CD4-gp120 ou CD4-gp120-anticorps [Kwong et al., 1998], alors que celle de la gp120 du SIV a pu être déterminée sous forme libre [Chen et al., 2005]. La comparaison des structures cristallographiques de la gp120 libre ou liée à la molécule CD4 révèle que la liaison de la gp120 à la molécule CD4 induit un changement de conformation du domaine interne, notamment au niveau du site de liaison à la gp41, ainsi qu’un changement de conformation du site de liaison au corécepteur [Myszka et al., 2000; Wyatt et al., 1995]. Le site de liaison de la gp120 à la molécule CD4 est situé au niveau de la dépression centrale entre les domaines interne et externe et le pont de liaison. Le site de liaison au corécepteur (récepteur de chimiokines) est localisé dans le domaine externe, principalement au niveau de la boucle V3, ainsi qu’au niveau du pont de liaison. Ce site n’est exposé qu’après le changement de conformation de la gp120 induit par la liaison au récepteur CD4.

La région hypervariable V3 joue un rôle critique dans les interactions virus-corécepteur. Des analyses structurales, notamment par résonance magnétique nucléaire, ont permis de préciser la structure tertiaire de V3 [Huang et al., 2005]. La région V3 forme une boucle créée par un pont disulfure entre deux cystéines conservées (positions 296 et 331 de la gp120 HXB2) (Figure 10). La boucle V3 comporte en moyenne 35 acides aminés et peut être décomposée en un segment N-terminal (acides aminés 1 à 10) comportant un site de glycosylation (acides aminés 6 à 8), un segment intermédiaire (acides aminés 11 à 25) qui constitue une épingle à cheveux entre deux feuillets bêta antiparallèles dont le sommet est constitué du motif GPG, et un segment C-terminal (acides aminés 26 à 35) en hélice alpha [Sirois et al., 2005]. L'étude de la structure tertiaire de cette boucle a permis de mettre en évidence la proximité spatiale entre les résidus 11 et 25 qui jouent un rôle important dans l'interaction avec les corécepteurs CCR5 et CXCR4.



**Figure 10. Modélisation de la structure tertiaire de la boucle V3 de la gp120** (d'après Sandler et al. PLoS Comput Biol 2007 ; 3(3): e58. doi:10.1371/journal.pcbi.0030058).

### 2.1.2.3 . Structure de la gp41

La gp41 est composée d'une partie intramembranaire et d'une partie extracellulaire ou ectodomaine dont la conformation trimérique se compose de six hélices alpha en épingles à



cheveux (3 hélices proximales, NHR, et 3 hélices distales, CHR) [Caffrey, 2001]. L'ectodomaine est impliqué dans le mécanisme de fusion lors de l'étape d'entrée.

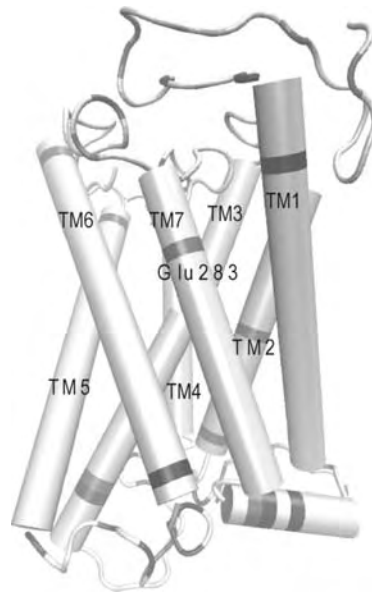
## **2.2. Récepteurs et corécepteurs cellulaires du HIV-1**

### **2.2.1. Récepteur CD4**

La molécule CD4 est le récepteur cellulaire principal du HIV [Dalglish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984]. CD4 est une molécule de surface, membre de la superfamille des immunoglobulines, qui contient quatre domaines extracellulaires (D1 à D4), un domaine transmembranaire, et une queue cytoplasmique, qui interagit avec la protéine tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> [Wang et al., 2001; Wu et al., 1997]. Le site de liaison du HIV-1 est situé sur le domaine extracellulaire D1. La molécule CD4 est le ligand de la sous-unité  $\beta 2$  du CMH II. Son expression sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> joue un rôle essentiel dans la formation du complexe CMH-peptide-TCR entre la cellule présentatrice d'antigène et le lymphocyte T CD4<sup>+</sup>. La molécule CD4 est également exprimée à la surface d'autres cellules du système immunitaire, notamment les monocytes, les macrophages tissulaires, et les cellules dendritiques.

### **2.2.2. Récepteurs des chimiokines**

Le processus d'entrée du HIV dans la cellule cible requiert, en plus de la molécule CD4, l'interaction avec un corécepteur. Différents récepteurs des chimiokines couplés aux protéines G (GPCRs) ont été identifiés comme les corécepteurs nécessaires à l'entrée du HIV ou du SIV dans la cellule cible. Les GPCRs à sept domaines transmembranaires ont une extrémité N-terminale extracellulaire, et 3 boucles extracellulaires (E1, E2, et E3) formées entre les passages transmembranaires successifs (Figure 11). Les domaines de liaison à la gp120 sont principalement situés au niveau des régions N-terminale et E2. Une quinzaine de récepteurs des chimiokines différents peuvent servir de corécepteur pour l'entrée de certaines souches de HIV-1, HIV-2 ou SIV *in vitro* [Berger et al., 1999; Edinger et al., 1998]. Cependant, l'utilisation *in vivo* de corécepteurs autres que CCR5 et CXCR4 pour l'entrée du HIV-1 n'est pas démontrée.



**Figure 11. Modèle structural du récepteur CCR5**

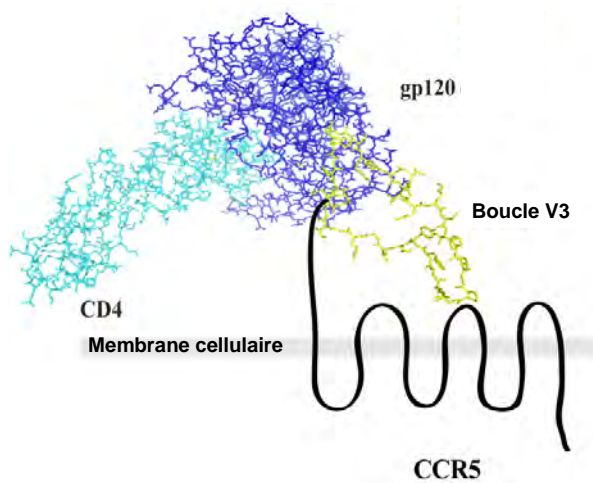
([http://www.dsimb.inserm.fr/~debrevn/IDDT-2009\\_in\\_silico\\_issue/iddt\\_2009\\_in\\_silico\\_issue.php](http://www.dsimb.inserm.fr/~debrevn/IDDT-2009_in_silico_issue/iddt_2009_in_silico_issue.php); d'après Fano et al. J. Chem. Inf. Model. 2006 ; 46 :1223). Les sept hélices transmembranaires sont indiquées par les sigles TM1 à TM7. La partie supérieure correspond à la face extracellulaire du récepteur.

### 2.2.2.1. Récepteur CCR5

Le récepteur CCR5 est un des deux corécepteurs principaux utilisés par le HIV-1 *in vivo* [Alkhatib et al., 1996; Deng et al., 1996; Dragic et al., 1996]. Les ligands naturels de CCR5 sont les molécules MIP-1 $\alpha$  (CCL3) et son variant LD78 $\beta$ , MIP-1 $\beta$  (CCL4), RANTES (CCL5), et MCP-2 (CCL8), impliquées dans le chimiotactisme des cellules du système immunitaire exprimant CCR5 vers les sites inflammatoires au sein des tissus. CCR5 est fortement exprimé sur la sous-population mémoire effectrice (CD45RO<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup>); mais à l'inverse relativement peu exprimé sur la sous-population mémoire centrale (CD45RO<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>) et très faiblement sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>) [Sallusto et al., 1999]. Par ailleurs, CCR5 est également exprimé sur les monocytes circulants et les macrophages tissulaires, ainsi que sur les cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes immatures et matures [Bleul et al., 1997; Lee et al., 1999; Mo et al., 1998].

La gp120 du HIV-1 interagit avec la partie N-terminale et la seconde boucle extra-cellulaire de CCR5, provoquant une modification de la conformation du corécepteur et la signalisation

intra-cellulaire (Figure 12). Les ligands naturels de CCR5 se fixent sur les régions chevauchantes, de façon différente pour chaque molécule et sont en compétition avec le virus.



**Figure 12. Modèle de l'interaction entre la gp120 trimérique fixée au récepteur CD4 soluble et le corécepteur CCR5** (d'après Huang *et al.* Science 2005 ;310 :1025 et Lobritz *et al.* Viruses 2010 ;2 :1069). Ce modèle est basé sur la structure cristallographique de la gp120 liée à un fragment de CD4 soluble. La gp120 (en bleu foncé) est liée au CD4 (en bleu clair), ce qui dévoile la boucle V3 (en jaune). Le sommet de V3 interagirait alors avec la seconde boucle extracellulaire de CCR5 (en noir), tandis que l'extrémité N-terminale de CCR5 serait en contact à la fois avec le pont de liaison de la gp120 et la base de V3.

Différents polymorphismes du gène CCR5 ont été décrits, notamment une délétion de 32 paires de bases (CCR5  $\Delta$ 32) induisant la synthèse d'une protéine tronquée qui ne peut pas être exprimée à la surface des cellules [Alkhatib, 2009]. La forme homozygote de cette mutation (CCR5  $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32, fréquence de 0,5 à 1% dans la population caucasienne) protège les sujets porteurs contre l'infection par les virus utilisant CCR5 comme corécepteur d'entrée sans présenter de phénotype pathologique [Balotta *et al.*, 1997; Biti *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1996; Theodorou *et al.*, 1997]. Des cas d'infection par des souches de tropisme R5X4 ou X4 ont tout de même été observés chez les homozygotes  $\Delta$ 32 [Gorry *et al.*, 2002; Naif *et al.*, 2002; Sheppard *et al.*, 2002]. La résistance à l'infection chez les sujets  $\Delta$ 32 a été récemment confirmée par l'observation du contrôle de l'infection HIV sans traitement antirétroviral après greffe de cellules souches d'un donneur homozygote  $\Delta$ 32 à un patient infecté par une souche virale de tropisme R5 [Hutter *et al.*, 2009]. Les allèles hétérozygotes  $\Delta$ 32 sont plus fréquents

dans les populations ne progressant pas à long terme que dans les cohortes de patients qui progressent dans la maladie, indiquant que le niveau de CCR5 et ses fonctions pourraient jouer un rôle plus complexe que celui du corécepteur dans la physiopathologie de l'infection. Par ailleurs, d'autres polymorphismes génétiques ont été décrits au niveau du couple chimiokine/CCR5. Un nombre de copies du gène CCL3L1, codant pour MIP-1 $\alpha$ , diminué par rapport à la population générale est notamment associé à une évolution péjorative plus rapide de l'infection par le HIV-1 [Gonzalez et al., 2005].

Les niveaux d'expression de CCR5 peuvent varier d'un individu à l'autre. En fonction de la quantité de corécepteurs exprimés à la surface, on distingue des fortes et des faibles expressions de CCR5 selon les individus [Reynes et al., 2000]. Cette différence de niveau d'expression repose à la fois sur des facteurs génétiques et sur des stimuli environnementaux, comme l'a rapporté une étude comparant des sujets Européens et Africains vivant en Afrique à des sujets appartenant aux mêmes groupes ethniques résidant en Europe [Clerici et al., 2000]. Les niveaux d'expression de CCR5 et d'activation immunitaire étaient plus élevés chez les sujets vivant en Afrique quelque soit leur groupe ethnique, probablement à cause d'infections parasitaires. Certains profils génétiques empêchant l'expression de CCR5 ont été décrits chez des sujets présentant une résistance naturelle à l'infection par le HIV-1 [de Vries et al., 1996; Quillent et al., 1998]. D'autre part, les chimiokines circulantes peuvent entrer en compétition avec le HIV-1 pour la liaison de CCR5 [Hogan and Hammer, 2001]. L'expression augmentée des chimiokines pourrait ainsi jouer un rôle dans la résistance naturelle à l'infection [Lehner, 2002], en masquant le site de fixation du virus, ou en induisant l'internalisation du récepteur [Alkhatib, 2009].

Des études ont montré que les patients homozygotes  $\Delta 32$  étaient plus susceptibles de faire des formes symptomatiques d'infection à flavivirus (virus West Nile, encéphalite de la tique) que les hétérozygotes [Telenti, 2009]. CCR5 joue aussi un rôle dans la réponse antibactérienne et est impliqué dans la réponse inflammatoire, comme l'atteste le rôle protecteur du déficit en CCR5 dans la polyarthrite rhumatoïde [Pralhad, 2006; Zhou et al., 1998]. Enfin, CCR5 est impliqué dans le rejet de greffe qui pourrait être prévenu par l'association d'inhibiteurs de CCR5 aux immunosuppresseurs déjà utilisés [Schroder et al., 2007].

#### **2.2.2.2. Récepteur CXCR4**

Le récepteur CXCR4 peut également être utilisé comme corécepteur par certaines souches de HIV-1 pour l'entrée dans les cellules cibles [Feng et al., 1996]. Ce récepteur a pour ligand naturel la molécule SDF-1 (CXCL12). Le couple SDF-1/CXCR4 joue un rôle dans le chimiotactisme des lymphocytes T matures, mais également au cours de la lymphopoïèse B et T au niveau de la moelle osseuse, ainsi qu'au cours de la thymopoïèse. Le couple SDF-1/CXCR4 est également un déterminant majeur de la migration des cellules métastatiques dans de nombreux cancers [Murdoch, 2000]. Il est exprimé de façon constitutive sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, en particulier sur la sous-population T CD4<sup>+</sup> naïve (CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>), qui n'exprime à l'inverse que faiblement CCR5 [Sallusto et al., 1999]. Par ailleurs, la molécule CXCR4 est également exprimée sur les sous-populations T CD4<sup>+</sup> mémoires centrales (CD45RO<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>) et mémoires effectrices (CD45RO<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup>) à une intensité plus faible. CXCR4 est également exprimée sur les monocytes, les macrophages, les granulocytes et les cellules dendritiques, mais de façon moins intense que CCR5 [Bleul et al., 1997; Lee et al., 1999; Mo et al., 1998].

A l'inverse de CCR5, peu de polymorphismes ont été décrits pour le gène CXCR4, mais par contre différentes isoformes du récepteur CXCR4 sont exprimées à la surface des cellules, probablement liées à des modifications post-traductionnelles [Sloane et al., 2005]. Cette hétérogénéité structurale de CXCR4 pourrait avoir des conséquences fonctionnelles sur la réponse au ligand SDF-1, ainsi que pour les interactions gp120/CXCR4.

### **2.2.2.3. Régulation de l'expression des corécepteurs**

L'expression des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) à la surface cellulaire est régulée en fonction de leur niveau de synthèse, mais aussi de leur taux d'internalisation et de recyclage. Le profil cytokinique présent dans le micro-environnement cellulaire peut influencer sur le niveau d'expression des récepteurs des chimiokines. L'expression de CCR5 peut notamment être induite par certaines cytokines pro-inflammatoires de type Th 1 [Oppermann, 2004]. La liaison au corécepteur des ligands naturels de CCR5 et de CXCR4 provoque une internalisation des corécepteurs et peut inhiber par compétition l'infection des cellules cibles par les virus utilisant CCR5 ou CXCR4 respectivement [Berger et al., 1999].

Plusieurs mécanismes de désensibilisation des GPCRs ont été décrits. La phosphorylation du récepteur par les protéines kinases couplées aux récepteurs G (GRK) entraîne une désensibilisation du récepteur du fait de la liaison de  $\beta$ -arrestines à la partie C-terminale phosphorylée du récepteur. Les  $\beta$ -arrestines peuvent interagir avec les constituants

des puits de clathrine, pour conduire à l'internalisation du récepteur, avec formation de vésicules et déphosphorylation du récepteur dans les endosomes. Les récepteurs peuvent ensuite être dégradés ou recyclés [Pierce et al., 2002].

### **2.3. Mécanismes d'entrée du HIV-1**

#### **2.3.1. Adsorption virale**

La première étape de l'entrée du HIV-1 consiste en une adsorption des particules virales à la surface cellulaire, notamment via des protéoglycans (héparans sulfates) [Bobardt et al., 2003; Mondor et al., 1998], des mannose récepteurs sur les macrophages [Larkin et al., 1989], ainsi que des molécules comme DC-SIGN (lectine de type C) sur les cellules dendritiques qui peuvent interagir avec les sucres de la gp120 virale [Curtis et al., 1992; Geijtenbeek et al., 2000]. L'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  a également été identifiée comme un site de liaison de la gp120, en particulier sur les lymphocytes T CD4 mémoires [Arthos et al., 2008]. Par ailleurs, l'attachement du HIV-1 peut également s'effectuer par des interactions virus-cellule indépendantes de la gp120. En effet, les particules virales peuvent intégrer dans leur enveloppe des molécules de la membrane phospholipidique de la cellule hôte au cours de la phase de bourgeonnement. Différentes molécules d'adhésion issues de la cellule hôte et intégrées dans la membrane virale pourraient ainsi jouer un rôle dans l'adhésion des particules virales sur la cellule cible, notamment ICAM-1 et son ligand LFA-1 [Tardif and Tremblay, 2005].

#### **2.3.2. Interaction de la gp120 avec la molécule CD4**

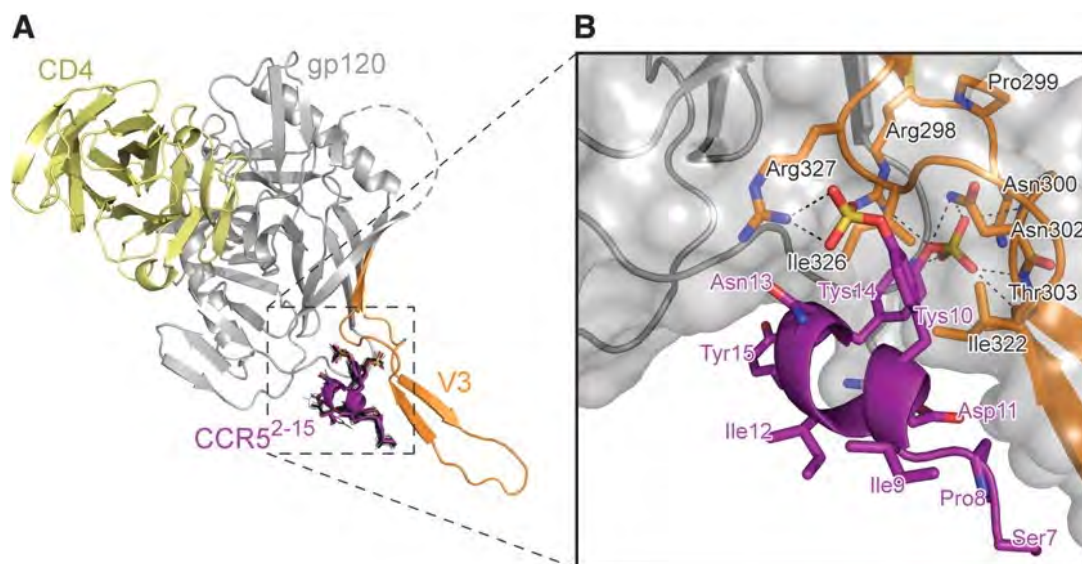
Les sites impliqués dans la liaison entre gp120 et CD4 ont été caractérisés sur chacune des deux molécules. Sur la molécule CD4, la liaison a lieu au niveau du domaine extracellulaire D1. Sur la gp120, les sites de liaison se situent au niveau de la dépression formée entre les domaines interne et externe et le pont de liaison. L'interaction gp120/CD4 induit un changement conformationnel de la gp120 qui permet à V3 de s'orienter vers le site de liaison du corécepteur [Myszka et al., 2000; Wyatt et al., 1995]. Les sites de la gp120 impliqués dans la liaison au corécepteur ne sont donc démasqués qu'après la liaison de la gp120 à la molécule CD4. Le virus est donc protégé d'une réponse anticorps dirigée contre les

épitopes critiques du site d'interaction avec le corécepteur, puisque ceux-ci sont masqués dans la conformation non liée à CD4 de la gp120.

Indépendamment du CD4, le galactosyl céramide (GalC) peut servir de site de liaison principal du HIV-1 au niveau des cellules épithéliales du colon et du vagin et des cellules gliales et neuronales du cerveau [Alfsen and Bomsel, 2002; Furuta et al., 1994; Harouse et al., 1991; Yahi et al., 1992].

### 2.3.3. Interaction de la gp120 avec le corécepteur

Les sites de liaison de la gp120 au corécepteur, exposés après liaison au CD4 et changement conformationnel, sont localisés principalement au niveau de la boucle V3, mais aussi au niveau des boucles V1-V2 et du pont de liaison qui correspond à des résidus conservés des régions C1, C2, C3 et C4 (Figure 13). Une première interaction V3-corécepteur pourrait déterminer la sélectivité pour CCR5 et/ou CXCR4, puis une seconde interaction entre la région plus conservée du pont de liaison de la gp120 et le corécepteur pourrait jouer un rôle dans l'initiation du processus de fusion des membranes [Hwang et al., 1991; Trkola et al., 1996; Wyatt et al., 1995].



**Figure 13. Interaction de l'extrémité N-terminale de CCR5 avec la gp120 du HIV-1 liée à CD4** (Huang *et al.*, Science 2007 ;317 :1930-34). (A) Liaison moléculaire entre la gp120, la molécule CD4 et l'extrémité N-terminale de CCR5. (B) Détail des interactions entre les acides aminés de CCR5 en violet et ceux de la région V3 en orange.

### **2.3.4. Fusion des membranes**

Le changement conformationnel induit par les interactions gp120-CD4 puis gp120-corécepteur modifie l'interaction gp120-gp41 et permet l'exposition du peptide de fusion de la gp41 et son insertion dans la membrane cytoplasmique de la cellule cible. Le repliement des hélices C-terminales (CHR) sur le trimère d'hélices N-terminales (NHR) conduit à la formation d'une structure à 6 hélices en épingles à cheveux. Le repliement de la gp41 conduit à un rapprochement puis à la fusion des membranes du virus et de la cellule cible [Caffrey, 2001]. L'engagement de plusieurs complexes gp120-gp41/récepteurs est nécessaire à la constitution d'un pore de fusion par lequel la capsid virale sera injectée dans le cytoplasme de la cellule cible.

### **2.3.5. Influence de la composition lipidique membranaire de la cellule cible**

L'entrée du HIV-1 nécessite l'interaction successive de l'enveloppe virale avec le récepteur CD4 et un corécepteur (CCR5 ou CXCR4). L'interaction gp120/CD4 pourrait induire une réorganisation moléculaire au sein de la membrane cytoplasmique permettant notamment le regroupement d'une quantité suffisante de molécules CD4 et de corécepteurs pour permettre l'entrée du virus [Popik et al., 2002]. Les microdomaines lipidiques membranaires (rafts) sont enrichis en molécules CD4, mais CCR5 et CXCR4 en semblent exclus. La localisation de la molécule CD4 dans les rafts ne semble cependant pas indispensable au processus d'entrée du virus [Percherancier et al., 2003; Popik and Alce, 2004]. Le contenu en cholestérol pourrait jouer un rôle important dans la mobilité de CCR5 et dans la fusion des membranes [Viard et al., 2002]. Les processus impliquant une relocalisation de CD4 et des corécepteurs au sein de la membrane cytoplasmique pourraient jouer un rôle critique pour l'entrée du HIV-1, notamment quand la densité en CD4 et corécepteurs est faible, et également dans la signalisation induite par les interactions gp120/CD4/corécepteur.

### **2.3.6. Synapse virologique**

La formation de synapses immunologiques entre les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigène entraîne au point de contact entre les cellules une concentration de



récepteurs à l'antigène des lymphocytes T (TCR), de molécules d'adhérence, ainsi qu'une réorganisation et une polarisation du cytosquelette et des molécules de signalisation cellulaire. Ces synapses immunologiques pourraient ainsi favoriser une transmission efficace de particules virales de cellule à cellule dans cet espace intercellulaire réduit où sont concentrés les récepteurs et corécepteurs nécessaires à l'entrée du virus, constituant ainsi une « synapse virologique » [Jolly et al., 2004; McDonald et al., 2003].

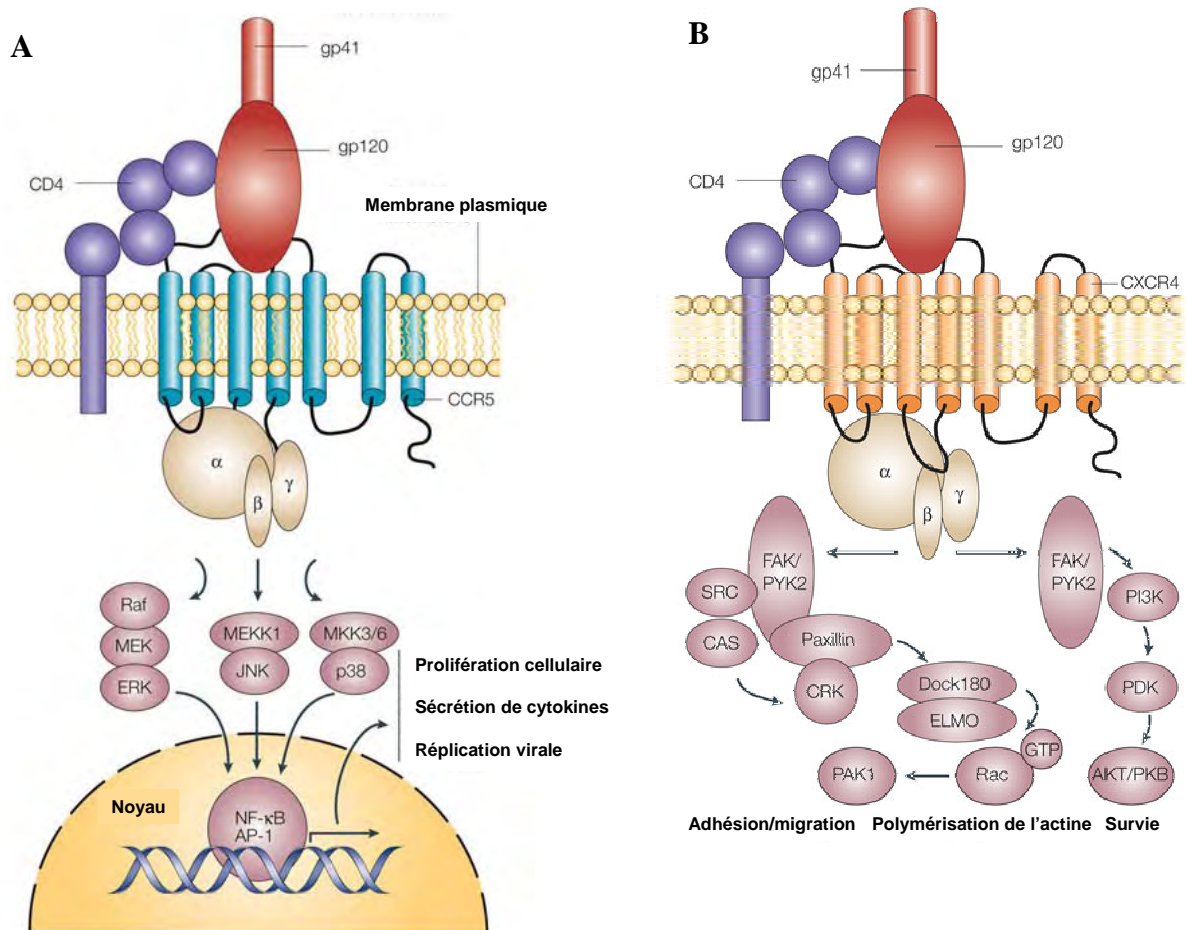
### **2.3.7. Autres mécanismes d'entrée du HIV-1**

D'autres mécanismes d'entrée du HIV-1 dans la cellule cible ont été décrits, ne faisant pas appel au schéma classique décrit ci-dessus. Des mécanismes d'endocytose et de macropinocytose des particules virales ont été rapportés mais ces voies semblaient conduire à la dégradation des virions dans les phagolysosomes [Fackler and Peterlin, 2000; Grewe et al., 1990; Marechal et al., 2001; Pauza and Price, 1988]. Des travaux plus récents ont montré l'existence d'un mécanisme d'endocytose alternatif pour l'entrée du HIV-1, avec la fusion complète du HIV-1 dans le compartiment endosomal sous la dépendance de facteurs cellulaires (dynamine) [Miyachi et al., 2009].

### **2.4. Signalisation induite par les interactions gp120-CD4-corécepteurs**

La liaison gp120-CD4-corécepteurs peut entraîner une signalisation cellulaire par le récepteur de chimiokines impliqué, notamment par les protéines G associées aux récepteurs à 7 domaines transmembranaires (GPCRs). Du fait de sa nature oligomérique, la gp120 induit un regroupement (cross-linking) des molécules CD4 et des corécepteurs à la surface de la cellule cible. La liaison gp120-corécepteur induit une augmentation du flux calcique dans la cellule stimulée [Weissman et al., 1997]. Il a récemment été montré qu'un nombre très réduit de virions était suffisant pour induire un flux calcique dans la cellule cible après stimulation des corécepteurs par la gp120 exprimée à la surface des virions [Melar et al., 2007]. La voie des MAPKinases peut être activée par la liaison de la gp120 à CCR5 mais également via CXCR4 (Figure 14) [Balabanian et al., 2004; Cicala et al., 2006; Popik and Pitha, 1998]. La voie ERK peut conduire à une augmentation de la prolifération cellulaire. L'activation des kinases p38 et JNK pourrait également augmenter la transcription du HIV-1 via des facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B [Shapiro et al., 1998]. Enfin, ces voies de signalisation pourraient également induire la sécrétion de cytokines participant au recrutement et à

l'activation de cellules cibles du HIV-1. Ces voies de signalisation activatrices pourraient donc faciliter la réplication du HIV-1 en augmentant la susceptibilité à l'infection des cellules cibles ainsi que la production virale des cellules infectées. Par ailleurs, la liaison gp120-corécepteurs peut activer des voies de signalisation via les kinases PYK2 et FAK et réguler ainsi la migration cellulaire et les réarrangements du cytosquelette (Figure 14) [Cicala et al., 2000; Cicala et al., 1999]. La gp120 X4 peut mimer les effets de la chimiokine SDF-1 sur le récepteur CXCR4 et induire notamment des réarrangements du cytosquelette (polymérisation de l'actine) et un chimiotactisme des cellules exprimant CXCR4 vers les particules virales [Balabanian et al., 2004]. Enfin, l'interaction gp120-corécepteur peut activer des voies de signalisation impliquées dans la balance survie/apoptose [Cicala et al., 2006]. La voie anti-apoptotique PI3K Akt/PKB peut être activée par la liaison gp120-corécepteur. Cependant, la liaison gp120/CD4/corécepteur, en particulier avec CXCR4, peut également activer des voies pro-apoptotiques mitochondriales [Ferri et al., 2000; Perfettini et al., 2005; Perfettini et al., 2004].



**Figure 14. Signalisation par les MAPKinases (A) et FAK/PYK2 (B) induite par la liaison de la gp120 sur CCR5 ou CXCR4** (d'après Sodhi et al. Nat Rev Mol Cell Biol 2004 ;5 :998)

(A) La liaison de la gp120 sur CCR5 peut activer les voies de signalisation Raf/MEK/ERK, p38, ou JNK, susceptibles d'induire des facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B et ainsi de favoriser la prolifération cellulaire, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et la réplication virale. (B) La liaison de la gp120 sur CXCR4 peut activer les voies de signalisation FAK/PYK2 et SRC (partie gauche de la figure B). Les molécules adaptatrices CAS, Paxilin, et CRK favorisent alors le recrutement et l'activation du complexe ELMO-Dock180. Rac lié au GTP stimule la polymérisation de l'actine et l'adhésion cellulaire par le biais de PAK-1. L'activation de FAK/PYK2 peut également signaler via PI3K, PDK et AKT/PKB (partie droite de la figure B) et ainsi favoriser la survie cellulaire.

### **3. Le tropisme et sa caractérisation in vitro**

#### **3.1. Déterminants du tropisme cellulaire du HIV-1**

Le tropisme cellulaire du HIV-1 est déterminé par l'entrée et la réplication préférentielle du virus dans certains types cellulaires.

##### **3.1.1. Déterminants du tropisme viral liés aux étapes d'entrée**

Le tropisme préférentiel d'un virus donné pour les corécepteurs CCR5 et/ou CXCR4 conditionne les cibles cellulaires qui seront infectées. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> représentent la population cellulaire cible principale du HIV-1. Cependant, parmi les sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, l'expression des corécepteurs détermine une susceptibilité préférentielle pour les virus R5 ou les virus X4 [Bleul et al., 1997; Lee et al., 1999]. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>) ont ainsi une susceptibilité accrue aux virus X4 du fait de l'expression préférentielle de CXCR4 sur cette population qui n'exprime à l'inverse que très faiblement CCR5, alors que les cellules mémoires centrales (CD45RO<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>) et surtout les cellules mémoires effectrices (CD45RO<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup>) expriment plus intensément CCR5, mais également des niveaux significatifs de CXCR4 [Sallusto et al., 1999]. La dichotomie classique entre cellules naïves susceptibles à l'infection par les virus X4

et cellules mémoires susceptibles à l'infection par les virus R5 est donc schématique. Plus exactement, les virus X4 ont un tropisme élargi aux cellules naïves par rapport aux virus R5, mais les cellules mémoires sont susceptibles à l'infection par les virus R5 et X4.

Les monocytes peuvent être séparés en une sous-population majoritaire  $CD14^{high} CD16^{-}$  et une sous population minoritaire  $CD14^{low} CD16^{+}$ . Cette population  $CD14^{low} CD16^{+}$  semble exprimer plus intensément CCR5, et sa fréquence semble augmentée au cours des phénomènes inflammatoires, en particulier au cours de l'infection par le HIV-1 [Ellery and Crowe, 2005; Weber et al., 2000]. Cette sous-population  $CD14^{low} CD16^{+}$  pourrait donc être plus fréquemment infectée par le HIV-1 *in vivo* que la sous-population  $CD14^{high} CD16^{-}$  [Ellery et al., 2007]. Les monocytes expriment également CXCR4 et sont donc théoriquement susceptibles à l'infection par les virus X4. Notre équipe a montré récemment que la fréquence d'infection des monocytes  $CD14^{high} CD16^{-}$  par des virus X4 était élevée chez les patients reconstituant mal leur immunité sous traitement antirétroviral efficace [Mavigner et al., 2009].

Les macrophages tissulaires sont une population cellulaire cible bien caractérisée du HIV-1, notamment des virus R5, mais ils peuvent également être infectés par des virus X4 [Hoshino et al., 2004; Jayakumar et al., 2005].

Les cellules dendritiques, myéloïdes et plasmacytoïdes, ainsi que les cellules de Langerhans sont également des populations cibles du HIV-1. Ces cellules expriment fortement le corécepteur CCR5, mais également à un moindre niveau CXCR4 [Lee et al., 1999]. Ces cellules peuvent également capter les particules virales par certaines molécules de surface, notamment DC-SIGN qui interagit avec les sucres de la gp120, sans être infectées et médier ainsi en *trans* l'infection des lymphocytes T  $CD4^{+}$  [Curtis et al., 1992; Geijtenbeek et al., 2000].

Une population de lymphocytes NK  $CD3^{-} CD56^{+}$  exprimant CD4 et les corécepteurs CCR5 et CXCR4 peut être infectée *in vitro* par le HIV-1, ce qui provoque une altération des fonctions des cellules infectées [Bernstein et al., 2009] qui pourraient aussi constituer un réservoir du virus [Valentin et al., 2002].

Enfin, l'infection par le HIV-1 des cellules souches hématopoïétiques  $CD34^{+}$ , dont une faible proportion exprime les deux corécepteurs, a été longtemps contestée, mais des travaux récents ont confirmé que les progéniteurs multipotents sont susceptibles à l'infection par le HIV-1 *in vitro* et *in vivo* et pourraient représenter un réservoir cellulaire latent du virus [Carter et al., 2010].

Au-delà du tropisme préférentiel pour CCR5 ou CXCR4, la capacité du virus à utiliser de faibles densités de CD4 ou de corécepteur sur certains types cellulaires constitue très probablement un élément déterminant dans la capacité infectieuse d'un virus donné.

### **3.1.2. Déterminants du tropisme viral liés aux étapes post-entrée**

Hormis les pré-requis liés aux étapes d'entrée, le tropisme cellulaire préférentiel du HIV-1 dépend également de la capacité de la cellule infectée à supporter une réplication efficace du HIV-1. L'état d'activation de la cellule infectée est un élément déterminant pour une production virale efficace. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents, en particulier les T CD4<sup>+</sup> naïfs, ont un faible niveau d'activation qui ne permet pas une réplication intense du virus. D'autres facteurs sont susceptibles d'influencer le niveau de réplication du virus dans un type cellulaire donné, notamment la présence de facteurs de restriction. Par exemple, APOBEC 3G/3F et APOBEC3A joueraient un rôle dans la susceptibilité réduite, au moins *in vitro*, des cellules monocytaires et des cellules dendritiques à l'infection par le HIV-1 [Peng et al., 2007; Pion et al., 2006].

## **3.2. Méthodes de caractérisation du tropisme viral**

### **3.2.1. Méthodes phénotypiques**

Avant l'identification des corécepteurs d'entrée CCR5 et CXCR4 en 1996, l'étude du tropisme viral reposait sur le tropisme préférentiel pour les cellules de lignées lymphocytaires T (T-tropic) ou pour les cellules macrophagiques (M-tropic). Une technique largement utilisée reposait également sur l'observation d'un effet cytopathogène induit par certains virus sur des cellules de lignée lymphocytaire T (cellules MT2). Les virus peuvent en effet être classés en virus ayant un phénotype inducteur de syncytia (Syncytium Inducing ou SI) ou non inducteur de syncytia (Non Syncytium Inducing ou NSI) sur la lignée MT2 [Koot et al., 1992]. La culture du virus *in vitro* peut cependant induire des biais de sélection.

**Tableau 1. Caractéristiques techniques de deux tests phénotypiques commercialisés**

PARAMETRES	TESTS PHENOTYPIQUES	
	TROFILE	TRT
Insert	gp160 amplifiée par RT-PCR	V1-V3 amplifiée par RT-PCR
Vecteur	Vecteur d'expression de l'enveloppe pCXAS + vecteur génomique du HIV-Luc	pNL43-ΔV
Construction	Enzymes de restriction	Recombinaison
Cellules produisant les virus recombinants	293T	293T
Cellules cibles	U87-CD4-CXCR4 ou -CCR5	U373-CD4-CXCR4 ou -CCR5 avec cassette Lac-Z-LTR
Gène rapporteur	Luciférase	β-Galactosidase
Test de détection	RLU	Test colorimétrique (DO)

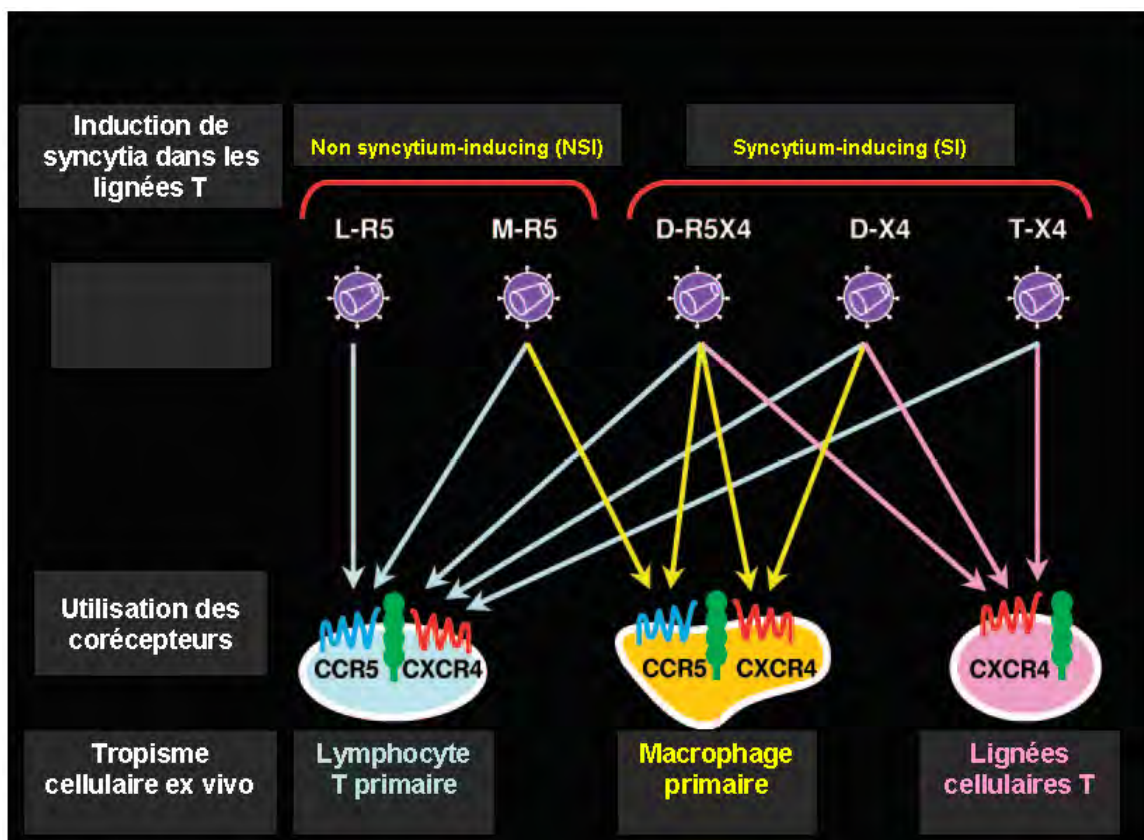
(d'après Skrabal, J Clin Microbiol, 2007 ; 45(2) : 280). Le test Trofile<sup>TM</sup> est commercialisé par Monogram Biosciences (San Francisco, USA). Le TRT (Tropism Recombinant Test) a été commercialisé sous le nom de Phenoscript<sup>TM</sup> (VIRalliance, Paris, France).

Les tests phénotypiques actuels utilisent des lignées cellulaires qui ont été transfectées pour exprimer le récepteur CD4 et un corécepteur, CCR5 ou CXCR4 [Trouplin et al., 2001; Whitcomb et al., 2007]. Les tests reposent sur la création de virus recombinants pour le gène *env* (Recombinant Virus Assay ou RVA), en totalité (gp160) ou uniquement pour certaines régions de l'enveloppe (gp120 et ectodomaine de la gp41 ; région V1-V3 de la gp120) [Trouplin et al., 2001; Whitcomb et al., 2007]. Le gène *env* testé, amplifié par PCR au préalable, peut être inséré par des enzymes de restriction ou par recombinaison homologue dans un vecteur d'expression délété de l'enveloppe. Après transfection, les virus recombinants produits dans le surnageant sont utilisés pour infecter des cellules indicatrices CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> (lignées U87 ou U373), avec une révélation de l'infection par luminométrie (gène *luc* cloné dans le vecteur HIV-1) ou colorimétrie (cassette βGAL insérée dans la lignée U373 sous la dépendance d'un promoteur LTR, activé par Tat en cas d'infection de la cellule indicatrice).

Il existe globalement une assez bonne concordance entre phénotypes SI et X4 et phénotypes NSI et R5. Par contre, il n'y a pas une concordance totale entre le tropisme lymphocytaire ou macrophagique et les phénotypes SI/NSI ou R5/X4. Les macrophages expriment à la fois CCR5 et CXCR4 et les virus à tropisme macrophagique ne se limitent donc pas aux virus R5. Il faut distinguer par ailleurs le tropisme pour les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> primaires, qui expriment CCR5 et CXCR4 et peuvent donc être infectés par les virus R5 et X4, et le tropisme pour les cellules de lignées lymphocytaires T, qui n'expriment que CXCR4 et ne sont donc susceptibles qu'à l'infection par des virus X4. Les virus R5 peuvent

ainsi être classés en virus ayant un tropisme limité aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> primaires, et en virus ayant un tropisme élargi aux macrophages. On peut également classer les virus X4 en virus capables d'infecter les macrophages et les lymphocytes T (primaires ou lignées), et en virus dont le tropisme est limité aux lymphocytes T (primaires ou lignées). Enfin, les virus R5X4 peuvent infecter les lymphocytes T (primaires ou lignées) et les macrophages (voir Figure 15). Le phénotype R5/X4 et le tropisme lymphocytaire/macrophagique donnent donc des informations complémentaires permettant une caractérisation approfondie du tropisme viral [Goodenow and Collman, 2006].

La capacité du virus à utiliser de faibles densités du récepteur CD4 à la surface de la cellule cible est vraisemblablement un élément déterminant du tropisme macrophagique [Bannert et al., 2000]. Il est probable que les virus diffèrent également dans leur capacité à utiliser de faibles densités de corécepteurs. Par ailleurs, il existe pour CXCR4 un certain degré de polymorphisme lié à des modifications post-traductionnelles qui pourraient contribuer au tropisme cellulaire préférentiel de certains virus [Sloane et al., 2005].



**Figure 15. Relation entre phénotypes SI/NSI, R5/X4 et tropisme lymphocytaire/macrophagique (d'après Goodenow *et al.* J Leukoc Biol 2006 ;80(5) :965).**

### 3.2.2. Méthodes génotypiques

Les motifs moléculaires de la gp120 impliqués dans les interactions avec les corécepteurs CCR5 et CXCR4 au cours du processus d'entrée du HIV-1 dans sa cellule cible ont été localisés essentiellement au niveau de la région V3 [Hwang et al., 1991], mais aussi au niveau des boucles V1-V2, du pont de liaison, et de la région HR1 du domaine transmembranaire de la gp41 [Huang et al., 2008]. Cependant, toutes les méthodes génotypiques actuellement utilisées sont basées uniquement sur la séquence de la région V3 et ne prennent pas en compte les autres régions de l'enveloppe.

Au niveau de la boucle V3, la présence d'acides aminés chargés positivement (arginine ou lysine) en position 11 et/ou 25 a été associée à l'utilisation préférentielle du corécepteur CXCR4 pour l'entrée du virus ; inversement, la présence d'acides aminés neutres ou chargés négativement (acide aspartique ou glutamique) à ces positions a été associée à l'utilisation de CCR5 [De Jong et al., 1992]. La charge électrostatique nette de V3 semble également influencer l'utilisation préférentielle de CCR5 (charge nette  $< +5$ ) ou de CXCR4 (charge nette  $\geq +5$ ), du fait notamment de charges électrostatiques négatives au niveau des domaines extracellulaires de CXCR4 interagissant avec la boucle V3 de la gp120 [Fouchier et al., 1992]. La perte d'un site de N-glycosylation présent dans le segment N-terminal de V3 est également associée à une utilisation préférentielle de CXCR4 [Pollakis et al., 2001]. Des algorithmes de prédiction de l'utilisation des corécepteurs ont été développés, intégrant les résidus aux positions 11 et 25 mais également d'autres résidus de la boucle V3 [Briggs et al., 2000; Jensen et al., 2003; Resch et al., 2001]. Les algorithmes bioinformatiques reposent sur la comparaison de la séquence soumise pour la détermination du tropisme avec une banque de séquences de phénotype connu [Jensen and van 't Wout, 2003]. Les performances de prédiction du tropisme reposent donc sur la qualité de la base de données et notamment sur la méthode de détermination phénotypique employée ainsi que sur le type de séquences, population virale ou séquence clonale. De plus, les corrélations entre le génotype et le phénotype ont été établies pour les virus de sous-type B dans l'ensemble des algorithmes disponibles, excepté pour l'algorithme WebPSSM<sub>SI/NSI</sub> sous-type C établi avec des virus de sous-type C [Jensen et al., 2006].

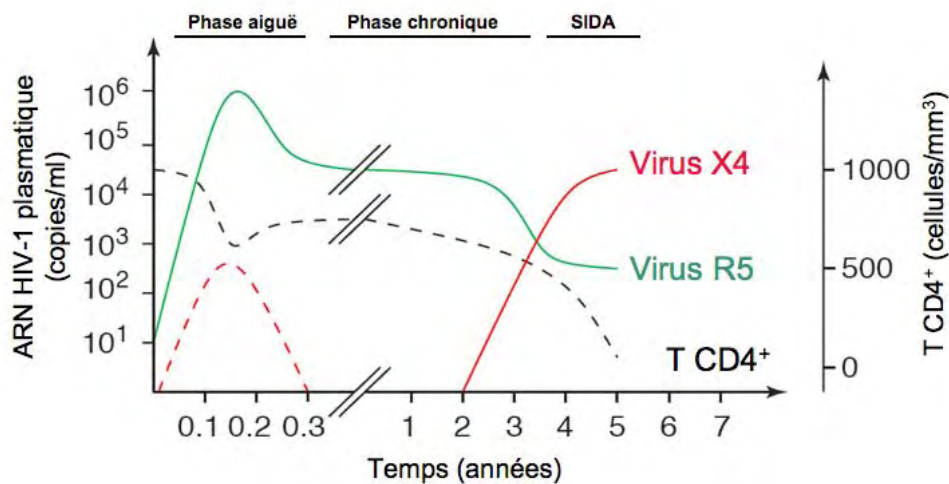


## **4. Evolution du tropisme viral au cours de l'infection par le HIV-1**

### **4.1. Histoire naturelle de l'infection par le HIV-1**

L'histoire naturelle de l'infection comporte trois principaux stades :

- La primo-infection correspond à la diffusion de l'infection dans l'organisme, d'abord locorégionale (de la porte d'entrée vers le premier relais ganglionnaire), puis généralisée avec une infection massive des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires effecteurs, dont la grande majorité est contenue au niveau des muqueuses [Pope and Haase, 2003]. La charge virale est très élevée à ce stade puis diminue parallèlement au développement de la réponse immunitaire spécifique anti-HIV-1 notamment CTL. Cliniquement la phase de primo-infection peut-être symptomatique avec un syndrome fébrile, une polyadénopathie, une éruption cutanée, des ulcérations au niveau des muqueuses, des troubles digestifs et parfois une atteinte méningée.
- Le stade d'infection chronique asymptomatique se caractérise par le contrôle de la réplication virale (avec une stabilisation de la virémie) par la réponse immunitaire spécifique. Le niveau de réplication à ce stade a une valeur pronostique sur l'évolution ultérieure de l'infection [Mellors et al., 1997; Mellors et al., 1996]. Cette phase de latence clinique a une durée moyenne d'environ 10 ans au cours de laquelle le taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> circulants décline lentement. Cette phase peut être beaucoup plus courte pour des patients dits « progresseurs rapides » ou à l'inverse beaucoup plus longue pour des patients dits « non progresseurs à long terme ». Les niveaux d'activation et d'apoptose lymphocytaire T à ce stade ont aussi une valeur pronostique importante sur l'évolution ultérieure de l'infection [Deeks et al., 2004; Giorgi et al., 1999; Liu et al., 1997; Sousa et al., 2002].
- Le stade SIDA est marqué par une immunodépression profonde (chute du taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>) favorisant la survenue d'infections opportunistes et de cancers, et qui s'associe à une augmentation progressive de la charge virale.



**Figure 16. Evolution du tropisme R5/X4 au cours de l'histoire naturelle de l'infection par le HIV-1.** (d'après Regoes et al. Trends Microbiol. 2005 ; 13(6) : 269)

Les virus R5 prédominent au cours de la primo-infection et dans les phases initiales de l'infection [van't Wout et al., 1994]. Puis chez environ 50% des patients infectés par le HIV-1 de sous-type B depuis plusieurs années, on observe l'émergence de virus X4 ou R5X4, associée à une accélération de la chute des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et à une évolution de la maladie vers le stade SIDA (Figure 16) [Glushakova et al., 1998; Kimata et al., 1999]. Les mécanismes physiopathologiques de l'évolution du tropisme viral de R5 vers X4 restent cependant encore incomplètement compris.

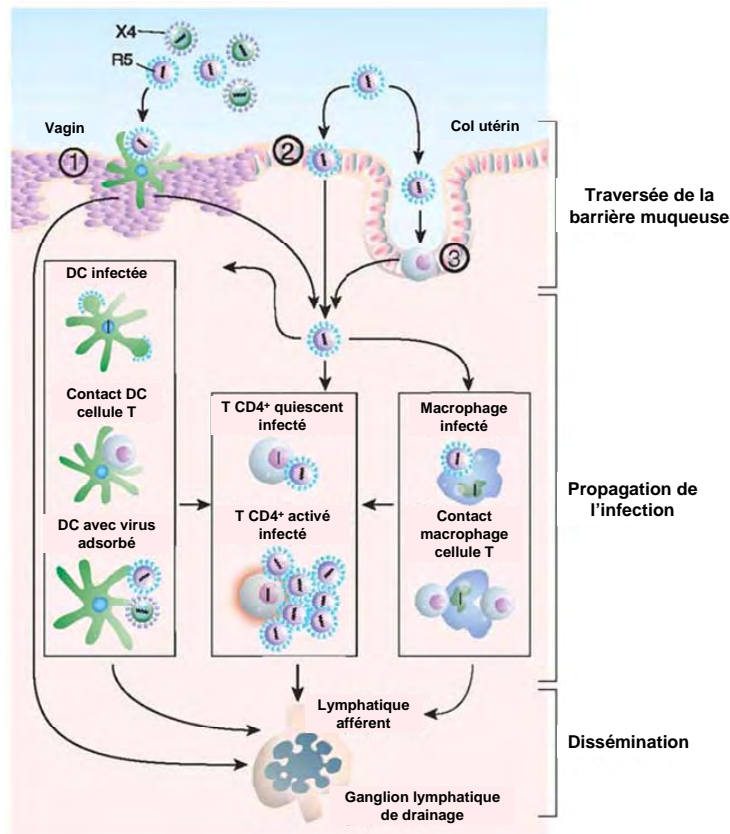
#### 4.2. Prédominance des virus R5 en phase précoce de l'infection

Les virus R5 représentent la population virale prédominante dans le plasma au cours de la primo-infection [van't Wout et al., 1994]. La résistance à l'infection par le HIV-1 d'individus n'exprimant pas CCR5 à la surface de leurs cellules (sujets homozygotes CCR5Δ32) souligne l'importance du corécepteur CCR5 au cours de la primo-infection [Liu et al., 1996], même si cette résistance à l'infection n'est pas absolue puisque des cas d'infection par des virus X4 ont été rapportés chez ces patients n'exprimant pas CCR5 [Gorry et al., 2002; Naif et al., 2002; Sheppard et al., 2002]. Différents mécanismes sont susceptibles d'expliquer cette prédominance des virus R5 au début de l'infection.

#### 4.2.1. Transmission muqueuse préférentielle des virus R5

La transmission sexuelle est le mode de contamination HIV prédominant mais l'identité des premières cellules infectées reste controversée [Kwa et al., 2003; Pope and Haase, 2003]. Les tissus des muqueuses génitales et rectales sont riches en cellules dendritiques, en macrophages et en lymphocytes T qui expriment CD4, CCR5 et à un moindre niveau CXCR4 (Figure 17) [Miller and Shattock, 2003; Patterson et al., 1998]. Chacun de ces types cellulaires est donc sensible à l'infection par le HIV-1. Dans le modèle macaque, l'infection de chacun de ces trois types cellulaires peut être détectée dans l'heure qui suit l'administration intra-vaginale du SIV. Les cellules dendritiques immatures de l'épithélium expriment dix fois plus CCR5 que CXCR4 [Lee et al., 1999] et répliquent les souches R5 de façon sélective [Granelli-Piperno et al., 1998]. Les cellules de Langerhans, appartenant à la famille des cellules dendritiques, pourraient jouer un rôle important dans les étapes précoces de la transmission sexuelle du HIV-1 [Kawamura et al., 2003]. CXCR4 n'est en général pas détectable sur les cellules de Langerhans humaines, tandis que CCR5 est présent à de faibles niveaux sur une minorité de ces cellules [Zaitseva et al., 1997], ce qui rend un faible pourcentage de cellules (<5%) sensibles à l'infection par un virus R5. Le niveau d'expression de CCR5 à la surface des cellules de Langerhans pourrait être un déterminant majeur dans la transmission sexuelle du HIV-1 et un facteur important pour la transmission préférentielle des virus R5 [Kawamura et al., 2003]. L'expression de CCR5, mais pas de CXCR4, sur les cellules épithéliales intestinales pourrait aussi expliquer la transmission préférentielle de virus R5 par voie rectale [Bomsel and David, 2002]. La présence d'une forte concentration du ligand de CXCR4, SDF-1, dans la lumière intestinale, pourrait aussi être un facteur de suppression de la transmission des virus X4.

Le modèle de la transmission sexuelle du HIV-1 pourrait donc reposer sur l'expression de CCR5 par les cellules cibles présentes dans l'environnement de la muqueuse génitale, qui jouerait le rôle de filtre. Dans ce modèle, le niveau d'expression de CCR5 a une influence majeure sur l'efficacité de la transmission virale, et l'expression locale abondante de CCR5, comparée à celle de CXCR4, expliquerait le phénotype R5 de la majorité des virus transmis.



**Figure 17. Transmission muqueuse du HIV-1** (d'après Pope *et al.* Nat Med 2003 ;9(7) :847). Au niveau vaginal, la muqueuse est pluristratifiée (partie gauche de la figure). La transmission à ce niveau impliquerait essentiellement les cellules dendritiques ①, infectées ou ayant capté les particules virales à leur surface, qui transmettent ensuite le virus aux T CD4<sup>+</sup>. Au niveau du col utérin (endocol), la muqueuse devient monostratifiée et donc plus facilement plus permissive aux particules virales, par transcytose ②, ou par infection des lymphocytes intra-épithéliaux ③. Les premières cellules infectées à ce niveau peuvent être les cellules dendritiques, les T CD4<sup>+</sup> ou les macrophages tissulaires présents dans le chorion muqueux. Là encore, les cellules infectées dans la muqueuse vont gagner le premier relais ganglionnaire par les lymphatiques afférents pour permettre l'établissement et la dissémination de l'infection.

#### 4.2.2. Réplication préférentielle des virus R5

Une autre explication du blocage apparent de la transmission sexuelle des virus X4 peut être avancée. En effet, la prédominance des virus R5 au stade initial de l'infection est aussi retrouvée après transmission de la mère à l'enfant [Salvatori and Scarlatti, 2001;

Scarlati et al., 1993] et après contamination par voie sanguine [Spijkerman et al., 1995; Yu et al., 1998]. Pourtant, les SHIV X4 infectent les macaques par voie vaginale, ce qui va à l'encontre d'une barrière physique infranchissable aux virus X4 [Miller and Hu, 1999]. Les virus X4 pourraient donc être efficacement transmis mais ne pas être amplifiés massivement lors de la phase initiale de dissémination du virus. En effet, à ce stade, les virus R5 présentent un avantage en raison de leur tropisme préférentiel pour les cellules dendritiques qui interagissent étroitement avec cellules T. Les cellules dendritiques sont capables de lier les particules virales indépendamment de CCR5 ou de CXCR4, puis d'internaliser le virus dans des vacuoles d'endocytose intracellulaires sans être le siège d'une infection productive [Kwon et al., 2002]. Les cellules dendritiques présentent les antigènes des pathogènes aux cellules lymphocytaires des ganglions lymphatiques et des sites inducteurs du tissu lymphoïde associé aux muqueuses afin d'initier une réponse immunitaire adaptative. Quand la cellule dendritique interagit avec la cellule T CD4 dans des régions riches en cellules T CD4 activées, le virus est dans un environnement idéal pour permettre une amplification rapide et efficace. Le HIV-1 se réplique préférentiellement dans les cellules activées engagées dans le cycle cellulaire comme les cellules mémoires effectrices, abondantes dans le tissu lymphoïde associé aux muqueuses, en particulier digestives (GALT). Ce sont en particulier les virus R5 qui ont un avantage répliatif à ce stade car les cellules T CD4 activées expriment surtout le corécepteur CCR5. Le GALT est le compartiment préférentiel de la réplication virale au cours de la primo-infection [Brenchley et al., 2004] et les cellules mémoires effectrices constituent la population cible idéale pour une réplication massive des virus R5 [Li et al., 2005; Mattapallil et al., 2005].

De plus, au début de l'infection, le taux de prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires est environ 10 fois celui des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs. En cas de transmission de population virale mixte de virus R5 et X4, la production de virus R5 résultant de l'infection des T CD4<sup>+</sup> mémoires sera donc beaucoup plus importante que celle des virus X4 infectant les T CD4<sup>+</sup> naïfs au début de l'infection [Davenport et al., 2002; Di Mascio et al., 2006; Ribeiro et al., 2006].

Enfin, la présence de quantités importantes de SDF-1 au niveau des muqueuses digestives pourrait inhiber par compétition la réplication des virus X4 en induisant l'internalisation de CXCR4 au niveau des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires présents dans les muqueuses.

Ainsi, la transmission préférentielle des virus R5 serait due à leur avantage répliatif dans l'interaction cellule dendritique/cellule T au niveau du tissu lymphoïde. Cette amplification sélective des virus R5 serait alors indépendante de la voie de transmission, qu'elle soit rectale, vaginale, verticale ou sanguine, puisque les virus atteindront toujours les ganglions lymphoïdes. Si il n'y a pas de barrière infranchissable à la transmission des virus X4, les virus R5 dominent ensuite la quasiespèce homogène que l'on retrouve en primo-infection. Les virus X4 ont une capacité de répliation limitée après la dissémination du virus dans les sites de répliation les plus actifs. Deux cas de transmission sanguine de virus X4 ont été rapportés avec détection de la souche X4 à la phase précoce, attestant de la réussite de la transmission [Cornelissen et al., 1995; Pratt et al., 1995]. Mais au fur et à mesure que la primo-infection a progressé, les virus R5 sont devenus prédominants chez les receveurs, tandis que les virus X4 sont devenus minoritaires ou indétectables. L'hypothèse serait que les virus R5 sont mieux adaptés *in vivo* que les virus X4 alors qu'ils sont tous deux transmis avec succès.

#### **4.2.3. Contrôle immunitaire des virus X4 au cours de la primo-infection**

Les virus X4 seraient plus susceptibles à la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et les anticorps neutralisants, expliquant alors que les virus X4 transmis ne persistent pas chez le sujet infecté [Bou-Habib et al., 1994; Harouse et al., 2003; Yamaguchi and Gojobori, 1997]. La gp120 des virus X4, plus ouverte et moins protégée par les glycanes (perte du site de N-glycosylation au niveau du segment N-terminal de V3) que celle des virus R5 pourrait donc être plus sensible aux anticorps neutralisants. Les virus X4 éventuellement transmis seraient alors soumis à une pression de sélection qui contribuerait à la prépondérance des virus R5 au cours de la primo-infection. La réponse immunitaire médiée par les CTL pourrait également contrôler plus efficacement les virus X4 par rapport aux virus R5 [Granelli-Piperno et al., 1998].

### **4.3. Emergence de virus X4 au cours de l'évolution de l'infection**

#### **4.3.1. Accumulation progressive de mutations dans *env***

L'émergence de virus X4 pourrait être la conséquence d'une évolution génétique au sein des quasi-espèces par accumulation progressive de mutations dans le gène *env*. Quelques

mutations à des positions clés de la région V3 de l'enveloppe sont en effet suffisantes pour entraîner un changement du tropisme viral de R5 vers X4 [De Jong et al., 1992; Fouchier et al., 1992]. La substitution d'acides aminés électrostatiquement neutres ou chargés négativement en acides aminés chargés positivement aux positions 11 et/ou 25 de la région V3 peut suffire à l'acquisition d'un tropisme viral X4. Etant donnée la variabilité génétique importante du HIV-1, les virus X4 devraient donc émerger rapidement au cours de l'histoire naturelle de la maladie, ce qui n'est pas le cas. Un désavantage transitoire des virus intermédiaires ayant une enveloppe en cours d'évolution de R5 vers X4 a été évoqué. Ces virus pourraient en effet avoir des capacités infectieuses et répliquatives diminuées par rapport aux virus R5 initiaux ou X4 finaux, ce qui limiterait l'émergence des virus X4. Les virus R5 intermédiaires ayant acquis une ou deux mutations conduisant à l'évolution vers le tropisme X4 pourraient donc être contre-sélectionnés et réverser vers un génotype R5 complet. Des mutations dans V1-V2 pourraient contribuer à maintenir la capacité infectieuse et répliquative des virus évoluant vers un tropisme X4 mature [Pastore et al., 2006].

#### **4.3.2. Facteurs immunitaires impliqués dans l'émergence des virus X4**

Comme indiqué précédemment, certains travaux suggèrent que la réplication des virus X4 pourrait être mieux contrôlée que celle des virus R5 par la réponse immunitaire humorale ou cellulaire [Bou-Habib et al., 1994; Harouse et al., 2003; Yamaguchi and Gojobori, 1997]. L'érosion progressive de la réponse immunitaire spécifique élaborée contre le HIV-1 du fait de l'immunodépression pourrait donc permettre l'émergence des virus X4.

Par ailleurs, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup>) expriment fortement CXCR4 et peu ou pas CCR5 et représentent donc des cibles privilégiées pour les virus X4. Une augmentation de l'expression de CXCR4 sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> induite par l'élévation du taux plasmatique d'IL-7 en réponse à la lymphopénie T CD4<sup>+</sup> pourrait également contribuer à la sélection de virus X4. Notre équipe a ainsi montré que l'infection par des virus X4 était associée à une activation immunitaire persistante chez les patients reconstituant mal leur immunité sous traitement antirétroviral efficace [Delobel et al., 2006].

Dans les phases initiales de l'infection par le HIV-1, le compartiment T CD4<sup>+</sup> mémoire a un taux de prolifération très supérieur à celui du compartiment T CD4<sup>+</sup> naïf. La réplication des virus X4 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs quiescents conduit à une faible production virale. A l'inverse, la réplication des virus R5 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires activés à fort taux de prolifération conduit à une production virale très importante

ce qui pourrait donc contribuer à la prédominance des virus R5 au début de la maladie. Cependant, au cours de l'évolution de la maladie et de l'aggravation de la lymphopénie T CD4<sup>+</sup>, le taux de prolifération homéostatique des T CD4<sup>+</sup> naïfs augmente. Le taux de prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs devient ainsi proche de celui des T CD4<sup>+</sup> mémoires. Cette évolution dynamique du taux de prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs pourrait être un déterminant majeur de l'émergence des virus X4. A l'inverse, une augmentation de la fréquence des T CD4<sup>+</sup> mémoires ou de l'expression de CCR5 sur ces cellules va freiner l'évolution du tropisme viral de R5 vers X4.

## **5. Impact du tropisme viral sur la physiopathologie de l'infection**

Le tropisme préférentiel du HIV-1 pour CCR5 ou CXCR4 influence l'homéostasie lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> du fait de l'expression préférentielle de CCR5 sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires centraux et effecteurs et de CXCR4 sur les thymocytes et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs. L'impact du tropisme viral sur la physiopathologie de l'infection est lié à des mécanismes directs d'infection et de destruction des cellules cibles, et à des mécanismes indirects correspondant à l'activation et l'apoptose de cellules non infectées, notamment via les interactions gp120/CD4/CXCR4.

### **5.1. Virus R5 et compartiment lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> mémoire**

Les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires effectrices activées CD45RO<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> présentes dans le tissu lymphoïde associé aux muqueuses représentent une population cible quantitativement très abondante pour les virus R5. Les données obtenues montrent que les virus R5 infectent de façon massive cette population cible dès la primo-infection. La majorité des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires effectrices de l'organisme va ainsi être détruite en quelques semaines au cours de la primo-infection, principalement par effet viral direct [Brenchley et al., 2004; Mattapallil et al., 2005], mais aussi indirectement par l'induction de l'apoptose de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> non infectés dans le tissu lymphoïde associé aux muqueuses [Li et al., 2005], et par l'activation et le recrutement des T CD4<sup>+</sup> mémoires centrales CD45RO<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> en mémoires effectrices. La tentative de reconstitution du compartiment T CD4<sup>+</sup> mémoire effecteur va ainsi conduire à une déplétion progressive du compartiment T CD4<sup>+</sup> mémoire



central, et l'épuisement de ce compartiment pourrait être associé à une évolution péjorative de l'infection [Grossman et al., 2006].

## 5.2. Virus X4 et compartiments lymphocytaires cibles

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> sont des cibles privilégiées pour les virus X4 du fait de l'expression préférentielle de CXCR4. L'élargissement aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs de la population cible des virus X4 pourrait être l'un des éléments déterminants de leur pathogénicité accrue *in vivo*. Un mécanisme direct pourrait être impliqué, lié à l'infection et à la destruction des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs par les virus X4 dans le tissu lymphoïde. Une déplétion massive des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, naïfs et mémoires, a ainsi été mise en évidence dès les premières semaines post-infection chez des macaques infectés par un virus recombinant SHIV X4 pathogène (virus SIV avec une enveloppe HIV-1 X4) [Ho et al., 2005; Nishimura et al., 2005]. Un mécanisme indirect par lequel les virus X4 peuvent également entraîner la déplétion du compartiment T CD4<sup>+</sup> naïfs est représenté par les phénomènes d'activation, de différenciation et d'apoptose de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs non infectés, secondaire aux interactions gp120/CD4/CXCR4 [Hazenbergh et al., 2003].

L'infection du thymus par le HIV-1 pourrait participer aux mécanismes impliqués dans la déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en réduisant la production compensatrice de lymphocytes T naïfs [Douek et al., 1998], même si l'infection de cet organe semble inconstante. Les thymocytes expriment fortement CXCR4 et représentent la population cellulaire cible la plus abondante pour le HIV-1 dans le thymus [Schmitt et al., 2003; Taylor et al., 2001]. Cependant, l'étude ANRS EP32 n'a pas révélé de déficit de production thymique chez les patients mauvais répondeurs immunologiques, bien que le défaut de reconstitution T CD4<sup>+</sup> ait été associé à l'infection par un virus X4 [Delobel et al., 2006].

## 5.3. Apoptose liée à la gp120 X4

L'apoptose de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> non infectés dans le micro-environnement de cellules infectées représente un mécanisme indirect responsable de la déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> [Gougeon, 2003]. Les cellules « bystander » présentes dans le micro-environnement d'une cellule infectée peuvent être détruites par des voies impliquant les récepteurs de mort (CD95, TRAIL death receptor 5) [Gougeon, 2003; Herbeuval et al., 2005]. La gp120 est également capable d'induire l'apoptose de cellules non infectées par différents

mécanismes [Perfettini et al., 2005]. La gp120 sécrétée sous forme monomérique soluble dans le milieu extracellulaire par les cellules infectées peut induire l'apoptose de cellules non infectées présentes dans le micro-environnement, des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mais aussi d'autres types cellulaires comme les cellules neuronales. Cette atteinte neuronale pourrait participer à la démence associée à l'infection par le HIV-1 [Hayward, 2004; Xu et al., 2004].

Les mécanismes de l'apoptose induite par la gp120 soluble impliquent les molécules CD4 et CXCR4. L'activation de CD4 par la gp120 peut activer la voie pro-apoptotique CD95-CD95L. Par ailleurs, l'activation de p56<sup>lck</sup> liée au domaine intra-cellulaire de CD4 peut conduire à l'apoptose par l'activation des caspases 9 et 3 [Somma et al., 2000; Tuosto et al., 2002]. Cependant, la gp120 est capable d'induire l'apoptose de cellules exprimant un récepteur CD4 délété de son domaine intracytoplasmique, et donc de sa capacité à signaler via p56<sup>lck</sup> [Roggero et al., 2001]. La partie extracellulaire de CD4 induit le changement conformationnel de la gp120 nécessaire à son interaction avec le corécepteur CXCR4. L'activation de CXCR4 peut induire l'apoptose de la cellule cible via la signalisation par les protéines G $\alpha_i$  couplées à CXCR4 et par l'activation de la voie p38-MAPKinases ou l'augmentation du flux calcique [Perfettini et al., 2005; Trushin et al., 2007].

La gp120 couplée à la gp41 sous forme trimérique à la surface des cellules infectées peut aussi induire l'apoptose par un processus d'hémi-fusion membranaire, par formation de syncytia qui évoluent vers l'apoptose, ou par contagion des cellules voisines de la cellule pré-apoptotique.

#### **5.4. Emergence de virus X4 et progression de la maladie**

L'émergence de virus X4 chez les patients infectés est associée à une accélération de la chute des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et à une évolution péjorative de la maladie vers le stade SIDA [Glushakova et al., 1998; Koot et al., 1993].

Différents arguments plaident en faveur d'un rôle causal des virus X4 dans cette évolution accélérée de la déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. *In vitro*, les virus X4 ont une capacité répliquative et un effet cytopathogène accru [Koot et al., 1992], provoquant une déplétion majeure des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> lors d'infection d'histoculture de tissu lymphoïde [Penn et al., 1999]. Chez l'homme, des cas de transmission de virus X4 avec une évolution accélérée de la maladie ont été rapportés [Hayman et al., 2004; Markowitz et al., 2005]. Dans le modèle macaque, l'infection par un SHIV exprimant une enveloppe X4 entraîne une déplétion majeure des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> périphériques, tout particulièrement des T CD4<sup>+</sup>

naïfs [Ho et al., 2005; Nishimura et al., 2005]. L'évolution de la maladie chez les macaques infectés par des SHIV X4 pathogènes est habituellement très rapide vers le stade SIDA et le décès. À l'inverse, l'infection par des SHIV R5 induit une déplétion des T CD4<sup>+</sup> mémoires dans le tissu lymphoïde associé aux muqueuses mais n'entraîne pas de déplétion de la population T CD4<sup>+</sup> naïve périphérique, avec donc une évolution plus lente de la maladie [Harouse et al., 1999]. Ces données suggèrent donc que les virus R5 et X4 sont susceptibles d'avoir un impact significativement différent sur l'homéostasie lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> et donc sur l'évolution de la maladie.

À l'inverse, il a été suggéré que l'émergence de virus X4 pourrait n'être qu'une conséquence passive de l'immunodépression qui serait responsable de l'accélération de la chute des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en fin d'évolution de la maladie. L'érosion de la réponse immunitaire spécifique anti-HIV-1 pourrait en effet conduire à une perte du contrôle préférentiel de la réplication des virus X4 par rapport aux virus R5 et donc à leur émergence [Bou-Habib et al., 1994; Harouse et al., 2003; Yamaguchi and Gojobori, 1997]. Les deux mécanismes, actif et passif, pourraient se conjuguer dans un modèle dans lequel l'immunodépression favoriserait l'émergence de virus X4 qui en retour accentueraient la déplétion du compartiment T CD4<sup>+</sup> du fait de leur pathogénicité accrue pour les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs et les thymocytes.

### **5.5. Emergence de virus X4 et restauration immunitaire sous traitement antirétroviral**

La persistance d'une réplication virale résiduelle sous traitement antirétroviral efficace demeure controversée. Notre équipe a mis évidence une évolution du réservoir cellulaire du virus sous HAART avec notamment une évolution progressive du tropisme viral de R5 vers X4 sur une durée de 5 ans [Delobel et al., 2005; Izopet et al., 2002]. Nous avons également observé une association entre la présence de virus X4, ou une évolution du tropisme de R5 vers X4 sous HAART, et une moins bonne reconstitution du taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> malgré le contrôle efficace de la charge virale plasmatique [Delobel et al., 2006; Delobel et al., 2005]. A l'inverse, deux autres équipes ont observé une stabilité du réservoir cellulaire, avec une absence de modification du tropisme viral après 48 semaines de traitement antirétroviral efficace [Soulie et al., 2007] et l'émergence de virus X4 chez seulement 11%

des patients après 2 ans [Seclen et al., 2010]. Les durées différentes de suivi des patients dans ces études pourraient expliquer ces résultats.

Deux études récentes ont montré que les patients infectés par des virus utilisant CXCR4 avaient une décroissance accélérée des lymphocytes T CD4 à un an et une progression plus rapide de la maladie sans traitement, ainsi qu'une moindre restauration du nombre de lymphocytes CD4 sous traitement [Waters et al., 2008; Weiser et al., 2008]. Le tropisme viral pourrait donc avoir aussi un impact sur la réponse immunologique sous traitement antirétroviral et sur l'évolution de la maladie chez les patients en succès virologique.

## **6. Les antagonistes des corécepteurs d'entrée**

### **6.1. Les antagonistes de CCR5**

#### **6.1.1. Les analogues de chimiokines**

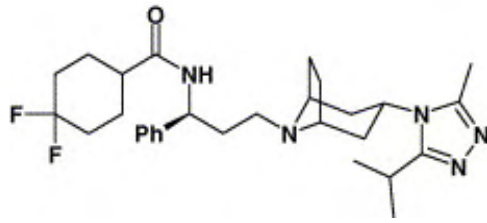
La découverte des corécepteurs d'entrée du HIV-1 a été facilitée par la mise en évidence d'une inhibition de la réplication du HIV-1 par des chimiokines naturelles [Cocchi et al., 1995]. La première approche pour élaborer un inhibiteur du corécepteur d'entrée a donc reposé sur la modification de la chimiokine naturelle RANTES (CCL5) pour obtenir un inhibiteur plus puissant. Le potentiel d'inhibition et l'affinité pour le corécepteur CCR5 ont été augmentés par modifications chimiques, tandis que la capacité de la chimiokine à signaler via l'interaction avec CCR5 a été abolie [Simmons et al., 1997; Townson et al., 2000]. En effet, la partie N-terminale de la chimiokine est impliquée dans le déclenchement d'un signal de transduction qui active les lymphocytes et induit le chimiotactisme [Blanpain et al., 2003]. Un inhibiteur d'entrée du HIV-1 doit idéalement bloquer l'interaction gp120/CCR5 mais sans activer la cascade enzymatique dépendant du corécepteur. Les analogues de chimiokines développés ont la propriété d'induire l'internalisation du corécepteur après fixation de l'analogue, ce qui entraîne une régulation négative du corécepteur contribuant à diminuer les possibilités d'infection par le HIV-1 [Pastore et al., 2003]. De plus, les analogues de chimiokines provoquent une séquestration prolongée du corécepteur cellulaire [Mack et al., 1998]. Le défaut majeur des analogues de chimiokines est leur capacité résiduelle à signaler via CCR5 et via les protéoglycanes de surface [Rodriguez-Frade et al., 1999; Vila-Coro et al.,

1999]. Cette activité résiduelle a été associée avec une stimulation de la réplication virale par induction de l'entrée mais aussi de l'intégration du HIV-1 [Gordon et al., 1999; Marozsan et al., 2001]. De fortes concentrations de ces analogues sont aussi responsables d'une stimulation des lymphocytes T et sont considérés comme des agonistes partiels de CCR5. Cette activité résiduelle de signalisation limite l'utilisation des analogues de chimiokines *in vivo*.

### **6.1.2. Les petites molécules antagonistes de CCR5**

Les petites molécules antagonistes de CCR5 se lient aux poches hydrophobes à l'intérieur des hélices transmembranaires de CCR5 [Dragic et al., 2000]. Ce site ne se superpose pas aux sites de liaison ni des agonistes de CCR5, ni de l'enveloppe du HIV-1, mais induit et stabilise une conformation du récepteur qui n'est reconnue par aucun des deux. Ces molécules, considérées comme des inhibiteurs allostériques, sont généralement des antagonistes purs de CCR5, ne permettant pas au récepteur de lier les chimiokines naturelles et d'induire le signal de transduction. L'administration orale de ces petites molécules antagonistes a montré une inhibition de la réplication virale et une prévention de la transmission vaginale chez le macaque [Veazey et al., 2003; Veazey et al., 2005]. A ce jour, trois antagonistes (maraviroc, vicriviroc et aplaviroc) ont montré une inhibition de la réplication virale chez l'homme [Dorr et al., 2005].

Le maraviroc (Pfizer) a reçu sa première autorisation de mise sur le marché en Europe en 2007. Le maraviroc est actuellement utilisé pour le traitement des patients présentant des résistances à de multiples molécules antirétrovirales mais a récemment reçu l'autorisation pour une utilisation en première ligne de traitement. Le maraviroc est une imidazopyridine (Figure 18) qui se fixe dans une cavité transmembranaire hydrophobique de CCR5. Sa fixation modifie la conformation de la seconde boucle extracellulaire de CCR5, empêchant son interaction avec la boucle V3 de la gp120 du HIV-1 [Dragic et al., 2000]. Le maraviroc est un inhibiteur compétitif de la fixation des chimiokines à CCR5, avec une concentration inhibitrice 50% (CI50) de l'ordre du nanomolaire. De plus, il ne déclenche pas le signal de redistribution du calcium intracellulaire.



**Figure 18. Structure chimique du maraviroc.**

Le vicriviroc (Schering Plough) est un autre inhibiteur de CCR5, actuellement en essais cliniques de phase III, qui se fixe dans une poche transmembranaire similaire à la poche ciblée par le maraviroc [Strizki et al., 2005; Wilkin et al., 2010].

L'aplaviroc (GlaxoSmithKline) a vu son développement arrêté dans les essais de phase II en raison d'une toxicité hépatique importante [Crabb, 2006]. D'autres molécules sont en cours de développement.

## **6.2. Les antagonistes de CXCR4**

Le corécepteur CXCR4 est utilisé par les virus X4 et les virus R5X4 qui émergent à un stade avancé de la maladie chez environ 50% des patients infectés par un virus de sous-type B [Melby et al., 2006; Wilkin et al., 2007]. Contrairement à CCR5, l'absence de récepteur CXCR4 n'est pas viable chez l'homme. Les souris déficientes en CXCR4 ou en SDF-1 $\alpha$  son ligand naturel ne dépassent pas le stade de l'embryogénèse en raison de malformations sévères et variées [Tachibana et al., 1998; Zou et al., 1998]. Le récepteur CXCR4 est donc indispensable durant l'embryogénèse, mais joue aussi un rôle critique à l'âge adulte, en particulier dans la régulation de l'hématopoïèse et de l'homéostasie des cellules de l'immunité [Lapidot and Kollet, 2002]. Néanmoins, plusieurs voies de blocage de CXCR4 ont été étudiées. Des petites molécules antagonistes ont été identifiées, ainsi que des antagonistes peptidiques [Shaheen and Collman, 2004]. En revanche, les analogues de chimiokines, dérivées du SDF-1 $\alpha$  n'ont pas démontré de potentiel thérapeutique à ce jour.

### **6.2.1. Les petites molécules antagonistes de CXCR4**

La première molécule identifiée a été l'AMD 3100 (AnorMed, Langley, BC, Canada), un bicyclam antagoniste fortement sélectif de CXCR4, mais qui requiert une administration parentérale [Schols et al., 1997]. Des essais chez quelques patients infectés ont montré sa

capacité à réduire la charge virale en cas d'infection par des virus X4 purs, mais pas en présence de virus D/M [Schols D., 2002]. Les essais cliniques ont été interrompus en raison d'une forte toxicité hépatique et hématologique de cette molécule. Un nouveau composé de cette famille fait actuellement l'objet d'essais cliniques de phase II, l'AMD070. Il est administré par voie orale et a montré une spécificité et une activité similaires à celles de l'AMD 3100 [Schols D., 2003; Steen et al., 2010].

Une autre petite molécule non peptidique bloquant CXCR4 et administrable par voie orale a été décrite, le KRH-1636 (Tokyo University) [Ichiyama et al., 2003]. Le KRH-1636 inhibe la liaison du SDF-1 $\alpha$  et inhibe la signalisation médiée par CXCR4. Le KRH-1636 bloque la réplication des virus X4 *in vitro* et *in vivo* dans le modèle souris SCID.

### **6.2.2. Les antagonistes peptidiques et protéiques**

Des peptides bloquant les fonctions de CXCR4 et l'entrée des virus X4 ont été développés à partir d'un peptide antimicrobien naturel isolé chez la limule. La molécule principale est le T22, composé de 18 acides aminés, qui bloque l'infection par différents sous-types de HIV-1 [Murakami et al., 1997]. Différents peptides tronqués à partir du peptide initial ont été décrits. Il existe des résistances croisées entre ces peptides et l'AMD3100, ainsi qu'avec d'autres antagonistes de CXCR4 [Kanbara et al., 2001].

ALX40-4C est un peptide inhibiteur de CXCR4 qui bloque l'infection par les virus X4 *in vitro* [Doranz et al., 1997]. Ce composé avait été testé chez les patients infectés avant l'identification des corécepteurs d'entrée et n'avait pas montré de réduction de la charge virale, y compris chez les sujets infectés par des virus X4 [Doranz et al., 2001].

## **OBJECTIFS DU TRAVAIL**



La caractérisation du tropisme du HIV-1 dans les différents compartiments de l'organisme est un élément important pour l'étude de la pathogénicité de ce virus. Le blocage de l'entrée du virus par des antagonistes de corécepteurs constitue une nouvelle stratégie thérapeutique nécessitant la détermination du corécepteur utilisé par le virus. Les méthodes de caractérisation du tropisme viral sont basées sur des approches phénotypiques, d'accès relativement limité, et des méthodes génotypiques qui nécessitent une validation par l'analyse des corrélations génotype-phénotype.

Nous avons donc développé des approches phénotypiques et génotypiques, afin d'étudier l'impact du tropisme viral sur la physiopathologie de l'infection et guider l'utilisation des antagonistes de CCR5.

Dans une première partie, nous avons développé une méthode de détermination phénotypique de l'utilisation des corécepteurs d'entrée par le HIV-1. Les déterminants de l'utilisation des corécepteurs se situent dans l'enveloppe virale, principalement dans la région V3, mais d'autres régions de la gp120 et du domaine extra-membranaire de la gp41 ont été impliquées. Afin d'être aussi proche que possible des conditions *in vivo*, la méthode fondée sur un test RVA (Toulouse Tropism Test, TTT) permet de tester la gp120 et l'ectodomaine de la gp41. La détermination du tropisme a été réalisée à partir de l'ARN viral plasmatique mais aussi à partir de l'ADN viral cellulaire, ce qui permet de caractériser le virus HIV-1 chez les patients sous traitement antirétroviral efficace. La détection de variants minoritaires utilisant CXCR4 avec une sensibilité estimée à 0,5% de la population virale totale permet d'étudier l'impact de ces virus sur la physiopathologie de l'infection et la réponse virologique aux traitements comportant un antagoniste de CCR5.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié les déterminants génotypiques impliqués dans l'interaction gp120/corécepteur, et validé un algorithme génotypique de prédiction de l'utilisation des corécepteurs d'entrée. Nous avons montré chez des patients pré-traités que les tests génotypiques étaient une alternative satisfaisante aux tests phénotypiques pour la détermination du tropisme du HIV-1. Ces résultats ont des implications majeures pour l'utilisation des antagonistes de CCR5 en pratique clinique.

Les algorithmes de prédiction génotypiques ont été établis pour des virus de sous-type B, majoritaire dans les pays occidentaux. Il était nécessaire d'étudier les déterminants génotypiques de l'entrée pour les virus de sous-types non-B. Notre objectif était d'étudier les caractéristiques des sous-types les plus fréquents. Nous avons déterminé le phénotype

d'entrée de virus de sous-type C, sous-type majoritaire dans le monde, et étudié les déterminants génotypiques dans la région V3 permettant de prédire le phénotype. Nous avons montré que les déterminants de l'utilisation des corécepteurs d'entrée par les virus de sous-type C se trouvaient principalement dans la région V3 de l'enveloppe et étaient similaires à ceux décrits pour le sous-type B. De façon similaire, nous avons caractérisé le tropisme du HIV-1 de CRF02-AG, sous-type non-B majoritaire en France et en Europe de l'Ouest, et montré que certains algorithmes génotypiques construits sur des bases de données de sous-type B assuraient une bonne prédiction du phénotype pour ce sous-type.

Dans une dernière partie, nous avons caractérisé le tropisme du HIV-1 chez des sujets nouvellement infectés afin d'étudier son influence sur la progression de la maladie. Conformément aux données publiées, une prédominance des virus R5 lors de la primo-infection a été objectivée. Cependant, la prévalence des virus utilisant CXCR4 varie selon les études, en fonctions des tests utilisés mais aussi du compartiment analysé. Dans notre travail, le tropisme du HIV-1 dans les compartiments plasmatiques et cellulaires a été déterminé par des approches génotypiques et phénotypiques. La prévalence des virus utilisant CXCR4 était faible (6.4%). Les populations virales présentes dans le plasma sanguin et dans les cellules mononucléées sanguines étaient homogènes, avec un tropisme viral identique. Enfin, nous avons montré que l'infection des patients par un virus utilisant CXCR4 pour l'entrée était prédictive d'une décroissance plus rapide de la numération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et d'une initiation précoce d'un traitement antirétroviral par comparaison avec l'infection par un virus R5.

## **RESULTATS**

# **I Caractérisation phénotypique de l'utilisation des corécepteurs d'entrée par le HIV-1**

## **ARTICLE 1**

« Development and performance of a new recombinant virus phenotypic entry assay to determine HIV-1 coreceptor usage »

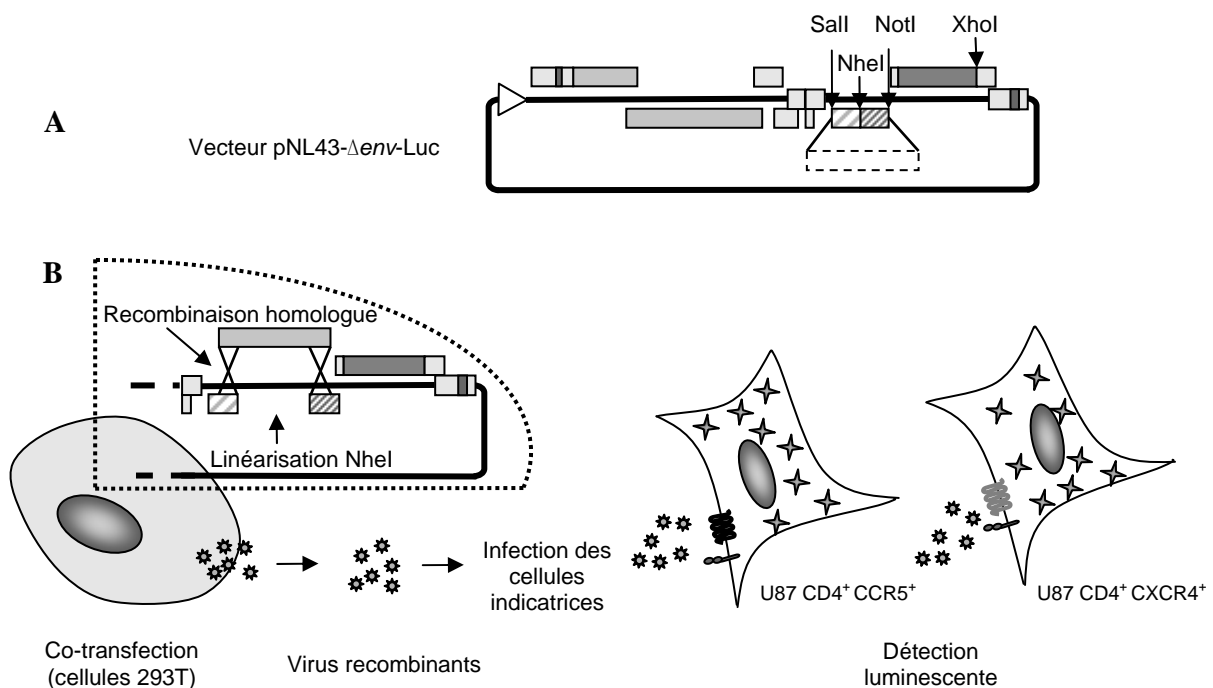
Raymond S., Delobel P., Mavigner M., Cazabat M., Souyris C., Encinas E., Bruel P., Sandres-Sauné K., Marchou B., Massip P., and Izopet J.

**Journal of Clinical Virology 2010 ;47 :126-130.**

Les premiers tests phénotypiques nécessitaient la mise en culture du virus et l'infection de lignées cellulaires possédant un seul corécepteur d'entrée, comme la lignée MT2 qui exprime CXCR4, ou l'infection de cellules transfectées avec le gène d'expression de CCR5 ou de CXCR4. La production de virus recombinants pseudotypés pour le gène de l'enveloppe permet, sans étape de culture virale préalable, d'analyser la capacité de la gp120 d'un virus à interagir avec un corécepteur afin d'entrer dans la cellule cible. Les tests phénotypiques sont plus fastidieux que les approches génotypiques, mais ils permettent d'analyser la glycoprotéine d'enveloppe dans son ensemble et dans des conditions assez proches de l'infection *in vivo*. De plus, seuls les tests phénotypiques permettent actuellement de distinguer les virus utilisant uniquement CXCR4 des virus capables d'utiliser les deux corécepteurs. Enfin, le séquençage direct permet d'analyser les virus représentant au moins 20% de la population virale totale, tandis que les approches phénotypiques sont théoriquement plus sensibles pour la détection de variants minoritaires. Les tests phénotypiques peuvent cependant présenter des biais et il n'existe pas de méthode de référence, ce qui implique d'évaluer la concordance entre différents tests.

Nous avons développé un nouveau test phénotypique fondé sur la production de virus recombinants pour la détermination du tropisme du HIV-1 à la fois dans le compartiment plasmatique et dans les compartiments cellulaires. Le vecteur pNL43- $\Delta env$ -Luc2 a été construit à partir d'un plasmide HIV-1 délété du fragment codant pour la gp120 et l'ectodomaine de la gp41 à l'intérieur gène de l'enveloppe (Figure 1A). Le gène de la luciférase a été inséré pour révéler l'entrée du virus dans les cellules. Le vecteur est linéarisé

grâce à un site de restriction unique Nhe1, puis co-transfecté avec le produit de PCR du gène de l'enveloppe à tester dans des cellules 293T où se produit une recombinaison homologe entre le vecteur et le produit de PCR. Les virus recombinants pseudotypés pour le gène de l'enveloppe sont produits dans le surnageant de culture et sont mis en présence de cellules indicatrices U87 possédant CD4 et CCR5 ou CXCR4 (Figure 1B). L'infection des cellules est révélée par la mesure de l'activité luciférase. La spécificité de l'utilisation des corécepteurs est attestée par l'inhibition du signal lors de l'utilisation d'antagonistes spécifiques de CCR5 et de CXCR4.



**Figure 1. Principe de la détermination des corécepteurs d'entrée du HIV-1 avec le test TTT (Toulouse Tropism Test).** (A) Vecteur pNL43- $\Delta$ env-Luc. (B) Schéma du test TTT : des virus recombinants pour *env* sont créés par insertion d'un produit de PCR du gène de la gp120 et de l'ectodomaine de la gp41 par recombinaison homologue dans un vecteur d'expression du HIV-1. L'infection des cellules indicatrices U87 par les virus recombinants est révélée en luminométrie.

Le test TTT a été validé pour la détermination de l'utilisation des corécepteurs d'entrée des virus de différents sous-types, à partir d'ARN plasmatique et d'ADN cellulaire. 434 échantillons de plasma et 168 échantillons de cellules mononucléées du sang périphérique ont été analysés. Le gène de l'enveloppe a été amplifié avec succès à partir d'échantillons

plasmatiques de différents sous-types du HIV-1, à partir du plasma et des cellules sanguines. Le TTT a permis de déterminer le tropisme de 97% des échantillons après l'amplification du gène de l'enveloppe virale. La sensibilité de détection des variants minoritaires X4 était de 0,5%. Nous avons évalué les corrélations entre les résultats obtenus avec le TTT et ceux obtenus avec le test commercial Trofile<sup>TM</sup> (Monogram, Biosciences) pour 54 échantillons et observé une concordance supérieure à 90% entre les deux tests.

La validation de ce nouveau test phénotypique qui permet de déterminer le tropisme de différents sous-types du HIV-1 à partir de l'ARN plasmatique ou de l'ADN viral cellulaire offre la possibilité de réaliser une analyse détaillée des compartiments anatomiques et cellulaires jouant un rôle essentiel dans la physiopathologie de l'infection. De plus, l'analyse du virus contenu dans les cellules du sang périphérique permet de déterminer le tropisme viral chez les patients traités avec une charge virale indétectable, situation aujourd'hui très fréquente en pratique clinique. Cependant, les tests phénotypiques sont longs et de réalisation coûteuse. Il était donc nécessaire de valider des tests génotypiques plus simples pour la gestion des traitements comportant des antagonistes de CCR5.



## Development and performance of a new recombinant virus phenotypic entry assay to determine HIV-1 coreceptor usage

Stéphanie Raymond<sup>a,b,c</sup>, Pierre Delobel<sup>a,b,d</sup>, Maud Mavigner<sup>a</sup>, Michelle Cazabat<sup>a,c</sup>, Corinne Souyris<sup>a,c</sup>, Stéphanie Encinas<sup>a,c</sup>, Patrick Bruel<sup>a,c</sup>, Karine Sandres-Sauné<sup>a,b,c</sup>, Bruno Marchou<sup>b,d</sup>, Patrice Massip<sup>b,d</sup>, Jacques Izopet<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> INSERM, U563, Toulouse, F-31300, France

<sup>b</sup> Université Toulouse III Paul-Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse, F-31300, France

<sup>c</sup> CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Laboratoire de Virologie, Toulouse, F-31300, France

<sup>d</sup> CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Toulouse, F-31300, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 July 2009

Received in revised form

16 November 2009

Accepted 17 November 2009

#### Keywords:

HIV-1

Phenotypic entry assay

Coreceptor

CCR5

### ABSTRACT

**Background:** Clinical trials of CCR5 antagonists have relied on the phenotypic determination of HIV-1 coreceptor usage. Few phenotypic assays are available, with few data on their concordance, and none has been designed to determine tropism from cell-associated HIV-1 DNA.

**Objectives:** To assess the performance of the new Toulouse Tropism Test (TTT) phenotypic assay to characterize HIV-1 tropism using blood plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

**Study design:** 434 plasma and 168 PBMC samples were tested with the TTT assay. We determined the correlation between our assay results on plasma samples and those of the commercial Trofile™ assay.

**Results:** The TTT assay determined the tropism of 97% of samples after successful amplification of the *env* gene. It performed well on both cell samples and plasma samples with various HIV-1 loads and subtypes. It detected 0.5% of minor CXCR4-using variants in the virus population. The TTT and the Trofile™ assays were >90% concordant for predicting HIV-1 tropism.

**Conclusion:** We have validated a new recombinant virus phenotypic assay for determining HIV-1 tropism using both plasma and cell samples from patients who are candidates for treatment with CCR5 antagonists.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Background

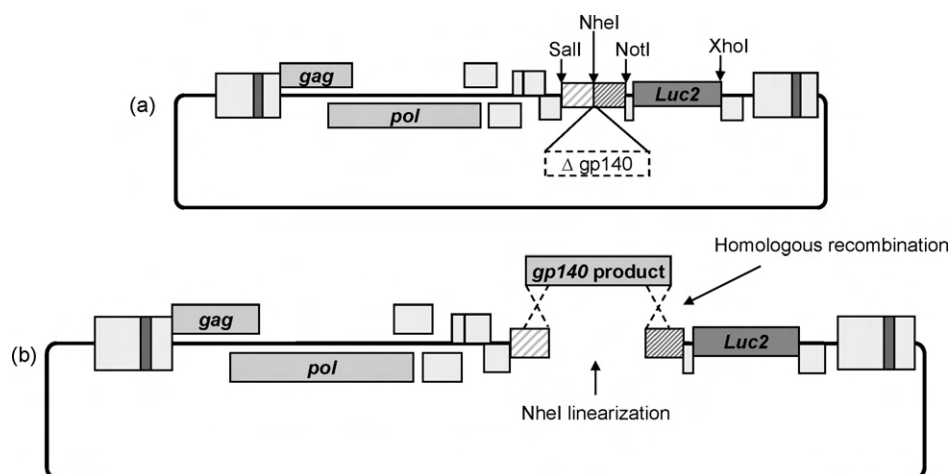
The chemokine receptors CCR5 and CXCR4 are the main coreceptors for the entry of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) into CD4-expressing cells.<sup>1–4</sup> The virus strains can be classified as R5, X4, or R5X4 variants according to their use of one or both coreceptors.<sup>5</sup> The determination of HIV-1 coreceptor usage is now of therapeutic interest since new drugs target cellular coreceptors. CCR5 antagonists can only be used to treat patients harboring R5 viruses. HIV-1 tropism must thus be assessed before treatment initiation.<sup>6</sup> Genotypic and phenotypic methods have been developed to assess HIV-1 coreceptor usage.

The major genotypic determinants for HIV-1 coreceptor usage lie in the third variable loop (V3) of the gp120 envelope glycoprotein. Algorithms have been developed to predict HIV-1 coreceptor usage from the amino-acid sequence of V3. Direct sequencing of

V3 is simple, fast, and cheap but is still somewhat more limited than the phenotypic assays. Additional variations in regions other than V3 of the envelope glycoprotein could also influence HIV-1 coreceptor usage.<sup>7–9</sup> Moreover, pure X4 and dual-mixed R5X4 viruses cannot be discriminated by the genotypic assays. Finally, direct sequencing detects only 10–20% of minor CXCR4-using variants in the quasispecies. By contrast, phenotypic assays assess the entire envelope glycoprotein, can discriminate between pure X4 and dual-mixed R5X4 viruses, and are more sensitive for detecting minor CXCR4-using variants than are the genotypic assays.

Recombinant virus phenotypic entry assays are based on RT-PCR amplification of the *env* gene from a plasma sample, the production of recombinant viruses expressing the challenged *env* gene, and infection of indicator cell lines bearing CD4 and either CCR5 or CXCR4 coreceptors. Clinical trials of CCR5 antagonists have relied on the phenotypic determination of HIV-1 tropism by a commercial assay (Trofile™ assay, Monogram Biosciences).<sup>10</sup> But technical and cost limitations have limited the development of recombinant virus phenotypic entry assays, so that limited data are available as to their concordance for determining HIV-1 coreceptor usage.<sup>11</sup> Lastly, no phenotypic assay has yet been developed to assess the

\* Corresponding author at: CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Laboratoire de Virologie, Toulouse, F-31300, France. Tel.: +33 5 67 69 04 24; fax: +33 5 67 69 04 25.  
E-mail address: [izopet.j@chu-toulouse.fr](mailto:izopet.j@chu-toulouse.fr) (J. Izopet).



**Fig. 1.** Construction of chimeric recombinant viruses. (a) pNL43-Δenv-Luc2 vector. (b) Homologous recombination between linearized vector and gp140 PCR product.

virus tropism from cell-associated HIV-1 DNA, even though many patients with undetectable viral load may require tropism characterization before being given CCR5 antagonists.

## 2. Objectives

We have developed a new recombinant virus phenotypic entry assay, the Toulouse Tropism Test (TTT), that can determine HIV-1 tropism using samples of either plasma or peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The objective of the study was to assess the capacity of this assay to determine the tropism of various HIV-1 subtypes, and to evaluate the correlation between the results obtained with the TTT assay and those obtained with the commercial Trofile<sup>TM</sup> assay.

## 3. Study design

### 3.1. Clinical specimens

Plasma and PBMCs samples of various HIV-1 subtypes were obtained from patients followed at the Department of Infectious Diseases of Toulouse University Hospital, France. The concordance between the TTT and the Trofile<sup>TM</sup> assays was assessed on 54 patients, of whom 30 were assessed with the standard version of the Trofile<sup>TM</sup> assay and 24 with the enhanced version (Monogram Biosciences).

### 3.2. Toulouse Tropism Test (TTT)

#### 3.2.1. Construction of the pNL43-Δenv-Luc2 vector

The provirus construct pNL-Luc-E<sup>-</sup> R<sup>+</sup><sup>12</sup> was deleted in the env gene of a fragment encompassing the gp120 and the ectodomain of gp41 between positions 6611 and 8262 (numbered according to GenBank AF324493). pNL-Luc-E<sup>-</sup> R<sup>+</sup> was deleted between the Sall restriction site at position 5785 and a NotI restriction site inserted in the nef gene at position 8796. A 5' Sall-NheI fragment (positions 5785–6611) and a 3' NheI-NotI fragment (positions 8262–8796) were obtained by PCR amplification and ligated at the NheI restriction site. The resulting Sall-NotI insert was cloned into the deleted pNL-Luc-E<sup>-</sup> R<sup>+</sup> backbone to create the pNL43-Δenv-Luc vector. This vector contained a single NheI restriction site at position 6612 for linearization. The final pNL43-Δenv-Luc2 vector was created by replacing the firefly luciferase reporter gene in the pNL43-Δenv-Luc vector by a codon-optimized gene (Luc2 gene from the pGL4.10 vector, Promega) into the nef gene of the pNL43-Δenv vector between NotI and XhoI restrictions sites at positions 8796 and 8887.

#### 3.2.2. PCR amplification of HIV-1 env

A fragment encompassing the gp120 and the ectodomain of gp41 was amplified by RT-PCR from HIV-1 RNA in the plasma or by PCR from HIV-1 DNA in PBMCs. The PCR products were then submitted to a nested PCR. PCR conditions and primers are given as [supplementary material](#). Two separate amplifications were performed in parallel from each sample and pooled to prevent sampling bias of the assessed virus population.

#### 3.2.3. Tropism characterization

293T cells were co-transfected using the calcium phosphate precipitation method with NheI-linearized pNL43-Δenv-Luc2 vector DNA and the env PCR product which encompassed the deleted region of the pNL43-Δenv-Luc2 vector, and carried short overlaps on each side that allowed homologous recombination (Fig. 1). The recombinant virus particles produced were used to infect in parallel U87 CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> cells, U87 CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> cells, and U87 CD4<sup>+</sup> cells. These reagents were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program.<sup>13</sup> The U87 CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> cell line was subcloned to obtain a new cell line that performed better for detecting minor CXCR4-using variants. The infection of indicator cell lines was assessed by measuring the luciferase activity (as relative light units; RLU) at 72 h post-infection. The CXCR4-tropic strain HXB2 and the CCR5-tropic strain BaL were used as controls in all experiments. The positivity cut-off was defined as >2 SD greater than the mean of the background of the indicator cell line, measured on negative controls in all experiments. The specificity of the positive signals was confirmed using the CXCR4 antagonist JM-2987 (hydrobromide salt of AMD-3100, 10 μM) and the CCR5 antagonists maraviroc (1 μM) and/or TAK-779 (10 μM). JM-2987 and TAK-779 were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program<sup>14,15</sup>; maraviroc was obtained from Pfizer. Inhibition by either drug was defined as a 100-fold decrease in RLU relative to the RLU measured in the absence of the drug. The turn around time for the phenotypic assay was 6 days after successful PCR amplification of HIV env. Concordant tropism results were obtained after duplicate testing for several samples with low viral loads (data not shown).

The Toulouse Tropism Test has been certified by the French Committee for Accreditation according to the ISO 15189 standard.

### 3.3. Trofile<sup>TM</sup> assay (Monogram Biosciences)

Two versions of the assay were used, the standard version of the Trofile<sup>TM</sup> assay<sup>16</sup> and the enhanced version of the Trofile<sup>TM</sup> assay (Trofile<sup>TM</sup> ES).<sup>17</sup>



**Table 1**  
Amplification of HIV-1 *env* by PCR from plasma samples for different HIV-1 subtypes.

HIV-1 subtype	No. of samples	No. of amplifications	% Success
A	16	13	81.3
B	240	236	98.3
C	60	56	93.3
D	10	9	90
F	2	2	100
G	7	5	71.4
CRF01	15	15	100
CRF02	78	64	82.1
CRF06, CRF07, CRF09, CRF14, CRF17	6	6	100

**Table 2**  
Sensitivity of the amplification of HIV-1 subtype B *env* by PCR according to plasma viral load.

HIV-1 RNA load (copies/mL)	No. of samples	No. of amplifications	% Success
40–500	4	4	100
500–1000	5	5	100
1000–10,000	51	50	98
>10,000	166	163	98.2

### 3.4. Statistical analysis

The kappa coefficient was measured using Stata SE 9.2 to evaluate the concordance between the TTT and Trofile™ assays.

## 4. Results

### 4.1. Performance of the PCR amplification of HIV-1 *env*

#### 4.1.1. Plasma samples

We studied the performance of HIV-1 *env* amplification from plasma samples for various subtypes and circulating recombinant forms (CRF) of HIV-1. The results of 434 PCR assays are summarized in Table 1. The amplification success rate was of >90% for most subtypes and CRF of HIV-1. Failure of amplification for B and non-B subtypes was not correlated to HIV-1 viral load. To the contrary, eight non-B subtypes were quantified lower than 500 copies/mL, and all of them were successfully amplified (data not shown). The sensitivity of the PCR amplification for a wide range of HIV-1 RNA loads was evaluated in 226 samples from patients infected by the subtype B; the overall amplification success rate was 98.2% (Table 2).

#### 4.1.2. PBMCs

We have also developed a PCR assay for use on cell-associated HIV-1 DNA. HIV-1 *env* DNA was amplified with a success rate of 90.3% (28/31 cell samples) for subtype B, and 71.5% for non-B subtypes (98/137 cell samples). The results are summarized in Table 3.

**Table 3**  
Amplification of HIV-1 *env* DNA by PCR from PBMCs for different HIV-1 subtypes.

HIV-1 subtype	No. of samples	No. of amplifications	% Success
A	22	16	72.7
B	31	28	90.3
D	6	6	100
F	9	8	88.9
G	11	10	90.9
CRF02	85	55	64.7
CRF06, CRF09, CRF27	4	3	75

**Table 4**  
Success rate of the TTT phenotypic assay for different HIV-1 subtypes.

HIV-1 subtype	No. of amplifications <sup>a</sup>	No. of phenotypes	% Success
A	29	28	96.6
B	264	260	98.5
C	56	56	100
D	15	15	100
F	10	10	100
G	15	13	86.7
CRF01	15	13	86.7
CRF02	119	112	94.1
Other CRF	9	9	100

<sup>a</sup>Amplification products from plasma samples and PBMCs were used to perform the phenotypic assay.

### 4.2. Performance of the TTT phenotypic assay

#### 4.2.1. Overall success rate of the phenotypic assay

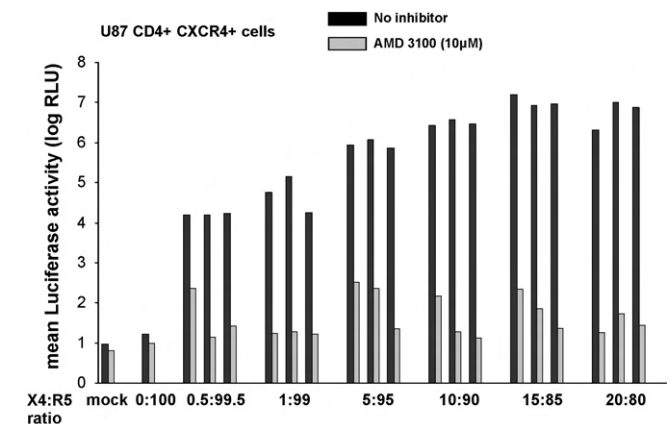
We assessed the capacity of the TTT phenotypic assay to determine the coreceptor usage of a given HIV-1 isolate using samples that had previously been amplified successfully. The overall success rate of the phenotypic assay was of 97% on a set of 532 PCR products (obtained from 406 plasma samples and 126 PBMCs). The phenotypic assay failed for 16 samples, probably because of inefficient homologous recombination between the patient *env* PCR product and the pNL43- $\Delta$ env-Luc2 vector. Our phenotypic assay performed well for the different subtypes and CRF of HIV-1 studied (Table 4).

#### 4.2.2. Reproducibility of the phenotypic assay

The reference strains HXB2 and BaL were repeatedly tested in 35 independent experiments. The BaL mean signal in U87 CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> cells was 7.47 log RLU, with a coefficient of variation (CV) of 6.2%. The HXB2 mean signal in U87 CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> cells was 7.33 log RLU, with a CV of 3.4% (see supplementary material).

#### 4.2.3. Sensitivity of the TTT phenotypic assay for detecting minor CXCR4-using variants

The ability of the TTT to detect minor CXCR4-using variants in a virus population was assessed in experiments on three independent mixtures of various X4/R5 DNA ratios. Minor X4 variants were detected when they represented 0.5% or more viruses (Fig. 2).



**Fig. 2.** Sensitivity of the recombinant virus phenotypic assay for detecting minor CXCR4-using variants in a virus population. Three independent experiments with various X4/R5 DNA ratios and the pNL43- $\Delta$ env-Luc2 vector were performed. Relative light units (RLU) on the U87 CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> cells were measured 72 h post-infection. The specificity of the luminescent signal was confirmed using the CXCR4 antagonist AMD-3100 (10  $\mu$ M). Minor X4 variants were always detected when present at 0.5% or higher.

**Table 5**  
Correlation between TTT phenotypic assay and Trofile assay.

		TTT		Concordance <sup>a</sup>
		R5	R5X4/X4	
Trofile™ <sup>b</sup>	R5	20	1	90%
	R5X4/X4	2	7	
Trofile™ ES <sup>b</sup>	R5	17	1	91.7%
	R5X4/X4	1	5	

<sup>a</sup> Concordance between TTT and Trofile™ was calculated as follows: number of samples with a concordant R5 phenotype with both assays plus number of samples with a concordant R5X4/X4 phenotype with both assays, the whole divided by the total number of tested samples.

<sup>b</sup> 30 samples have been tested with the standard Trofile™ assay and 24 samples with the enhanced Trofile™ (Trofile™ ES).

#### 4.3. Concordance between the TTT and the Trofile™ assays

Parallel, blinded assays were used to determine the concordance between the TTT and the Trofile™ assays. Among the 54 samples successfully characterized by both assays, 30 were tested with the standard Trofile™ assay and 24 with the enhanced version (Trofile™ ES). The overall concordance was 90% for the patients assessed with the standard Trofile™ assay, with a kappa coefficient of 0.77 ( $p < 0.0001$ ). The concordance was 91.7%, with a kappa coefficient of 0.78 ( $p < 0.001$ ) for those patients assessed with Trofile™ ES (Table 5).

## 5. Discussion

Recombinant virus phenotypic entry assays have been used in pivotal clinical trials assessing the efficacy of currently approved CCR5 antagonists. They are therefore a major tool for determining HIV-1 coreceptor usage. But few phenotypic assays are available for patients who are candidates for CCR5 antagonists, with limited data on their concordance. We have developed a new recombinant virus phenotypic entry assay, the Toulouse Tropism Test (TTT), to determine HIV-1 coreceptor usage of various subtypes of HIV-1 that is suitable for use with plasma or PBMCs samples. We have compared the performance of the TTT phenotypic assay with that of the Trofile™ assay for determining the tropism of 54 samples.

The performance of the TTT assay for amplifying the *env* gene PCR and determining the virus tropism was validated using 434 plasma and 168 cell samples with various viral loads and HIV-1 subtypes. The success rate of RNA amplification was >90% for most subtypes and CRF of HIV-1. PCR amplification from cell-associated HIV-1 DNA also performed well. But the success rate of HIV-1 DNA amplification from cell samples was lower than for HIV-1 RNA from plasma samples. This could be due to a lower input of HIV-1 copies in the PCR. The TTT assay successfully determined the tropism of 97% of the amplified samples. Performing phenotypic assay on DNA could be relevant for patients with therapeutic success for whom substitution or addition of a CCR5 antagonist in the regimen is considered.

The TTT assay detected minor CXCR4-using variants when they accounted for 0.5% in the virus population, which is close to the 0.3% sensitivity of the enhanced Trofile™ assay. Minor X4 variants could be selected by CCR5 antagonists leading to treatment failure.<sup>17</sup> However, the detection threshold of minor CXCR4-using variants which is clinically relevant remains to be defined. Case reports of treatment failure with CCR5 antagonists have pointed to the selection of minor CXCR4-using variants when they are present at <1% at baseline.<sup>18,19</sup> However, a recent study reported good virological responses to combined antiretroviral therapy containing CCR5 antagonist when CXCR4-using variants accounted for less than 10% of the virus population at baseline.<sup>20</sup> Prospective

studies with quantification of minor CXCR4-using variants before CCR5 antagonist usage will be necessary to determine the cut-off at which the clinical response is significantly impaired.

The commercial Trofile™ assay has been used in pivotal clinical trials of the CCR5 antagonists, maraviroc and vicriviroc. The TTT and the Trofile™ assays agreed on the predicted HIV-1 coreceptor usage in 90–91.7% of cases, depending on the version of the Trofile™ assay (standard or enhanced) used.

In summary, we have validated the capacity of the new TTT assay to determine HIV-1 coreceptor usage on a large set of samples. This is the first phenotypic assay that has been developed to characterize HIV-1 from either blood plasma or cell samples. Its capacity to determine HIV-1 coreceptor usage from plasma samples agrees well with that of the Trofile™ assay. We are now carrying out a large prospective study to compare the TTT and the Trofile™ assays in a study on the virological and clinical responses of patients treated with the CCR5 antagonist maraviroc.

## Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest.

## Acknowledgements

This study was supported by INSERM U563. The English text was checked by Dr Owen Parkes.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jcv.2009.11.018.

## References

- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996;**272**:1955–8.
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhardt M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996;**381**:661–6.
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996;**381**:667–73.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996;**272**:872–7.
- Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, et al. A new classification for HIV-1. *Nature* 1998;**391**:240.
- Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, et al. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;**49**:4721–32.
- Chesebro B, Wehrly K, Nishio J, Perryman S. Mapping of independent V3 envelope determinants of human immunodeficiency virus type 1 macrophage tropism and syncytium formation in lymphocytes. *J Virol* 1996;**70**:9055–9.
- Groenink M, Andeweg AC, Fouchier RA, Broersen S, van der Jagt RC, Schuitemaker H, et al. Phenotype-associated *env* gene variation among eight related human immunodeficiency virus type 1 clones: evidence for in vivo recombination and determinants of cytotropism outside the V3 domain. *J Virol* 1992;**66**:6175–80.
- Groenink M, Fouchier RA, Broersen S, Baker CH, Koot M, van't Wout AB, et al. Relation of phenotype evolution of HIV-1 to envelope V2 configuration. *Science* 1993;**260**:1513–6.
- Fatkenheuer G, Nelson M, Lazzarin A, Konourina I, Hoepelman AI, Lampiris H, et al. Subgroup analyses of maraviroc in previously treated R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2008;**359**:1442–55.
- Skrabal K, Low AJ, Dong W, Sing T, Cheung PK, Mammano F, et al. Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting: degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model. *J Clin Microbiol* 2007;**45**:279–84.
- Connor RI, Chen BK, Choe S, Landau NR. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* 1995;**206**:935–44.
- Bjorndal A, Deng H, Jansson M, Fiore JR, Colognesi C, Karlsson A, et al. Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol* 1997;**71**:7478–87.

14. Baba M, Nishimura O, Kanzaki N, Okamoto M, Sawada H, Iizawa Y, et al. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;**96**:5698–703.
15. Schols D, Struyf S, Van Damme J, Este JA, Henson G, De Clercq E. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J Exp Med* 1997;**186**:1383–8.
16. Whitcomb JM, Huang W, Fransen S, Limoli K, Toma J, Wrin T, et al. Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;**51**:566–75.
17. Trinh L, Han D, Huang W, Wrin T, Larson J, Kiss L, et al. Validation of an enhanced sensitivity Trofile™ HIV-1 co-receptor tropism assay for selecting patients for therapy with entry inhibitors targeting CCR5. In: *Ninth International Congress on Drug Therapy in HIV Infection*. 2008.
18. Archer J, Braverman MS, Taillon BE, Desany B, James I, Harrigan PR, et al. Detection of low-frequency pretherapy chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4)-using HIV-1 with ultra-deep pyrosequencing. *Aids* 2009;**23**:1209–18.
19. Tsibris AM, Korber B, Arnaout R, Russ C, Lo CC, Leitner T, et al. Quantitative deep sequencing reveals dynamic HIV-1 escape and large population shifts during CCR5 antagonist therapy in vivo. *PLoS One* 2009;**4**:e5683.
20. Swenson L, Dong W, Mo T, Woods C, Thielen A, Jensen M, et al. Quantification of HIV tropism by “Deep” Sequencing shows a broad distribution of prevalence of X4 variants in clinical samples that is associated with virological outcome. In: *16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. 2009.

## II Détermination génotypique du tropisme du HIV-1

### ARTICLE 2

« Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism. »

Raymond S., Delobel P., Mavigner M., Cazabat M., Souyris C., Sandres-Sauné K., Cuzin L., Marchou B., Massip P., and Izopet J.

**AIDS 2008 ;22 :F11-F16.**

Les tests de détermination phénotypique du tropisme par production de virus recombinants sont devenus une référence car ils ont été utilisés dans les essais thérapeutiques ayant permis le développement des antagonistes de CCR5. Les approches génotypiques présentent de nombreux avantages en pratique courante, car elles sont plus faciles à mettre en œuvre et moins onéreuses, mais elles doivent être validées dans des études de corrélation entre le génotype et le phénotype viral.

Les déterminants majeurs de l'utilisation des corécepteurs d'entrée par le HIV-1 ont été identifiés dans la région V3 de l'enveloppe. La présence d'acides aminés chargés positivement (R et K) en position 11 et/ou 25 ainsi qu'une charge nette élevée des acides aminés de la région V3 (calculée par l'addition des acides aminés chargés positivement et la soustraction de ceux chargés négativement) sont associés à l'utilisation de CXCR4 par le virus. Des algorithmes bioinformatiques ont été développés pour améliorer la prédiction de l'utilisation des corécepteurs d'entrée par le HIV-1, prenant en compte les acides aminés présents aux positions 11 et 25 mais aussi d'autres acides aminés de la région V3 associés à l'utilisation de l'un ou l'autre des corécepteurs d'entrée. Contrairement aux études ayant initialement rapporté un manque de sensibilité des approches génotypiques pour la détection des virus utilisant CXCR4, notre travail avait montré des performances globalement similaires entre les tests phénotypiques et génotypiques réalisés sur la population virale totale pour représenter correctement la composition clonale de cette population (Delobel *et al.*, J Clin Microbiol 2007).

Le tropisme du HIV-1 a été déterminé par les approches génotypique et phénotypique sur les échantillons plasmatiques d'une cohorte de patients en échec thérapeutique, candidats

potentiels à l'utilisation des antagonistes de CCR5. Le séquençage direct de la région V3 et la détermination phénotypique par production de virus recombinants ont été effectués en parallèle à partir du même produit de PCR. Les corrélations entre ces deux approches ont donc pu être ainsi analysées dans des conditions optimales.

La prédiction du génotype viral a été effectuée avec une règle simple combinant la règle 11/25 et la charge nette, ainsi qu'avec des algorithmes bioinformatiques disponibles sur Internet. La prévalence de l'infection par des virus utilisant CXCR4 pour l'entrée était de 26%. La règle combinée 11/25 et charge nette a montré une sensibilité de 77% et une spécificité de 96% pour la détection des virus utilisant CXCR4. L'algorithme Geno2pheno (avec un taux de faux positif de 10%) avait une sensibilité de 88% et une spécificité de 87%. L'algorithme PSSM avec la matrice SI/NSI avait une sensibilité de 77% et une spécificité de 94%.

La cohorte étudiée comportait 15% de patients infectés par des virus de sous-types non-B. Globalement, les performances de la règle combinée étaient similaires pour les virus de sous-types B et non-B dans cette étude. Cependant, le faible nombre d'échantillons HIV-1 non-B et la diversité des sous-types et des recombinants représentés n'ont pas permis d'étudier les performances des approches génotypiques pour la détermination du tropisme du HIV-1 de chaque sous-type. Au total, nous avons montré que le génotypage V3 interprété avec les algorithmes de prédiction de l'utilisation des corécepteurs d'entrée était une alternative à la détermination phénotypique du tropisme pour les virus HIV-1 de sous-type B mais que des études complémentaires spécifiques pour chaque sous-type étaient nécessaires.

# Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism

Stéphanie Raymond<sup>a,b,c</sup>, Pierre Delobel<sup>a,d</sup>, Maud Mavigner<sup>a</sup>,  
Michelle Cazabat<sup>a,c</sup>, Corinne Souyris<sup>a,c</sup>, Karine Sandres-Sauné<sup>a,b,c</sup>,  
Lise Cuzin<sup>d</sup>, Bruno Marchou<sup>b,d</sup>, Patrice Massip<sup>b,d</sup>  
and Jacques Izopet<sup>a,b,c</sup>

**Objective:** Replacing phenotypic assays with simple genotypic predictions of HIV-1 coreceptor usage would make the clinical use of CCR5 antagonists easier.

**Design:** Paired genotypic and phenotypic determination of HIV-1 coreceptor usage was performed to assess several genotypic approaches for detecting CXCR4-using and CCR5-using viruses in a clinical setting.

**Methods:** HIV-1 coreceptor usage was prospectively assessed using plasma samples from 103 patients who were candidates for treatment with a CCR5 antagonist. Direct sequencing of the V3 region and a sensitive recombinant virus phenotypic entry assay were performed in parallel for each patient from the same bulk *env* PCR product.

**Results:** The 103 patients had a median CD4+ T lymphocyte count of  $268 \times 10^6$  cells/l and nadirs of  $98 \times 10^6$  cells/l. Paired genotypic and phenotypic data were obtained for 98 of the 103 patients. For detecting CXCR4-using viruses, the genotypic rule based on amino-acid residues at positions 11/25 and the overall net charge of V3 was 77% sensitive and 96% specific. The Geno2pheno bioinformatic tool was 88% sensitive and 87% specific. The WebPSSM tool prediction with the SI/NSI matrix was 77% sensitive and 94% specific. The global concordance between genotypic and phenotypic data was 91% with the rule combining the amino-acid residues at positions 11/25 and V3 net charge.

**Conclusion:** Genotypic predictions performed well in paired genotypic and phenotypic assessment of HIV-1 coreceptor usage. Multicenter studies analyzing the correlations between the genotypic determination of HIV-1 tropism and clinical response to CCR5 antagonists are needed to validate this approach in clinical practice.

© 2008 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

*AIDS* 2008, **22**:F11–F16

**Keywords:** CCR5, CXCR4, genotype, HIV envelope protein gp120, HIV, phenotype, receptors, V3

---

<sup>a</sup>INSERM, U563, <sup>b</sup>Université Toulouse III Paul-Sabatier, Faculté de Médecine Toulouse-Purpan, <sup>c</sup>CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Laboratoire de Virologie, and <sup>d</sup>CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Toulouse, France.

Correspondence to J. Izopet, INSERM, U563, Toulouse, F-31300 France.

Tel: +33 5 67 69 04 24; fax: +33 5 67 69 04 25; e-mail: izopet.j@chu-toulouse.fr

Received: 23 January 2008; revised: 6 May 2008; accepted: 30 June 2008.

DOI:10.1097/QAD.0b013e32830ebcd4

## Introduction

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) enters CD4-expressing cells using one or both of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4. CCR5-using virus clones are classified as R5 variants, CXCR4-using virus clones are classified as X4 variants, and virus clones that use both coreceptors are classified as R5X4 dualtropic variants [1]. The use of both coreceptors by a virus population may be due to the presence of either R5X4 dualtropic clones or to a mixture of pure R5 and X4 virus clones (dual/mixed R5X4 phenotype) or both.

The determination of HIV-1 tropism is now of therapeutic interest because the coreceptors are new targets for drugs that block HIV-1 entry. CCR5 antagonists are presently used in clinical practice but they can only be used to treat patients harboring R5 viruses [2]. Thus HIV-1 tropism must be assessed in patients who are candidates for CCR5 antagonists. Recombinant virus phenotypic entry assays are now considered to be the gold-standard method for determining HIV-1 coreceptor usage [3]. However, their routine use is hampered by technical and cost limitations. Genotypic approaches have great potential, as they could be easier, faster, and cheaper than phenotypic assays for routinely assessing HIV-1 tropism. However, good genotype-phenotype correlations are required before they can be used.

Most genotypic determinants of HIV-1 coreceptor usage have been identified in the V3 region of *env* [4]. The presence of basic residues at V3 positions either 11 or 25 or both and an increased electrostatic net charge of V3 have been associated with CXCR4 usage [5,6]. Bioinformatic algorithms have been developed to improve the prediction of HIV-1 tropism from the V3 sequence, taking into account the key amino-acids at positions 11 and 25, plus other sites in V3 that differ between CCR5-using and CXCR4-using strains [7].

It has been reported that genotypic approaches lack sensitivity for predicting CXCR4 usage, and are thus not likely to replace the phenotypic assays [8]. However, we found excellent correlations between the V3 genotype and the phenotype in a set of 118 molecular clones [9]. We also showed that genotypes and phenotypes of bulk samples correlated well with the clonal composition of the virus quasispecies. These encouraging results for the genotypic prediction of HIV-1 tropism are in apparent contradiction with the reported lack of sensitivity of the genotype. There is thus an urgent need to compare the performances of genotypic and phenotypic methods for the routine assessment of HIV-1 tropism.

We have therefore assessed HIV-1 coreceptor usage both genotypically and phenotypically using plasma samples

from a new cohort of 103 patients who were candidates for treatment with a CCR5 antagonist. We used the matched genotypic V3 data and phenotypic results to study the performance of genotypic approaches for predicting HIV-1 tropism in this clinical setting.

## Methods

### Study subjects and samples

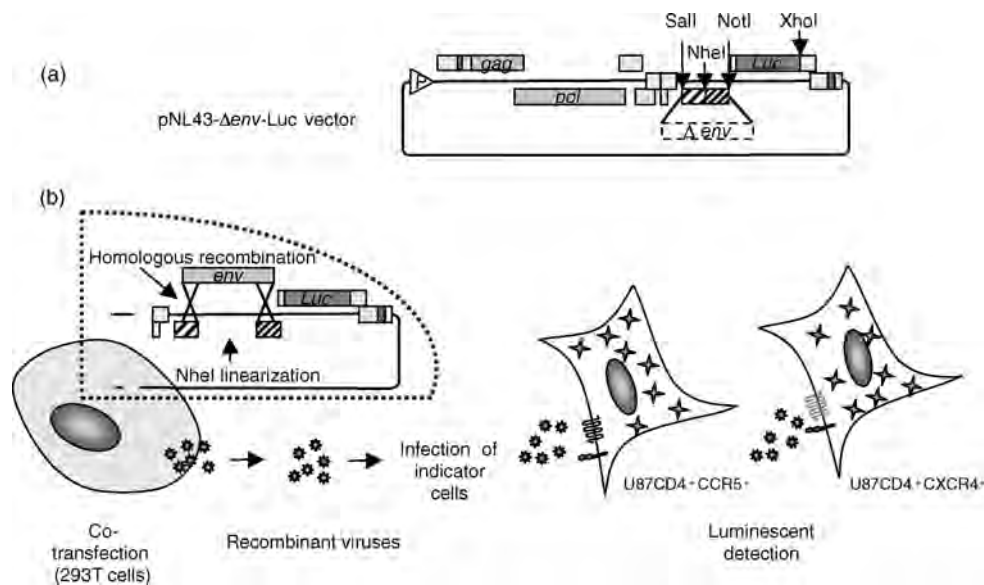
We prospectively studied 103 HIV-1 infected patients for whom therapy had failed, as defined by a plasma HIV-1 RNA of at least 400 copies/ml and the presence of drug-resistance mutations for the three classes of NRTIs, NNRTIs, and protease inhibitors [10]. These patients were recruited at the Department of Infectious Diseases of Toulouse University Hospital, France, and were distinct from the patients previously described [9]. HIV-1 RNA was isolated and purified from 1 ml plasma samples using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen).

### Phenotypic characterization of HIV-1 coreceptor usage

*PCR amplification of an HIV-1 env fragment encompassing the gp120 and the ectodomain of gp41*  
Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and nested PCR were used to amplify the gp120 and the gp41 ectodomain. The RT-PCR was performed with the SuperScript III One-Step RT-PCR System (Invitrogen), with the following conditions: 60 min at 56°C; 2 min at 94°C; 30 s at 94°C, 30 s at 58°C, and 4 min at 68°C for 50 cycles. The nested PCR was performed with the Expand High Fidelity Plus PCR System (Roche), with the following conditions: 2 min at 94°C; 30 s at 94°C, 30 s at 60°C, and 3 min 30 s at 72°C for 35 cycles. The outer primer pair was 5'-GGCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG-3' and 5'-GGTCTTAAAGGTACCTGAGGTCTGACTGGA-3'. The inner primer pair was 5'-CCACCACTCTATTTTGTGCATCA-3' and 5'-GGTGGTAGCTGAAGAGGCACAGG-3' [11].

### Vector construction

HIV-1 pNL4-3 (GenBank AF324493) was deleted between positions 6611 and 8257 to create the pNL43- $\Delta env$  vector. Briefly, pNL4-3 was deleted between the Sall (position 5785) and NotI (position 8796) restriction sites. A 5' Sall-NheI fragment (positions 5785-6611) and a 3' NheI-NotI fragment (positions 8257-8796) were obtained by PCR amplification and joined. The resulting Sall-NotI insert was cloned in the deleted pNL4-3 backbone to create the pNL43- $\Delta env$  vector. This vector contained a single NheI restriction site at position 6611 for linearization. The Firefly luciferase reporter gene was inserted into the *nef* gene of the pNL43- $\Delta env$  vector between the NotI (position 8796 of



**Fig. 1. Phenotypic characterization of HIV-1 coreceptor usage with our recombinant virus assay.** (a) pNL43- $\Delta$ env-Luc vector. (b) Diagram outlining the assay.

pNL4-3) and XhoI (position 8887 of pNL4-3) restriction sites to create the final pNL43- $\Delta$ env-Luc vector (Fig. 1a).

#### Recombinant virus phenotypic assay

The phenotype of HIV-1 coreceptor usage was determined using a single-cycle recombinant virus entry assay. 293T cells were cotransfected using the calcium phosphate precipitation method with NheI-linearized pNL43- $\Delta$ env-Luc vector DNA and an *env* PCR product that encompassed the deleted region of the pNL43- $\Delta$ env-Luc vector, and carried short overlaps on each side that allow homologous recombination with the vector (Fig. 1b). The chimeric recombinant virus particles released into the supernatant were used to infect indicator cells bearing CD4 and CCR5 (U87.CD4.CCR5 cells) or CD4 and CXCR4 (U87.CD4.CXCR4 cells) (these reagents were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, from Dr. HongKui Deng and Dr Dan R. Littman). The ability of chimeric recombinant viruses to enter and complete a single round of replication in target cells was assessed by measuring the luciferase activity in lysed cells (as relative light units; RLU). The tested virus used either CCR5 or CXCR4 or both coreceptors if the luciferase activity was above a cutoff, defined as greater than 3 SD above the mean of the background of the indicator cell line. Recombinant viruses with known coreceptor usage (CXCR4-tropic HXB2 and CCR5-tropic BaL) were used as controls in all experiments. The specificity of low-level positive luminescent signals (defined as a RLU 1- to 10-fold the cut off value) was confirmed using coreceptor antagonists. JM-2987 (hydrobromide salt of AMD-3100) was used to block CXCR4-mediated entry and TAK-779 to block CCR5-mediated entry (these reagents were obtained through the

NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH) [12,13]. The inhibition studies used AMD3100 (0.1, 0.3, and 1  $\mu$ mol/l) and TAK779 (0.3, 1, and 3  $\mu$ mol/l). Inhibition by either drug was defined as a 10-fold decrease in RLU relative to the RLU measured in the absence of the drug. The ability of the assay to detect the presence of minor X4 variants in a virus population was assessed in three independent mixture experiments with X4/R5 DNA ratios of 0:100; 5:95; 10:90; 15:85; 20:80; 25:75; and 50:50.

#### Genotypic prediction of HIV-1 coreceptor usage

The V3 region was directly sequenced from bulk *env* PCR products in both directions by the dideoxy chain termination method (BigDye Terminator v.3.1) on an ABI 3130 DNA sequencer (Applied Biosystems). Two primer pairs were used for V3 sequencing. The first primer pair was 5'-ACAATGYACACATGGAATTARGCCA-3' and 5'-AGAAAAATTCYCCTCYACAAT TAAA-3', and the alternative primer pair was 5'-CTGT TAAATGGCAGTCTAGC-3' and 5'-GTGATGTATT RCARTAGAAAAATTC-3'. The results were analyzed with Sequencher (Genecodes), blinded to the phenotype. Minority species were detected when the sequencer electrophoregram showed a second base peak.

We used a combination of criteria from the 11/25 and net charge rules to predict HIV-1 tropism from the V3 genotype [5,6,9]. One of the following criteria is required for predicting CXCR4 coreceptor usage: either 11R/K or 25K or both; 25R and a net charge of at least +5; a net charge of at least +6. The V3 net charge was calculated by subtracting the number of negatively charged amino acids (D and E) from the number of positively charged ones (K and R). All possible permutations were assessed when



amino-acid mixtures were found at some codons of V3. The combination resulting in the highest net charge was used to predict the tropism. We then compared the performances of these combined criteria for detecting CXCR4-using viruses with that of the 11/25 rule alone, and that of the bioinformatic tools Geno2pheno (false positive rate 10%) and WebPSSM (with both the X4/R5 and the SI/NSI matrices), available at: <http://coreceptor.bioinf.mpi-sb.mpg.de/cgi-bin/coreceptor.pl> and: <http://ubik.microbiol.washington.edu/computing/pssm/> (December 2007), respectively.

## Results

### Patient characteristics

The HIV-1 coreceptor usage of 103 patients with persistent viremia despite HAART who harbored viruses with triple-class drug resistance mutations, were studied, as these patients could be candidates for treatment with CCR5 inhibitors. Clinical characteristics of the patients and virological and immunological data are shown in Table 1. Eighty-five percent of the patients harbored subtype B HIV-1. The remaining 15% patients harbored A1, F1, G, J, CRF-01, CRF-02, and CRF-06 subtypes of HIV-1.

### Phenotypic characterization of HIV-1 coreceptor usage

The sensitivity of our phenotypic assay has been assessed in mixtures experiments with various X4/R5 proportions. Minor X4 variants were always detectable when present at a frequency of 10% or higher, and in two of three experiments when present at a frequency of 5% (data not shown). The *env* region of HIV-1 was

successfully amplified from the plasma of all but one of the 103 patients studied. The phenotype of coreceptor-mediated entry was then successfully determined for 100 of these 102 patients; it revealed 74 virus populations with an R5 phenotype, 19 virus populations with a dual/mixed R5X4 phenotype, and seven virus populations with an X4 phenotype. Of these 100 samples, 89 gave high positive luminescent signals (RLU more than 10-fold the cut off value), and 11 gave low positive luminescent signals (RLU 1- to 10-fold the cut off value) on one or both indicator cell lines. The CCR5 and CXCR4 antagonists, TAK779, and AMD3100, confirmed the specificity of the low positive signals from these 11 samples.

### Genotypic prediction of HIV-1 coreceptor usage based on combined criteria from the 11/25 and net charge rules

The V3 genotype was obtained by direct sequencing from bulk *env* PCR products from 100 of the 102 patients. The V3 genotype from the remaining two patients could not be analyzed because of overlapping peaks on the sequencer electrophoregrams. Both genotypic V3 data and phenotypic results were obtained for 98 patients and these were used to study the capacity of the genotype to predict HIV-1 tropism. The combined criteria from the 11/25 and net charge rules were used to classify 75 virus populations as R5 and 23 as X4 (Table 2). Because it is impossible to discriminate between pure X4 and R5X4 dualtropic viruses by genotypic approaches, they were both genotypically classified as CXCR4-using viruses. The combined criteria from the 11/25 and net charge rules detected CXCR4-using viruses with a sensitivity of 77% and a specificity of 96% (Table 3).

**Table 1. Characteristics of the 103 studied patients.**

Age (years)	
Median	44
Interquartile range	39–51
Male sex, number (%)	82 (80)
CDC stage, number (%)	
A	35 (42)
B	18 (21)
C	31 (37)
HIV-1 subtype, number (%)	
B	87 (85)
Non B	16 (15)
HIV-1 RNA load (log copies/ml)	
Median	4.27
Interquartile range	3.65–4.98
Duration of infection (years)	
Median	15
Interquartile range	12.75–17.25
CD4 cell count ( $\times 10^6$ cells/l)	
Median	268
Interquartile range	107–402
CD4 cell count (%)	
Median	16
Interquartile range	9.93–21
Nadir CD4 cell count ( $\times 10^6$ cells/l)	
Median	98
Interquartile range	34–177

### Genotypic prediction of HIV-1 coreceptor usage based on the 11/25 rule and the bioinformatic tools Geno2pheno and WebPSSM

The genotypic classification based on the 11/25 rule and the Geno2pheno and WebPSSM tools are compared with

**Table 2. Comparison of genotypic prediction of HIV tropism and the observed phenotype.**

Genotype		Phenotype	
		R5	R5X4/X4
Combined 11/25 and net charge rules	R5	69	6
	X4	3	20
11/25 rule	R5	68	9
	X4	4	17
Geno2pheno	R5	63	3
	X4	9	23
PSSM <sub>X4/R5</sub>	R5	70	8
	X4	2	18
PSSM <sub>SI/NSI</sub>	R5	68	6
	X4	4	20

**Table 3. Performances of the V3 genotype for predicting CXCR4 usage.**

Genotypic algorithm	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Combined 11/25 and net charge rules	77 [56–91]	96 [88–99]	87 [66–97]	92 [83–97]
11/25 rule	65 [44–83]	94 [86–98]	81 [58–95]	88 [79–94]
Geno2pheno	88 [70–98]	87 [78–94]	72 [53–86]	95 [87–99]
PSSM <sub>X4/R5</sub>	69 [48–86]	97 [90–100]	90 [68–99]	90 [81–95]
PSSM <sub>SI/NSI</sub>	77 [56–91]	94 [86–98]	83 [63–95]	92 [83–97]

Values within brackets indicate 95% confidence interval. NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

the observed phenotype in Table 2. The 11/25 rule detected CXCR4-using viruses with a sensitivity of 65% and a specificity of 94%. Geno2pheno was the most sensitive (88%), but was less specific (87%). PSSM<sub>X4/R5</sub> was less sensitive (69%) than PSSM<sub>SI/NSI</sub> (77%), both were highly specific (97 and 94%, respectively) (Table 3).

## Discussion

CCR5 antagonists are new drugs for treating HIV-infected patients, but they can only be used to treat patients harboring R5 viruses. Hence, efficient, affordable methods for routinely characterizing and monitoring HIV-1 tropism are needed. Replacing the complicated phenotypic assays with simple genotypic predictions of HIV-1 tropism could therefore be most important for clinical practice. However, genotypic assays must be based on strong, clear correlations between the genotype and the phenotype.

The study of the genotype–phenotype correlations in a population is complicated by the presence of minor species. Our recent work on clones showed excellent correlations between genotypes and phenotypes in a set of 118 V1–V3 molecular clones. The sensitivity of the V3 genotype for detecting CXCR4-using viruses at a clonal level was 94%, much better than previously reported. The study of bulk samples from 26 patient shows that population-based genotypic and phenotypic approaches correlated well with clonal analyses [9].

The results of the present study on an independent cohort of 103 patients confirm our previous findings. We used an improved single-cycle recombinant virus phenotypic assay that combines the simplicity of homologous recombination between an *env* PCR product and the pNL43- $\Delta env$  vector and the enhanced sensitivity of bioluminescent detection. Our phenotypic assay can detect minor X4 variants when present at a frequency of 5–10%, a sensitivity similar to that of the ‘Trofile’ assay [3]. Phenotypic results were obtained for 100 (97%) of the 103 patients tested. This success rate is better than that reported for the ‘Trofile’ assay (84.9%), and similar to that of the ‘Tropism Recombinant Test (TRT)’ assay (96.8%) [14].

Only 25% of the patients studied here harbored R5X4 or X4 viruses, compared with a frequency of 40–50% in

previous studies of treatment-experienced patients [15,16]. This lower frequency of CXCR4-using viruses in our study is probably due to the higher CD4+ T-cell count and nadir of the patients studied. We also found R5X4/X4 viruses in 60% of patients with low nadir of CD4+ T cells and poor immunological response to HAART [17].

The genotypic approaches performed well in paired genotypic and phenotypic evaluation of HIV-1 coreceptor usage in 98 patients, with a global concordance of 88–91% between the genotype and the phenotype. The CXCR4-using viruses were detected by the combined criteria from the 11/25 and net charge rules with a sensitivity of 77% and a specificity of 96%. The bioinformatic tools Geno2pheno and WebPSSM also performed well. WebPSSM can use an X4/R5 or an SI/NSI matrix. Both are contributory because there is no absolute concordance between the X4 and SI phenotypes. The performances of the SI/NSI matrix seem to be slightly better than those of the X4/R5 matrix for predicting HIV-1 tropism. The genotypic algorithms have mostly been developed for viruses of clade B. Only 15% of our patients harbored viruses of non-B subtypes, and we found the same genotype–phenotype concordance among viruses of clade B (76/84) or non-B (13/14). A recent study on a data set of 115 non-B subtypes and 35 B subtypes viruses found that the bioinformatics tools were less sensitive for detecting CXCR4-using viruses in non-B than in B viruses [18]. There were not enough patients with non-B viruses in our study for us to address this issue. Studies analyzing genotype–phenotype correlations for each non-B subtype are needed to assess and improve the genotypic predictions.

Sensitivities of only 22–50% for predicting CXCR4 usage have previously been reported for both the 11/25 rule and for bioinformatic tools like Geno2pheno and WebPSSM [8]. The poor genotype–phenotype correlations could be due to a certain degree of heterogeneity in the paired genotypic and phenotypic data used. Differences between the assays or PCR amplification bias between the products used for the phenotypic assay and the V3 genotype could explain some of the discrepancies.

The high genotype–phenotype concordance found in our 98 patients could be due to the homogeneous

assessment of HIV-1 tropism using single phenotypic and genotypic assays, performed in parallel for each patient from the same bulk *env* PCR products. This prevents sampling bias of the virus population between the genotypic and phenotypic assays. Degenerate primers were used for V3 sequencing to take into account the diversity of the virus quasispecies. Careful attention should be paid to minor species when analyzing the bulk V3 genotypes, as previously shown by comparison with clonal analyses [9]. Two recent studies also found that different bioinformatic algorithms based on the V3 genotype provided 70–86% concordance with the results of the ‘Trofile’ and ‘TRT’ phenotypic assays, in agreement with our results [14,19].

Thus, direct V3 sequencing could represent an alternative to phenotypic assays for assessing HIV-1 tropism. Multicenter studies analyzing the correlations between the genotypic determination of HIV-1 tropism and clinical response to CCR5 antagonists are needed to validate this approach in clinical practice.

## Acknowledgement

Author contributions: S.R., P.D., and J.I. designed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript. M.C. and C.S. performed the experiments. M.M., L.C., B.M., and P.M. contributed substantially to study conception and provided clinical samples. K.S.-S. performed statistical analysis.

Financial support: INSERM U563.

## References

- Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, *et al.* **A new classification for HIV-1.** *Nature* 1998; **391**:240.
- Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, *et al.* **Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**:4721–4732.
- Whitcomb JM, Huang W, Fransen S, Limoli K, Toma J, Wrin T, *et al.* **Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**:566–575.
- Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR. **Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1.** *Science* 1991; **253**:71–74.
- Fouchier RA, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Goudsmit J. **Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule.** *J Virol* 1992; **66**:3183–3187.
- De Jong JJ, De Ronde A, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J. **Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution.** *J Virol* 1992; **66**:6777–6780.
- Jensen MA, Li FS, van 't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, *et al.* **Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences.** *J Virol* 2003; **77**:13376–13388.
- Low AJ, Dong W, Chan D, Sing T, Swanstrom R, Jensen M, *et al.* **Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4 co-receptor usage in clinical isolates.** *AIDS* 2007; **21**:F17–F24.
- Delobel P, Nugeyre MT, Cazabat M, Pasquier C, Marchou B, Massip P, *et al.* **Population-based sequencing of the V3 region of env for predicting the coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies.** *J Clin Microbiol* 2007; **45**:1572–1580.
- Costagliola D, Descamps D, Assoumou L, Morand-Joubert L, Marcelin AG, Brodard V, *et al.* **Prevalence of HIV-1 drug resistance in treated patients: a French nationwide study.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; **46**:12–18.
- Labrosse B, Morand-Joubert L, Goubar A, Rochas S, Labernardiere JL, Pacanowski J, *et al.* **Role of the envelope genetic context in the development of enfuvirtide resistance in human immunodeficiency virus type 1-infected patients.** *J Virol* 2006; **80**:8807–8819.
- Schols D, Struyf S, Van Damme J, Este JA, Henson G, De Clercq E. **Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4.** *J Exp Med* 1997; **186**:1383–1388.
- Baba M, Nishimura O, Kanzaki N, Okamoto M, Sawada H, Iizawa Y, *et al.* **A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**:5698–5703.
- Poveda E, Briz V, Roulet V, Del Mar Gonzalez M, Faudon JL, Skrabal K, Soriano V. **Correlation between a phenotypic assay and three bioinformatic tools for determining HIV co-receptor use.** *AIDS* 2007; **21**:1487–1490.
- Gulick RM, Su Z, Flexner C, Hughes MD, Skolnik PR, Wilkin TJ, *et al.* **Phase 2 study of the safety and efficacy of vicriviroc, a CCR5 inhibitor, in HIV-1-Infected, treatment-experienced patients: AIDS clinical trials group 5211.** *J Infect Dis* 2007; **196**:304–312.
- Melby T, Despirito M, Demasi R, Heilek-Snyder G, Greenberg ML, Graham N. **HIV-1 coreceptor use in triple-class treatment-experienced patients: baseline prevalence, correlates, and relationship to enfuvirtide response.** *J Infect Dis* 2006; **194**:238–246.
- Delobel P, Nugeyre MT, Cazabat M, Sandres-Saune K, Pasquier C, Cuzin L, *et al.* **Naive T-cell depletion related to infection by X4 human immunodeficiency virus type 1 in poor immunological responders to highly active antiretroviral therapy.** *J Virol* 2006; **80**:10229–10236.
- Garrido C, Roulet V, Chueca N, Poveda E, Aguilera A, Skrabal K, *et al.* **Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different human immunodeficiency virus type 1 subtypes.** *J Clin Microbiol* 2008; **46**:887–891.
- Poveda E, Briz V, de Mendoza C, Benito JM, Corral A, Zahonero N, *et al.* **Prevalence of X4 tropic HIV-1 variants in patients with differences in disease stage and exposure to antiretroviral therapy.** *J Med Virol* 2007; **79**:1040–1046.

### ARTICLE 3

« Genotypic prediction of Human Immunodeficiency Virus Type 1 CRF02-AG Tropism »

Raymond S., Delobel P., Mavigner M., Cazabat M., Souyris C., Encinas E., Sandres-Sauné K., Pasquier C., Marchou B., Massip P., and Izopet J.

**Journal of Clinical Microbiology** 2009 ;47 :2292-94.

Ayant montré précédemment que les approches génotypiques fondées sur l'analyse de la séquence V3 du gène de l'enveloppe permettaient de prédire le phénotype d'entrée du sous-type B du HIV-1, l'étude des déterminants génotypiques propres à chacun des sous-types non-B nous a paru indispensable.

Le sous-type recombinant CRF02-AG est prédominant en Afrique de l'Ouest et représente une part croissante des infections à HIV-1 en Europe de l'Ouest, notamment en France. La fréquence des virus CRF02-AG utilisant CXCR4 pour l'entrée varie selon les études, mais les déterminants génotypiques du tropisme sont méconnus pour ce sous-type. Nous avons donc caractérisé le tropisme du HIV-1 par des approches génotypiques et phénotypiques chez 52 patients infectés par des virus de sous-type CRF02-AG. Tous les échantillons ont été amplifiés avec succès et la prévalence des virus utilisant CXCR4 était de 19% avec le test phénotypique TTT, mais aucun virus n'était X4 pur. Le génotype viral a été déterminé par séquençage direct de la région V3 de l'enveloppe et l'application d'algorithmes validés pour les virus de sous-type B. La règle génotypique simple combinant les critères 11/25 et charge nette de la région V3 présentait une sensibilité de 70% et une spécificité de 98% pour la prédiction de l'utilisation de CXCR4 pour l'entrée. L'algorithme Geno2pheno au seuil de 10% de faux positifs n'avait une sensibilité que de 40% et une spécificité de 90% pour la prédiction des virus utilisant CXCR4. Les deux versions de l'algorithme PSSM, X4/R5 et SI/NSI présentaient une sensibilité similaire à celle de la règle combinée et une bonne spécificité. La concordance de PSSM SI/NSI avec le phénotype était meilleure que celle de PSSM X4/R5.

Les algorithmes de prédiction génotypique du tropisme ont donc montré des performances inégales pour prédire l'utilisation des corécepteurs d'entrée par le HIV-1 CRF02-AG. Il apparaît pourtant que des algorithmes comme la règle combinée et PSSM SI/NSI donnent des résultats concordants avec les résultats du test phénotypique. Le tropisme

du HIV-1 CRF02-AG pourrait donc être déterminé par des tests génotypiques en pratique clinique, notamment pour l'administration des antagonistes de CCR5. Des études complémentaires sont nécessaires afin d'évaluer la réponse virologique au traitement comportant un antagoniste de CCR5 chez les patients infectés par un CRF02-AG.

# Genotypic Prediction of Human Immunodeficiency Virus Type 1 CRF02-AG Tropism<sup>∇</sup>

Stéphanie Raymond,<sup>1,2,3</sup> Pierre Delobel,<sup>1,4</sup> Maud Mavigner,<sup>1</sup> Michelle Cazabat,<sup>1,3</sup> Corinne Souyris,<sup>1,3</sup> Stéphanie Encinas,<sup>1,3</sup> Karine Sandres-Sauné,<sup>1,2,3</sup> Christophe Pasquier,<sup>1,2,3</sup> Bruno Marchou,<sup>2,4</sup> Patrice Massip,<sup>2,4</sup> and Jacques Izopet<sup>1,2,3\*</sup>

INSERM, U563, Toulouse F-31300, France<sup>1</sup>; Université Toulouse III Paul-Sabatier, Faculté de Médecine Toulouse-Purpan, Toulouse F-31300, France<sup>2</sup>; CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Laboratoire de Virologie, Toulouse F-31300, France<sup>3</sup>; and CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Toulouse F-31300, France<sup>4</sup>

Received 19 December 2008/Returned for modification 5 March 2009/Accepted 6 May 2009

**We assessed the performance of genotypic algorithms for predicting the tropism of human immunodeficiency virus type 1 coreceptor usage in 52 patients infected with the CRF02-AG subtype. The combined criteria of the 11/25 and net charge rules accurately detected CXCR4-using CRF02-AG viruses, whereas the Geno2pheno tool lacked sensitivity and the position-specific scoring matrix (PSSM) tool WebPSSM lacked specificity.**

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) enters target cells through the sequential binding of the envelope glycoprotein (gp120) to CD4 and a chemokine receptor, CCR5 or CXCR4 (1). HIV-1 coreceptor usage must be identified before treatment with CCR5 antagonists, as they can only be used for patients harboring R5 viruses alone (7). The “gold standard” for characterization of HIV-1 tropism is a recombinant virus phenotypic entry assay, but genotypic methods based on the V3 sequence could be easier. We have previously shown that the V3 genotype accurately predicts the phenotype of HIV-1 coreceptor usage for subtype B viruses (5, 13). However, the V3-based genotypic algorithms could be unsuitable for predicting the tropism of non-B viruses because they were built using data sets of genotype-phenotype correlations from subtype B viruses (9). Indeed, the Geno2pheno and WebPSSM algorithms were not designed to be predictive for non-B viruses, except for a recent version of the position-specific scoring matrix (PSSM) designed for subtype C viruses (11, 12). It is thus necessary to study subtype-specific genotypic determinants of HIV-1 tropism. The CRF02-AG recombinant subtype predominates in West Africa (10) and accounts for an increasing proportion of cases in Western Europe, notably in France (6, 14). Various proportions of CXCR4-using viruses have been reported in subtype CRF02-AG-infected patients (2, 15, 16), but little is known about the genotypic determinants of HIV-1 tropism for subtype CRF02-AG viruses. Genotype-phenotype correlation studies are thus needed before genotypic algorithms can be used to predict the tropism of this particular HIV-1 subtype.

We characterized both genotypically and phenotypically the tropism of 52 HIV-1 CRF02-AG-infected individuals, recruited at the Department of Infectious Diseases of Toulouse University Hospital, France. These patients had a median plasma HIV-1 RNA load of 4.95 log copies/ml (interquartile

range, 4.18 to 5.34), and a median CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte count of 210 cells/mm<sup>3</sup> (interquartile range, 115 to 391). All viruses were identified as the HIV-1 CRF02-AG subtype by *pol* and *env* sequence analysis using the HIVseq program (<http://hivdb.stanford.edu/>) and the NCBI genotyping tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>). We confirmed that these viruses belonged to the CRF02-AG subtype by neighbor-joining phylogenetic analysis of the sequences studied here, together with HIV-1 subtype reference sequences from the Los Alamos National Laboratory (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>).

A region spanning gp120 and the ectodomain of the gp41 *env* gene of plasma HIV-1 RNA was amplified by reverse transcription-PCR. Two separate PCR amplifications were performed in parallel for each patient and pooled to prevent sampling bias of the assessed virus population. The V3 region from the *env* PCR product was bulk sequenced, blinded to the phenotype, as previously described (13). Bulk sequencing allows the detection of minor variants when present at a frequency of at least 20% in the viral population. The phenotype of HIV-1 coreceptor usage was determined using a recombinant virus entry assay (13). The sensitivity of the assay has been enhanced to detect minor amounts of CXCR4-using virus when they accounted for 0.5 to 1% of the virus population (data not shown).

We used a genotypic rule based on amino acid residues at positions 11 and 25 and the overall net charge of V3 to predict HIV-1 tropism from the V3 genotype (3, 4, 8). One of the following criteria is required for predicting CXCR4 coreceptor usage: (i) R or K at position 11 of V3 and/or K at position 25, (ii) R at position 25 of V3 and a net charge of  $\geq +5$ , or (iii) a net charge of  $\geq +6$  (13). The V3 net charge was calculated by subtracting the number of negatively charged amino acids (D and E) from the number of positively charged ones (K and R). We have previously shown that these combined criteria are better for predicting HIV-1 coreceptor usage of subtype B viruses than the 11/25 and net charge rules used separately (5, 13). We have now assessed the performance of these combined criteria for predicting the tropism of subtype CRF02-AG vi-

\* Corresponding author. Mailing address: CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Laboratoire de Virologie, Toulouse F-31300, France. Phone: 33 5 67 69 04 24. Fax: 33 5 67 69 04 25. E-mail: izopet.j@chu-toulouse.fr.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 13 May 2009.

TABLE 1. Comparison of genotypic prediction of HIV tropism and the observed phenotype and performances of the V3 genotype for predicting CXCR4 usage of the HIV-1 CRF02-AG subtype

Prediction method and genotype	No. of patients with virus phenotype:		Performance <sup>a</sup>			
	R5	R5X4/X4	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Combined 11/25 and net charge rule						
R5	41	3	70	98	88	93
X4	1	7				
Geno2pheno <sup>b</sup>						
R5	38	6	40	90	50	86
X4	4	4				
WebPSSM <sub>X4/R5</sub>						
R5	32	2	80	76	44	94
X4	10	8				
WebPSSM <sub>SI/NSI</sub>						
R5	38	3	70	90	64	93
X4	4	7				

<sup>a</sup> PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

<sup>b</sup> Geno2Pheno was used with a false-positive rate of 10%.

ruses and those of the bioinformatic tools Geno2pheno (false-positive rate of 10%) and WebPSSM with the SI/NSI and X4/R5 matrices (WebPSSM<sub>SI/NSI</sub> and WebPSSM<sub>X4/R5</sub>, respectively). Geno2pheno is available at <http://coreceptor.bioinf.mpi-sb.mpg.de/cgi-bin/coreceptor.pl> (September 2008). WebPSSM is available at <http://ubik.microbiol.washington.edu/computing/psm/> (September 2008).

The phenotypic assay revealed 42 virus populations with an R5 phenotype and 10 virus populations with a dual/mixed R5X4 phenotype but no virus population with a pure X4 phenotype. The genotypic classifications based on the combined criteria from the 11/25 and net charge rules and the Geno2pheno and WebPSSM tools were compared to the phenotype of the subtype CRF02-AG viruses (Table 1). The combined criteria from the 11/25 and net charge rules misclassified only four of the samples from the 52 patients (global concordance, 92%), while Geno2pheno misclassified 10 samples (global concordance, 81%), PSSM<sub>X4/R5</sub> misclassified 12 samples, and PSSM<sub>SI/NSI</sub> misclassified 7 samples (global concordance, 77 to 87%). The combined 11/25 and net charge rule criteria successfully detected CRF02-AG subtype CXCR4-using viruses with a sensitivity of 70% and a specificity of 98%. Geno2pheno lacked sensitivity (40%), while PSSM<sub>X4/R5</sub> was sensitive (80%) but less specific (76%).

A recent study reported that the genotypic algorithms currently used lack sensitivity for detecting CXCR4-using viruses among non-B subtypes, but no details were given of their performance for particular subtypes (9). Subtype-specific genotype-phenotype correlations should be assessed because the genotypic determinants of coreceptor usage for some particular subtypes may be different. We found that the Geno2pheno tool lacked sensitivity for predicting the CXCR4 usage of subtype CRF02-AG viruses, although it performs well for subtype B viruses (13). In contrast, the combined 11/25 and net charge

rule criteria were equally good at predicting the CXCR4 usage of both subtype CRF02-AG and subtype B viruses (13). Bulk sequencing is less sensitive than the phenotypic assay at detecting minor CXCR4-using variants in the virus population, but the impact of such minor variants on the clinical response to CCR5 antagonists remains to be determined. Multicenter studies analyzing the correlations between the genotypic determination of HIV-1 tropism and clinical response to CCR5 antagonists are needed to validate this approach in clinical practice.

In conclusion, the combined criteria from the 11/25 and net charge rules performed well for predicting the tropism of HIV-1 subtype CRF02-AG, while the Geno2pheno bioinformatic tool did not. Simple genotypic methods could make the clinical use of CCR5 antagonists easier and cheaper than using phenotypic assays. Additional studies are needed to assess the performances of the various genotypic algorithms for predicting the tropism of other HIV-1 non-B subtypes.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The sequences reported here were given GenBank accession no. FJ652327 to FJ652378.

Financial support for this work was provided by INSERM U563.

#### REFERENCES

- Berger, E. A., P. M. Murphy, and J. M. Farber. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* **17**:657–700.
- Brandful, J. A., M. E. Coetzer, T. Cilliers, M. Phoswa, M. A. Papanthanasopoulos, L. Morris, and P. L. Moore. 2007. Phenotypic characterization of HIV type 1 isolates from Ghana. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **23**:144–152.
- Briggs, D. R., D. L. Tuttle, J. W. Sleasman, and M. M. Goodenow. 2000. Envelope V3 amino acid sequence predicts HIV-1 phenotype (co-receptor usage and tropism for macrophages). *AIDS* **14**:2937–2939.
- De Jong, J. J., A. De Ronde, W. Keulen, M. Tersmette, and J. Goudsmit. 1992. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J. Virol.* **66**:6777–6780.
- Delobel, P., M. T. Nugeyre, M. Cazabat, C. Pasquier, B. Marchou, P. Maspip, F. Barre-Sinoussi, N. Israel, and J. Izopet. 2007. Population-based sequencing of the V3 region of *env* for predicting the coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1572–1580.
- Descamps, D., M. L. Chaix, P. Andre, V. Brodard, J. Cottalorda, C. Deveau, M. Harzic, D. Ingrand, J. Izopet, E. Kohli, B. Masquelier, S. Mouajjah, P. Palmer, I. Pellegrin, J. C. Plantier, C. Poggi, S. Rugez, A. Ruffault, V. Schneider, A. Signori-Schmuck, C. Tamalet, M. Wirde, C. Rouzioux, F. Brun-Vezinet, L. Meyer, and D. Costagliola. 2005. French national sentinel survey of antiretroviral drug resistance in patients with HIV-1 primary infection and in antiretroviral-naïve chronically infected patients in 2001–2002. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **38**:545–552.
- Dorr, P., M. Westby, S. Dobbs, P. Griffin, B. Irvine, M. Macartney, J. Mori, G. Rickett, C. Smith-Burchnell, C. Napier, R. Webster, D. Armour, D. Price, B. Stammen, A. Wood, and M. Perros. 2005. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4721–4732.
- Fouchier, R. A., M. Groenink, N. A. Kootstra, M. Tersmette, H. G. Huisman, F. Miedema, and H. Schuitemaker. 1992. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J. Virol.* **66**:3183–3187.
- Garrido, C., V. Roulet, N. Chueca, E. Poveda, A. Aguilera, K. Skrabal, N. Zahonero, S. Carlos, F. Garcia, J. L. Faudon, V. Soriano, and C. de Mendoza. 2008. Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *J. Clin. Microbiol.* **46**:887–891.
- Hemelaar, J., E. Gouws, P. D. Ghys, and S. Osmanov. 2006. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* **20**:W13–W23.
- Jensen, M. A., M. Coetzer, A. B. van 't Wout, L. Morris, and J. I. Mullins. 2006. A reliable phenotype predictor for human immunodeficiency virus type 1 subtype C based on envelope V3 sequences. *J. Virol.* **80**:4698–4704.
- Jensen, M. A., F. S. Li, A. B. van 't Wout, D. C. Nickle, D. Shriner, H.-X. He,

- S. McLaughlin, R. Shankarappa, J. B. Margolick, and J. I. Mullins. 2003. Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 *env* V3 loop sequences. *J. Virol.* **77**:13376–13388.
13. Raymond, S., P. Delobel, M. Mavigner, M. Cazabat, C. Souyris, K. Sandres-Saune, L. Cuzin, B. Marchou, P. Massip, and J. Izopet. 2008. Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism. *AIDS* **22**:F11–F16.
  14. Taylor, B. S., and S. M. Hammer. 2008. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N. Engl. J. Med.* **359**:1965–1966.
  15. Tebit, D. M., L. Zekeng, L. Kaptue, M. Salminen, H. G. Krausslich, and O. Herchenroder. 2002. Genotypic and phenotypic analysis of HIV type 1 primary isolates from western Cameroon. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **18**:39–48.
  16. Vergne, L., A. Bourgeois, E. Mpoudi-Ngole, R. Mougnotou, J. Mbuagbaw, F. Liegeois, C. Laurent, C. Butel, L. Zekeng, E. Delaporte, and M. Peeters. 2003. Biological and genetic characteristics of HIV infections in Cameroon reveals dual group M and O infections and a correlation between SI-inducing phenotype of the predominant CRF02\_AG variant and disease stage. *Virology* **310**:254–266.



## ARTICLE 4

« Prediction of HIV-1 subtype C tropism by genotypic algorithms built from subtype B viruses »

Raymond S., Delobel P., Mavigner M., Ferradini L., Cazabat M., Souyris C., Sandres-Sauné K., Pasquier C., Marchou B., Massip P., and Izopet J.

**Journal of AIDS 2010 ;53 :167-175.**

Le sous-type C est responsable de plus de 50% des infections par le HIV-1 dans le monde. Des études ont montré que les virus R5 étaient largement prédominants chez les patients infectés par des virus de sous-type C quel que soit le stade clinique de la maladie, tandis que des études plus récentes ont retrouvé une prévalence des virus X4 de 30% chez les patients à un stade avancé de la maladie. Les déterminants génotypiques de l'utilisation de CXCR4 pour l'entrée des virus de sous-type C ont été peu étudiés. Nous avons donc déterminé les corécepteurs d'entrée utilisés par des approches génotypiques et phénotypiques chez des patients infectés par des virus de sous-type C afin d'identifier les déterminants génotypiques permettant de prédire le tropisme de ce sous-type particulier. De plus, nous avons étudié deux groupes de patients, venant du Malawi d'une part, et vivant en France d'autre part, afin d'identifier d'éventuelles différences de prévalence des virus X4 comme les études récentes le suggéraient.

La prévalence des virus utilisant CXCR4 pour l'entrée, déterminée par le test phénotypique TTT était de 29% chez les patients du Malawi et de seulement 5% chez les patients vivant en France. Cette différence pourrait s'expliquer par un stade clinique moins avancé chez les patients vivant en France ou par une moindre exposition de ces patients aux antirétroviraux, comparé aux patients du Malawi. Une autre hypothèse serait une évolution récente de l'épidémie dans les pays du sud et de l'est de l'Afrique avec une augmentation de la prévalence des virus X4 de sous-type C.

Le séquençage direct de la région V3 des virus isolés au Malawi a montré que les déterminants génotypiques associés à l'utilisation de CXCR4 étaient la présence d'acides aminés chargés positivement en position 11/25 et une charge nette globale de V3 élevée ( $\geq +5$ ). La présence de mutations au niveau du site de N-glycosylation était aussi fréquemment retrouvée. Ces déterminants étaient donc identiques à ceux décrits pour le sous-type B. Ces

règles de prédiction étaient aussi adaptées à l'analyse des souches isolées en France, sauf pour deux patients présentant une discordance entre les critères génotypiques de la règle combinée et le phénotype d'entrée. L'analyse clonale de ces deux populations virales n'a pas retrouvé de variants minoritaires qui auraient permis d'expliquer les discordances génotype-phénotype lors de l'analyse de la population globale. Pour la population de virus phénotypée R5X4, les déterminants de l'utilisation de CXCR4 pour l'entrée pourraient se situer à l'extérieur de V3, tandis que pour la population virale phénotypée R5, le séquençage direct a conduit à une surestimation de la charge nette de V3, prédisant à tort un virus X4.

Nous avons ensuite évalué les performances des algorithmes génotypiques établis pour le sous-type B et de l'algorithme PSSM spécifique du sous-type C. La règle combinée 11/25 et charge nette a donné les meilleures performances avec une sensibilité de 93% et une spécificité de 96% pour prédire l'utilisation de CXCR4 par les virus de sous-type C. Les algorithmes les plus fréquemment utilisés pour prédire le tropisme du sous-type B (geno2pheno<sub>10</sub> et PSSM sous-type B, X4/R5 et SI/NSI) prédisaient correctement l'utilisation de CXCR4 avec des sensibilités entre 80 à 87% et des spécificités entre 89 et 98%. L'algorithme PSSM spécifique du sous-type C avait la même sensibilité que la règle combinée mais était moins spécifique (82%).

Ce travail a montré que les déterminants de l'utilisation des corécepteurs d'entrée par le HIV-1 de sous-type C étaient situés principalement dans la région V3 de l'enveloppe et étaient similaires à ceux rapportés pour le sous-type B. Les algorithmes génotypiques les plus utilisés pour la prédiction du tropisme des virus de sous-type B ont montré de bonnes performances pour prédire l'utilisation des corécepteurs d'entrée par les virus de sous-type C. D'autres études sont nécessaires pour accroître nos connaissances sur les déterminants génotypiques corrélés à l'utilisation des corécepteurs d'entrée par les virus de sous-types non-B, notamment pour l'utilisation des antagonistes de CCR5 en pratique courante.

# Prediction of HIV Type 1 Subtype C Tropism by Genotypic Algorithms Built From Subtype B Viruses

Stéphanie Raymond, MD,\*†‡ Pierre Delobel, MD, PhD,\*†§ Maud Mavigner,\*  
Laurent Ferradini, MD,|| Michelle Cazabat,\*‡ Corinne Souyris,\*‡ Karine Sandres-Sauné, PhD,\*†‡  
Christophe Pasquier, MD, PhD,\*†‡ Bruno Marchou, MD,†§ Patrice Massip, MD,†§  
and Jacques Izopet, PhD\*†‡

## INTRODUCTION

The chemokine receptors CCR5 and CXCR4 are the main coreceptors used by HIV-1, together with CD4, to enter target cells.<sup>1-4</sup> Virus strains are classified as R5, X4, or dual/mixed R5X4 viruses depending on their use of one or both coreceptors.<sup>5</sup> The determination of HIV-1 coreceptor tropism is critical for the therapeutic use of CCR5 antagonists, which is restricted to patients harboring only R5 viruses.<sup>6</sup> HIV-1 coreceptor usage not only influences the natural history of HIV-1 disease<sup>7,8</sup> but is also a predictor of disease progression during combination antiretroviral therapy.<sup>7,9,10</sup>

The major genotypic determinants of HIV-1 coreceptor usage lie in the third variable (V3) region of the envelope glycoprotein (gp120).<sup>11,12</sup> Simple genotypic approaches based on V3 could replace the more complicated phenotypic assays for routinely assessing HIV-1 tropism, but their use requires the determination of the correlation between genotype and phenotype. We have previously shown that the genotypic analyses based on V3 accurately predict HIV-1 subtype B coreceptor usage.<sup>13,14</sup> But the genotypic algorithms built from subtype B virus data could be inadequate for predicting the tropism of non-B viruses.<sup>15</sup> It is therefore necessary to determine subtype-specific correlations between the genotype and the phenotype. Subtype C virus is now the most prevalent in the world (<http://www.unaids.org>). Previous studies have suggested that R5 viruses overwhelmingly predominate in subtype C-infected patients at various stages of disease, including advanced AIDS.<sup>16-20</sup> However, recent studies have found CXCR4-using viruses in about 30% of subtype C-infected patients with advanced disease.<sup>21-25</sup> Whether this apparent increased frequency of CXCR4-using subtype C viruses is due to better detection, the selection of CXCR4-using variants due to antiretroviral therapy, or an evolving epidemic, remains to be determined. Little is known about the genotypic determinants of CXCR4 coreceptor usage by subtype C viruses, and this information is crucial before genotypic analyses can be used to predict the tropism of this subtype.

We have therefore determined HIV-1 coreceptor usage both genotypically and phenotypically in HIV-1 subtype C-infected patients to identify the genotypic criteria that can be used to predict coreceptor usage by this particular subtype. Recent data suggest that subtype C epidemic is evolving in eastern and southern Africa, with increasing frequencies of CXCR4-using viruses.<sup>21-25</sup> We therefore studied 2 groups of

**Background:** Genotypic predictions of HIV-1 tropism could simplify CCR5 antagonist usage. However, the genotypic algorithms built from subtype B viruses could be inadequate for non-B subtypes. We therefore performed paired genotypic and phenotypic determination of subtype C tropism.

**Methods:** We studied 52 patients recruited in Malawi and 21 patients recruited in France. We directly sequenced the V3 *env* region and performed a recombinant virus phenotypic entry assay in parallel.

**Results:** The Malawi patients had 29% of CXCR4-using subtype C viruses compared with only 5% in the patients from France. For detecting CXCR4-using subtype C viruses, the genotypic rule combining the amino acids at positions 11/25 and the net charge of V3 was 93.3% sensitive and 96.4% specific. The Geno2pheno tool was 86.7% sensitive and 89.1% specific. The WebPSSM tool with the SI/NSI matrix was 80% sensitive and 98.2% specific in its subtype B version and 93.3% sensitive and 81.8% specific in its subtype C version.

**Conclusions:** The genotypic determinants of coreceptor usage for HIV-1 subtype C were mainly in V3 and were globally similar to those previously reported for subtype B viruses. The main genotypic algorithms built from subtype B viruses perform well when applied to subtype C viruses.

**Key Words:** HIV envelope protein 120, V3 genotype, phenotype, CCR5, CXCR4, HIV-1 subtype C

(*J Acquir Immune Defic Syndr* 2010;53:167-175)

Received for publication January 22, 2009; accepted October 27, 2009.

From the \*INSERM, U563, Toulouse, F-31300 France; †Université Toulouse III Paul-Sabatier, Faculté de Médecine Toulouse-Purpan, Toulouse, F-31300 France; ‡CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Laboratoire de Virologie, Toulouse, F-31300 France; §CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Toulouse, F-31300 France; and ||Epicentre, Paris, France.

Supported by INSERM, and Sidaction and Médecins Sans Frontières funded the Chiradzulu programme in Malawi.

Conflict of interest: none.

Correspondence to: Jacques Izopet, PhD, INSERM, U563, Toulouse, F-31300 France (e-mail: izopet.j@chu-toulouse.fr).

Copyright © 2010 by Lippincott Williams & Wilkins

patients, one recruited in Malawi and the other recruited in France, to take into account possible virological differences related to distinct epidemiological profiles.

## METHODS

### Study Subjects and Samples

We studied 52 HIV-1 subtype C–infected individuals from a highly active antiretroviral therapy (HAART) program held by the medical nongovernmental organization Médecins Sans Frontières in the Chiradzulu district of Malawi.<sup>26</sup> These patients, who had plasma viral loads higher than 1000 copies per milliliter while on HAART, had previously been tested for antiretroviral resistance mutations in a virological cross-sectional survey. The patients of this substudy had a median age of 34 [interquartile ratio (IQR): 28.9–40.3] years and a median CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte count of 114 (IQR: 66–177) cells per cubic millimeter at HAART initiation, and 58% of them were in World Health Organization (WHO) stage III and 24% were in stage IV. Almost all were given a combination of stavudine (or zidovudine), lamivudine, and nevirapine, as a first-line therapy.<sup>26</sup>

An independent group of 21 HIV-1 subtype C–infected individuals were recruited at the Department of Infectious Diseases of Toulouse University Hospital, France. Of these, 13 were given HAART for a median duration of 3 (IQR: 1–4) years. The patients had a median age of 36 (IQR: 27–39) years, and the median CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte nadir was 197 (IQR: 105–349) cells per cubic millimeter. Fourteen percent of them were at WHO stage III and 19% at stage IV at the time of sample analysis. The majority of these patients (17 of 21) were infected by HIV-1 in various countries of Africa, mostly in eastern or southern Africa but none in Malawi. The median year of infection diagnosis was 1997 (IQR: 1993–2001).

All viruses were identified as the HIV-1 subtype C by reverse transcriptase and envelope sequence analysis using the HIVseq program (<http://hivdb.stanford.edu/>) and the National Center for Biotechnology Information genotyping tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>). The identification as subtype C viruses was confirmed by neighbor-joining phylogenetic analysis of the sequences studied here, together with HIV-1 subtype reference sequences from the Los Alamos National Laboratory (<http://www.hio.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>) (data not shown).

### Polymerase Chain Reaction Amplification of an HIV-1 *env* Fragment Encompassing the gp120 and the Ectodomain of gp41

HIV-1 particles were collected from 1 mL plasma by centrifugation, and RNA was isolated and purified using the QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). A reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR) followed by a nested polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the *env* fragment. The RT-PCR was performed with the SuperScript III One-Step RT-PCR System (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), with the following conditions: 60 minutes at 56°C, 2 minutes at 94°C, 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 58°C, and 4 minutes at 68°C for 50 cycles. The

nested PCR was performed with the Expand High Fidelity Plus PCR System (Roche Diagnostics, Meylan, France), with the following conditions: 2 minutes at 94°C, 30 seconds at 94°C; 30 seconds at 60°C, and 3 minutes 30 seconds at 72°C for 35 cycles. The outer primer pair was 5'-GGCTTAGG-CATCTCCTATGGCAGGAAGAAG-3' and 5'-GGTCTTAA AGGTACCTGAGGTCTGACTGGA-3'. The inner primer pair was 5'-CCACCACTCTATTTTGTGCATCA-3' and 5'-GGTGGTAGCTGAAGAGGCACAGG-3'. An alternative subtype C–specific outer primer pair was used for 8 patients; it was 5'-GGCTTAGGCATTTCCCTATGGCAGGAAGAAG-3' and 5'-TTAACCCCTCCAGTCCCCCCTTTTCTTTTA-3'. PCR amplification bias related to the use of the subtype C–specific primers was unlikely as the proportion of CCR5- and CXCR4-using viruses was not related to the pair of primer used (data not shown).

### Phenotypic Characterization of HIV-1 Coreceptor Usage

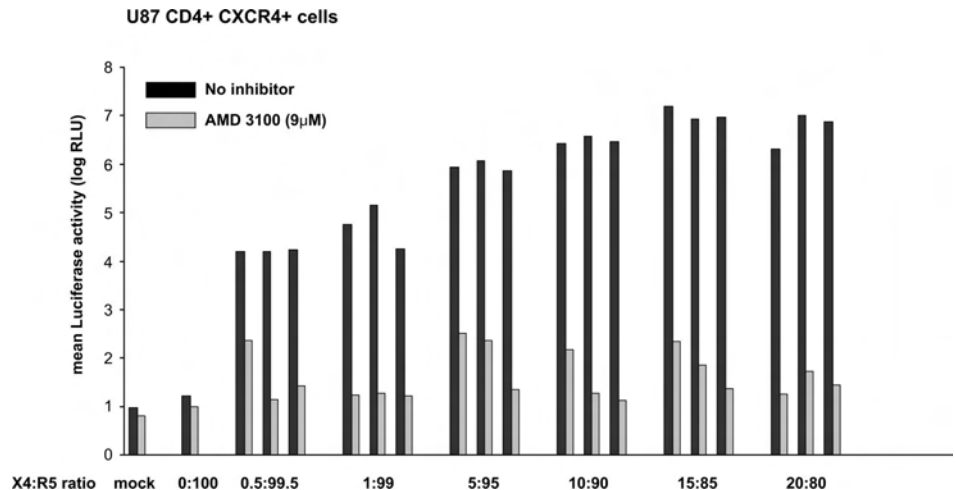
The phenotype of HIV-1 coreceptor usage was determined using a recombinant virus entry assay that has an increased sensitivity for detecting minor CXCR4-using variants in virus populations. This new assay was performed as previously described,<sup>13</sup> with the following modifications: (1) the pNL43- $\Delta$ env-Luc2 vector was created by replacing the Firefly luciferase reporter gene (*Luc*) in the pNL43- $\Delta$ env-Luc vector by a codon-optimized gene to obtain better expression in human cells (*luc2* gene from the pGL4.10 vector; Promega, Charbonnières les Bains, France); (2) the U87 CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> cell line (obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, from Dr. HongKui Deng and Dr. Dan R. Littman) was subcloned to obtain a new cell line that performed better for detecting minor CXCR4-using variants; (3) relative light units (RLUs) on U87 CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> and U87 CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> cells were measured at 72 hours post infection; (4) the specificity of all positive luminescent signals was systematically confirmed using coreceptor antagonists. JM-2987 (hydrobromide salt of AMD-3100) was used to block CXCR4-mediated entry and TAK-779 to block CCR5-mediated entry (these reagents were obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH),<sup>27,28</sup> AMD-3100 was used at concentrations of 3 and 9  $\mu$ M, and TAK-779 was used at 9  $\mu$ M. Inhibition by either drug was defined as a 100-fold decrease in RLU relative to the RLU measured in the absence of the drug.

The ability of this enhanced phenotypic entry assay to detect the presence of minor X4 variants in a virus population was assessed in 3 independent mixture experiments with various X4/R5 DNA ratios. Minor X4 variants were always detectable when present at a frequency of 1% or higher and in 2 of 3 experiments when present at a frequency of 0.5% (Fig. 1).

### Genotypic Prediction of HIV-1 Coreceptor Usage

The V3 region was directly sequenced from bulk *env* PCR products in both directions by the dideoxy chain-termination method (BigDye Terminator v.3.1; Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) on an ABI 3130 DNA

**FIGURE 1.** Sensitivity of the recombinant virus phenotypic assay for detecting minor X4 variants in a virus population. Three independent experiments with various X4/R5 DNA ratios and the pNL43-Δenv-Luc2 vector were performed. RLU on the U87 CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> cells were measured 72 hours post infection. The specificity of the luminescent signal was confirmed using the CXCR4 antagonist AMD-3100 (9 μM). Minor X4 variants were always detectable when present at a frequency of 1% or higher. Minor X4 variants were also detected in 2 of 3 experiments when present at a frequency of 0.5%, whereas in one experiment, the inhibition by AMD-3100 did not reach a 100-fold decrease in the signal.



sequencer. Two primer pairs were used for V3 sequencing. The first primer pair was 5'-ACAATGYACACATGGAATTARG CCA-3' and 5'-AGAAAAATTCYCCTCYACAATTTAAA-3', and the alternative primer pair was 5'-CTGTAAATGG-CAGTCTAGC-3' and 5'-GTGATGTATTCARTAGAAAAA TTC-3'. Results were analyzed with Sequencher (Genecodes, Ann Arbor, MI), blinded to the phenotype. Minority species were detected when the automated sequencer electrophoregram showed a second base peak.

Multiple alignments were performed with CLUSTALW 1.83, and sequence alignments were manually edited using BioEdit software. Phylogenetic analyses of the sequences of the PCR products excluded any possibility of sample contamination (data not shown).

We used a combination of criteria from the 11/25 and net charge rules to predict HIV-1 tropism from the V3 genotype.<sup>11,12,29</sup> One of the following criteria is required for predicting CXCR4 coreceptor usage: (1) 11 R/K and/or 25 K, (2) 25R and a net charge of  $\geq +5$ , or (3) a net charge of  $\geq +6$ .<sup>13</sup> The V3 net charge was calculated by subtracting the number of negatively charged amino acids (D and E) from the number of positively charged ones (K and R). All possible permutations were assessed when amino acid mixtures were found at some codons of V3. The combination resulting in the highest net charge was used to predict the tropism. We have previously shown that these combined criteria are better for predicting the HIV-1 coreceptor usage of subtype B viruses than the 11/25 and net charge rules used separately.<sup>13,14</sup> We then compared the performances of these combined criteria for predicting the tropism of subtype C viruses with that of the bioinformatic tools Geno2pheno (false-positive rate 10%), WebPSSM (subtype C specific and subtype B specific), SVM<sub>wetcat</sub>, C4.5, C4.5 with positions 8–12 only, and PART. Geno2pheno is available at <http://coreceptor.bioinf.mpi-sb.mpg.de/cgi-bin/coreceptor.pl> (July 2009). WebPSSM is available at <http://ubik.microbiol.washington.edu/computing/psm/> (July 2009). The 4 last algorithms are available at <http://genomiac2.ucsd.edu:8080/wetcat/index.html> (July 2009).

### Cloning of env PCR Products

The env PCR products from 2 patients were subjected to clonal analysis using a TOPO-TA cloning kit (Invitrogen). Plasmid DNAs containing env inserts were sequenced on the whole length of the gp160 with the primers described for the V3 region and the following additional sets of forward primers 5'-CCACCACTCTATTTTGTGCATCA-3' and 5'-CTGCTC TTTTTCTCTCTCCACCAC-3' and reverse primers 5'-ACTGGCTTAATTCCATGTGTACATTG-3' and 5'-GTGGT GGAGAGAGAAAAAGAGCAG-3'.

### Nucleotide Sequence Accession Numbers

The sequences reported here were given Genbank accession numbers FJ375966 to FJ376035.

## RESULTS

### Phenotypic and Genotypic Characterization of HIV-1 Subtype C Coreceptor Usage in the Malawi Cohort

The fragment encompassing the gp120 and the gp41 ectodomain of HIV-1 subtype C env was successfully amplified by PCR from the plasma samples of 49 of the 52 patients from Malawi. The primer pairs previously designed on the basis of the subtype B consensus sequence allowed successful PCR amplification of the subtype C env fragment for 41 patients, but subtype C-specific primers were required for successful PCR amplification for the remaining 8 patients. The phenotype of coreceptor-mediated entry was then successfully determined for all the 49 analyzable patients; it revealed 35 virus populations with an R5 phenotype, 10 virus populations with a dual/mixed R5X4 phenotype, and 4 virus populations with a pure X4 phenotype (Fig. 2). The clinical and virological characteristics of the patients were not significantly different according to CCR5 or CXCR4 virus coreceptor usage, notably regarding the median nadir of CD4<sup>+</sup> T cells, the baseline viral load, and the WHO stage (data not shown).

Cons seq	11											25											Net charge	Amino acid number	Combined 11/25 and net charge rules	Geno2pheno10	Subtype C PSSM	Phenotype																			
	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	E	V	I	R	I	-	G	P	G	Q	T							F	Y	A	T	G	D	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C			
MAL-118996	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2 or 3	35	R5	R5	R5	R5	R5
MAL-119182	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	G	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	X4	X4	R5	R5	
MAL-120218	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-120564	.	.	.	G	.	.	.	.	R	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-120566	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-120612	.	.	.	T/I	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5	35	R5	X4	R5	R5	R5		
MAL-157850	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	M/V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3 or 4	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-157920	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-170526	.	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-170570	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-171480	.	.	.	.	.	.	.	.	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-172060	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-172310	.	.	.	G	.	.	.	.	R	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-173064	.	.	.	G	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-174866	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-175300	.	.	.	.	.	.	.	.	R	G	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-175668	.	.	.	G/C	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-175736	.	.	.	T/A	.	N/S/D/G	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-176612	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-176932	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-177250	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-177466	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	.	I/V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-180789	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-181666	.	.	.	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-27776	.	.	.	I	.	N/S/D/G	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2 to 4	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-34048	.	.	.	T/I	.	N/S	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-34320	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-34504	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-45006	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I/L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-45252	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-49524	.	.	.	.	.	.	.	.	N/S/D/G	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-59982	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3 or 4	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-65878	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-65924	.	.	.	G/C	.	A	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3	35	R5	R5	R5	R5	R5		
MAL-176520	.	.	.	T/I	.	.	.	.	.	.	.	K/Q/S/G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2 to 5	35	X4	R5	R5	R5	R5		
MAL-117558	.	.	.	N/S/D/G	.	.	.	.	N/Y	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3 to 6	35	X4	R5	X4	R5/X4	R5/X4		
MAL-158272	.	.	.	N/I	.	N/I/A/D	.	S	K/R	.	.	R	S/G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	8	34	X4	X4	X4	X4	R5/X4		
MAL-170624	.	.	.	.	.	.	.	.	K/E	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	6 or 7	37	X4	X4	X4	X4	R5/X4		
MAL-172296	.	.	.	G	.	.	.	.	Y	.	.	V	R/G	.	G	I	.	R	.	Q/H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5 or 6	37	X4	X4	X4	X4	R5/X4		
MAL-181306	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	6	37	X4	X4	X4	X4	R5/X4		
MAL-65884	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	6	37	X4	X4	X4	X4	R5/X4		
MAL-034662	.	.	.	T/I	.	G	.	.	.	.	.	I/K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5 to 7	35	X4	X4	X4	X4	R5/X4		
MAL-45164	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4 or 5	35	X4	X4	X4	X4	R5/X4		
MAL-059660	.	.	.	I	.	G	.	.	.	.	.	M/V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	8	32	X4	X4	X4	X4	R5/X4		
MAL-182346	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	A/G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	7	34	X4	X4	X4	X4	R5/X4		
MAL-117620	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	N	V	R/G	.	G	K/I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5 to 7	37	X4	X4	X4	X4	X4		
MAL-119226	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5	35	X4	X4	X4	X4	X4		
MAL-171360	.	.	.	A	.	.	.	.	S/I/F	.	.	Q	R	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	7	35	X4	X4	X4	X4	X4		
MAL-181950	.	.	.	R	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	7	37	X4	X4	X4	X4	X4		

**FIGURE 2.** V3 amino acid sequence alignments and matched phenotypes of the 49 subtype C viruses from patients recruited in Malawi. V3 amino acid sequence alignments were obtained by bulk sequencing *env* PCR products from the 49 Malawi patients. These sequences are shown with the following abbreviations with reference to the consensus sequence: dot, identity with amino acid baseline sequence; dash, gap inserted to maintain alignment; and slash, amino acid position related to dual virus population. Replacements are indicated by the appropriate code letters. Residues at positions 11 and 25 and mutated N-linked glycosylation sites are boxed to highlight the substitutions noted. The V3 net charge [calculated by subtracting the number of negatively charged amino acids (D and E) from the number of positively charged ones (K and R)], the number of amino acids in V3, the genotype predicted by the combined 11/25 and net charge rules, the Geno2pheno, and the subtype C PSSM are shown, together with the observed phenotype. Discordances between the genotypic predictions and the phenotype are boxed.

The V3 region was successfully sequenced from the bulk *env* PCR products for the 49 patients. V3 amino acid sequence alignments are shown in Figure 2, together with the matched phenotypic data. We first looked for the genotypic determinants of V3 known to be associated with CXCR4 usage by subtype B viruses.

The presence of positively charged amino acids at V3 positions 11 and/or 25 has been associated with CXCR4 coreceptor usage by subtype B viruses.<sup>11,12</sup> Among the 49 subtype C viruses, 2 had an arginine (R) at position 11 and 10 had an arginine (R) or a lysine (K) at position 25 of V3. All but one displayed an R5/X4 or X4 phenotype, a result globally concordant with what would have been expected for subtype B viruses.

An increased net charge of V3 has also been associated with CXCR4 coreceptor usage by subtype B viruses.<sup>12,29</sup> Among the 49 subtype

**TABLE 1.** Phenotype of HIV-1 Subtype C Based on 11/25 Amino Acids and Net Charge of V3

V3 Genotype		No. of Sequences With the Indicated Phenotype	
11/25 Amino Acids	Net Charge	R5	R5X4/X4
R at position 11	<+5	0	0
	=+5	0	1
	>+5	0	1*
K or R at position 25	<+5	0	0
	=+5	1	1
	>+5	0	8*
No R or K at position 11 or 25	<+5	48	1
	=+5	5	0
	>+5	1	4

\*The sequence MAL171360 harbored both 11R and 25R and is thus mentioned twice in the table.

### Phenotypic and Genotypic Characterization of HIV-1 Coreceptor Usage in the Group of Subtype C–Infected Patients Recruited in France

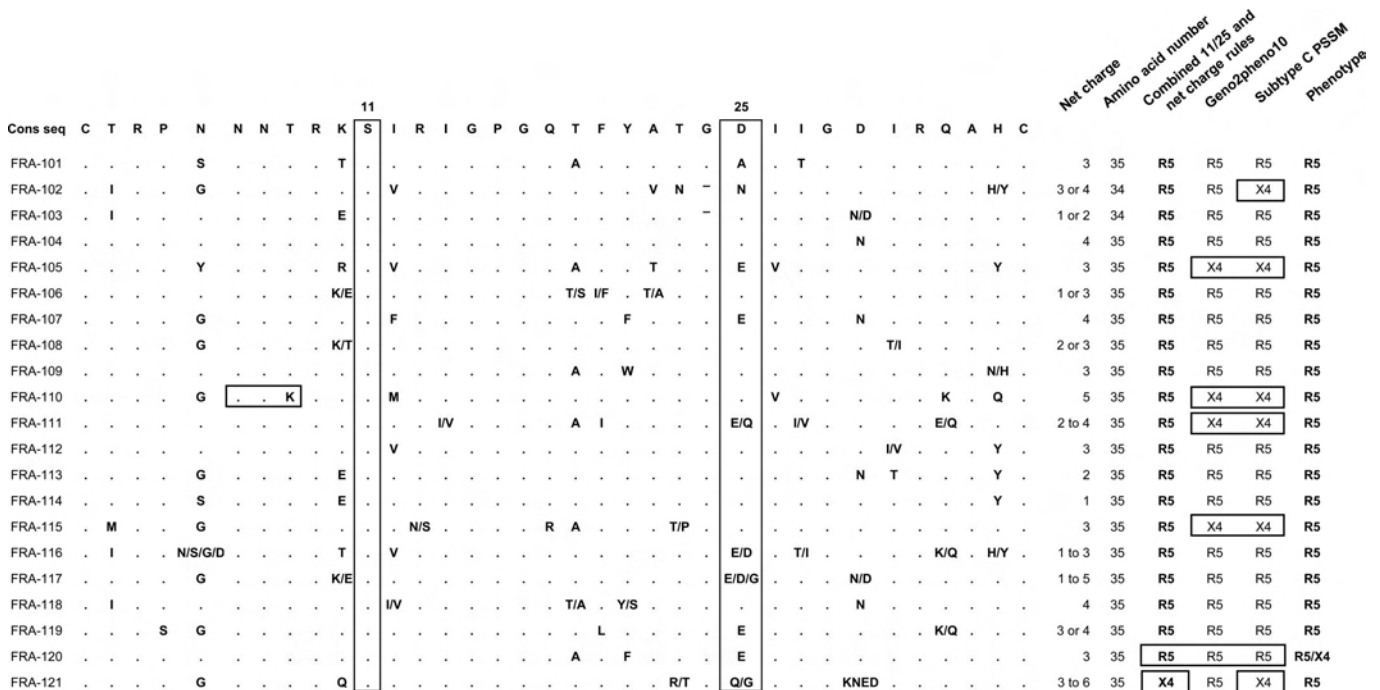
The coreceptor usage of subtype C viruses was then studied in a group of 21 subtype C–infected patients recruited

in France. The V3 genotype and entry phenotype were determined from bulk *env* PCR products with the same technique used in the Malawi cohort. The phenotypes and genotypes of all 21 patients were successfully determined. All but one patient from France harbored R5 virus populations, in contrast to the Malawi cohort. The remaining patient harbored a dual/mixed R5X4 virus population. V3 amino acid sequence alignments are shown in Figure 3, together with the matched phenotypic data.

We studied the clonal composition of the HIV-1 quasispecies of 2 patients (FRA-120 and FRA-121) mis-predicted by the bulk genotypic analysis when using the combined criteria from the 11/25 and net charge rules.

Subject FRA-120 harbored a dual/mixed R5X4 virus population on bulk phenotypic analysis but was predicted to be R5 by all the 3 genotypic algorithms. We studied 15 *env* molecular clones from the virus population of this subject (Fig. 4). One clone had a dual-tropic R5X4 phenotype (clone 13), and 14 clones had an R5 phenotype. But all of them, including clone 13, were predicted to be R5 by the V3 genotype by all the algorithms used. Genotypic determinants for CXCR4 usage located outside V3 could explain the R5X4 phenotype found for clone 13.<sup>32,33</sup>

Subject FRA-121 harbored an R5 virus population on bulk phenotypic analysis but was predicted to be X4 by 2 of the 3 genotypic algorithms. We studied 14 *env* molecular



**FIGURE 3.** V3 amino acid sequence alignments and matched phenotypes of the 21 subtype C viruses from patients recruited in France. V3 amino acid sequence alignments obtained by bulk sequencing *env* PCR products from the 21 patients recruited in France. These sequences are shown with the following abbreviations with reference to the consensus sequence: dot, identity with amino acid baseline sequence; dash, gap inserted to maintain alignment; and slash, amino acid position related to dual virus population. Replacements are indicated by the appropriate code letters. Residues at positions 11 and 25 are boxed to highlight the substitutions noted. The V3 net charge [calculated by subtracting the number of negatively charged amino acids (D and E) from the number of positively charged ones (K and R)], the number of amino acids in V3, the genotype predicted by the combined 11/25 and net charge rules, the Geno2pheno, and the subtype C PSSM are shown, together with the observed phenotype. Discordances between the genotypic predictions and the phenotype are boxed.

	1											11											25											35	Net charge	Combined rule	Geno2pheno	Subtype C PSSM	Phenotype			
Direct seq FRA-120	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	Q	A	F	F	A	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	3	R5	R5	R5	R5X4		
Clone 1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5	
Clone 2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5	
Clone 3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5	
Clone 4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5	
Clone 5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5	
Clone 6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5	
Clone 7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5	
Clone 8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5	
Clone 9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5	
Clone 10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5	
Clone 11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5	
Clone 12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5	
Clone 13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5	
Clone 14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	R5	R5	R5	R5	
Clone 15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	R5	R5	R5	R5	
Direct seq FRA-121	C	T	R	P	G	N	N	T	R	Q	S	I	R	I	G	P	G	Q	T	F	Y	A	R/T	G	Q/G	I	I	G	K/N	E/D	I	R	Q	A	H	C	3 to 6	X4	R5	X4	R5	
Clone 1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5
Clone 2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5
Clone 3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5
Clone 4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5
Clone 5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5
Clone 6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5
Clone 7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5
Clone 8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5
Clone 9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5
Clone 10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5
Clone 11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5
Clone 12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5
Clone 13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5
Clone 14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	R5	R5	R5	R5

**FIGURE 4.** Clonal analysis of the virus populations of 2 patients whose genotypic prediction and phenotype were discordant. Clonal composition of the virus populations of 2 patients (FRA-120 and FRA-121) whose genotypic prediction and phenotype were discordant. V3 amino acid sequence alignments were obtained by sequencing molecular clones of *env* PCR products. These sequences are shown with the following abbreviations with reference to the consensus sequence: dot, identity with amino acid baseline sequence and dash, gap inserted to maintain alignment. Replacements are indicated by the appropriate code letters. Residues at positions 11 and 25 are boxed to highlight the substitutions noted. The V3 net charge [calculated by subtracting the number of negatively charged amino acids (D and E) from the number of positively charged ones (K and R)], the genotype predicted by the combined 11/25 and net charge rules, the Geno2pheno, and the subtype C PSSM are shown, together with the observed phenotype. Discordances between the genotypic predictions and the phenotype are boxed.

clones from the virus population of this subject (Fig. 4). All of them had an R5 phenotype and a concordant R5 genotype. The misprediction as X4 on bulk genotypic analysis for this sample was due to an overestimation of the V3 net charge. The combination of amino acids resulting in the highest net charge on the bulk genotype was used to predict the tropism. But clonal analysis revealed that the R amino acid at position 23 and the K amino acid at position 29 were not concomitant; they were harbored by distinct virus clones, resulting in a lower net charge than that expected by bulk analysis.

### Performances of V3-Based Genotypic Algorithms for Predicting the Coreceptor Usage of Subtype C Viruses in Both Groups

The combined criteria from the 11/25 and net charge rules and the Geno2pheno tool have been built on the basis of genotype–phenotype correlations for subtype B viruses. A subtype C–specific version of the position specific scoring matrix (PSSM) tool has been developed.<sup>34</sup> The genotypic classifications based on these 3 algorithms were compared with the phenotypes of the viruses from patients from Malawi and France (Table 2). The combined criteria from the 11/25 and net charge rules misclassified only 3 samples of those from the 70 patients from Malawi and France (global concordance: 95.7%), whereas Geno2pheno misclassified 8 samples (global concordance: 88.6%), and the subtype C PSSM misclassified 11 samples (global concordance: 84.3%). The combined criteria from the 11/25 and net charge rules thus most accurately detected subtype C CXCR4–using viruses with a sensitivity of 93.3% and a specificity of 96.4%. Geno2pheno had a sensitivity of 86.7% and a specificity of 89.1%. Subtype C–specific PSSM had a sensitivity of 93.3% but a specificity

of only 81.8% (Table 3). SVM<sub>wetcat</sub>, C4.5, C4.5 with positions 8–12 only, and PART algorithms were highly specific (96%–100%) but poorly sensitive (20%–53%) for detecting CXCR4–using subtype C viruses. Subtype B PSSM (X4/R5 and SI/NSI matrixes) tool was more sensitive (80%) than SVM, C4.5, and PART but less sensitive than subtype C PSSM.

The combined 11/25 and net charge rules predicted the exclusive CCR5 usage of subtype C viruses with a sensitivity of 96.4% and a specificity of 93.3%. The performances of the genotypic methods for predicting CCR5 usage of subtype C viruses are shown in Table 4.

### DISCUSSION

CCR5 antagonists are new drugs for treating HIV-infected patients, but they can only be used in patients harboring R5 viruses. Thus, HIV-1 tropism must be assessed in patients who are candidates for such treatment. We have previously shown that genotypic approaches based on V3 perform well for predicting the coreceptor usage of HIV-1 subtype B.<sup>13,14</sup> However, the genotypic algorithms built from subtype B virus data sets could be inadequate for predicting the tropism of non-B viruses.<sup>15</sup>

Despite the fact that subtype C viruses account for the vast majority of new HIV-1 infections worldwide, few data are available on the genotypic determinants of coreceptor usage for this subtype. It has long been thought that subtype C viruses almost exclusively use the CCR5 coreceptor to enter CD4-bearing target cells, whatever the clinical stage of the disease.<sup>16–20</sup> However, several recent studies have reported an apparent increase in the frequency of CXCR4–using subtype C viruses.<sup>21–25</sup> CXCR4–using viruses were first reported in



**TABLE 2.** Comparison of the Genotypic Prediction of HIV Subtype C Tropism and the Observed Phenotype

Genotype	Phenotype	
	R5	R5X4/X4
Combined 11/25 and net charge rules		
R5	53	1
X4	2	14
Geno2pheno <sub>10</sub>		
R5	49	2
X4	6	13
Subtype C PSSM <sub>SI/NSI</sub>		
R5	45	1
X4	10	14
Subtype B PSSM <sub>X4/R5</sub>		
R5	51	3
X4	4	12
Subtype B PSSM <sub>SI/NSI</sub>		
R5	54	3
X4	1	12
C4.5		
R5	54	11
X4	1	4
C4.5 positions 8–12		
R5	55	12
X4	0	3
PART		
R5	55	10
X4	0	5
SVM <sub>wetcat</sub>		
R5	53	7
X4	2	8

subtype C–infected patients on HAART,<sup>25</sup> and it has been suggested that antiretroviral treatment could produce the conditions necessary for the gradual emergence of X4 variants, as also observed in subtype B–infected patients on prolonged HAART.<sup>35</sup> Alternatively, the increasing frequency of CXCR4-using subtype C viruses could reflect an evolving epidemic, with CXCR4-using viruses becoming more common overall

among HIV-1 subtype C. In agreement with this hypothesis, a recent study reported 30% of CXCR4-using viruses in drug-naive subtype C–infected patients from South Africa.<sup>21</sup> We also find 29% of CXCR4-using viruses among the subtype C–infected patients from Malawi. By contrast, only 1 of the 21 subtype C–infected patients (5%) recruited in France harbored CXCR4-using virus. Both groups were assessed with the same ultrasensitive phenotypic assay, so excluding detection bias. The lower frequency of CXCR4-using viruses among the patients recruited in France may be due to a less advanced stage of the disease or a lower exposure to antiretroviral drugs in these patients than in those from the Malawi cohort. The mechanism responsible for the emergence of CXCR4-using viruses on HAART remains unclear. It could be due to the preferential residual replication of CXCR4-using viruses on HAART or the progressive replenishment of the virus reservoir in resting memory CD4<sup>+</sup> T cells by cells coming from the naive CD4<sup>+</sup> T-cell pool and harboring latent CXCR4-using viruses. But epidemiology could also account for this lower frequency of CXCR4-using viruses. Most of these 21 subtype C–infected patients had been infected for more than a decade (median 1997) and had been living in France for many years. They thus may not have been exposed to the more recent circulating strains, possibly including CXCR4-using viruses, of the subtype C epidemic in eastern and southern Africa.

The apparent increasing frequency of CXCR4-using strains among the subtype C epidemic overall reinforces the need for precise knowledge of the genotypic determinants of coreceptor usage for this particular subtype. Robust genotype–phenotype correlations must be demonstrated before any simple genotypic approach can be a useful alternative to the more complicated phenotypic assays. We have previously studied the paired genotypic and phenotypic assessment of coreceptor usage in subtype B–infected patients. We showed that the V3-based genotypic algorithms perform well for detecting the CXCR4 usage of subtype B viruses when assessed on *env* molecular clones and also on bulk virus populations.<sup>13,14</sup> The present study focuses on HIV-1 subtype C tropism using matched data for V3 sequences and phenotypic results. The genotypic determinants of CXCR4 usage for subtype C viruses seem to be globally similar to

**TABLE 3.** Performances of the V3 Genotype When Used to Predict the CXCR4 Usage of Subtype C Viruses

Genotypic Algorithm	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Combined 11/25 and net charge rules	93.3	96.4	87.5	98.1
Geno2pheno <sub>10</sub>	86.7	89.1	68.4	96.1
Subtype C PSSM <sub>SI/NSI</sub>	93.3	81.8	58.3	97.8
Subtype B PSSM <sub>X4/R5</sub>	80	92.7	75	94.4
Subtype B PSSM <sub>SI/NSI</sub>	80	98.2	92.3	94.7
C4.5	26.7	98.2	80	83.1
C4.5 positions 8–12	20	100	100	82.1
PART	33.3	100	100	84.6
SVM <sub>wetcat</sub>	53.3	96.4	80	88.3

Sensitivity of the genotype to predict CXCR4 usage of HIV-1 was calculated as follows: number of samples with an R5X4/X4 phenotype accurately predicted as X4 by the genotype divided by the total number of samples with an R5X4/X4 phenotype. Specificity of the genotype to predict CXCR4 usage of HIV-1 was calculated as follows: number of samples with an R5 phenotype accurately predicted as R5 by the genotype divided by the total number of samples with an R5 phenotype.

NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

**TABLE 4.** Performances of the V3 Genotype When Used to Predict the Exclusive CCR5 Usage of Subtype C Viruses

Genotypic Algorithm	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Combined 11/25 and net charge rules	96.4	93.3	98.1	87.5
Geno2pheno <sub>10</sub>	89.1	86.7	96.1	68.4
Subtype C PSSM <sub>SI/NSI</sub>	81.8	93.3	97.8	58.3
Subtype B PSSM <sub>X4/R5</sub>	92.7	80	94.4	75
Subtype B PSSM <sub>SI/NSI</sub>	98.2	80	94.7	92.3
C4.5	98.2	26.7	83.1	80
C4.5 positions 8–12	100	20	82.1	100
PART	100	33.3	84.6	100
SVM <sub>wetcat</sub>	96.4	53.3	88.3	80

Sensitivity of the genotype to predict exclusive CCR5 usage of HIV-1 was calculated as follows: number of samples with a pure R5 phenotype accurately predicted as R5 by the genotype divided by the total number of samples with a pure R5 phenotype. Specificity of the genotype to predict exclusive CCR5 usage of HIV-1 was calculated as follows: number of samples with an R5X4/X4 phenotype accurately predicted as X4 by the genotype divided by the total number of samples with an R5X4/X4 phenotype.

NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

those previously described for the subtype B, that is, basic amino acids at positions 11 and/or 25 of V3, an increased net charge of  $>+5$ , and the loss of the N-linked glycosylation site at the beginning of V3. We found that most CXCR4-using subtype C viruses harbored substitutions that replaced the proline and/or glutamine residues of the GPGQ crown with a positively charged amino acid, usually arginine. This suggests that the GPGQ crown is involved in limiting CXCR4 use, in agreement with previous observations.<sup>31</sup> But it is also noticed that a glycine and an isoleucine were inserted in V3 in 6 of the 14 CXCR4-using viruses. Screening of sequence databases revealed that these changes in V3 seemed to be specific to HIV-1 subtype C (data not shown). The GI insertion and the GRGQ motif are present in 30%–60% of the V3 sequences of previously characterized CXCR4-using subtype C viruses<sup>21,23</sup> but are always associated with other classical determinants of CXCR4 usage.

We assessed the performance of several genotypic algorithms built from subtype B for predicting the coreceptor usage of subtype C viruses because the genotypic determinants of CXCR4 usage for subtype C viruses seem generally similar to those of subtype B. The combined criteria from the 11/25 and net charge rules and the Geno2pheno tool accurately predicted the tropism of the vast majority of subtype C viruses. CXCR4-using viruses were detected with a sensitivity of 86.7%–93.3% and a specificity of 89.1%–96.4%, with Geno2pheno and the combined criteria from the 11/25 and net charge rules, respectively. The most reliable genotypic method for predicting CCR5 usage for subtype C viruses in our study was also the combined 11/25 and net charge rules (sensitivity 96.4%, specificity 93.3%). On the other hand, genotypic algorithms of the SVM group (SVM, C4.5, and PART) were rather insensitive and not suitable for predicting subtype C coreceptor usage. We also assessed the performance of the subtype C–specific PSSM tool.<sup>34</sup> Its sensitivity for detecting CXCR4-using viruses was 93.3%, similar to that of the combined criteria from the 11/25 and net charge rules, but its specificity was only 81.8%. In a recent study on HIV-1 subtype C in South Africa,<sup>21</sup> the subtype C PSSM tool was also highly sensitive for detecting CXCR4-using viruses (6 of 6 R5X4 or X4 viruses accurately predicted, 100%) but was less

specific (12 of 14 R5 viruses accurately predicted, 86%), as observed in our 2 groups of subtype C–infected patients. Large studies analyzing the correlation between the genotypic determination of HIV-1 tropism and the clinical response to CCR5 antagonists are needed to validate this approach in clinical practice. The detection threshold of minor CXCR4-using variants, which is clinically relevant, remains to be defined.

The study of genotype–phenotype correlations at the population level could be complicated by the presence of minor species. We further investigated 2 patients by clonal analysis. The genotypic and phenotypic assessments of the virus tropism performed on bulk virus populations were globally well correlated with the clonal composition of the quasispecies, as shown in a previous study.<sup>14</sup> However, there are some limitations, such as the risk of overestimating the V3 net charge on bulk genotypic analysis, if the positively charged amino acids are in different virus clones. Genotypic determinants of coreceptor usage located outside V3 could also explain some of the mispredictions.<sup>32,33</sup> Nevertheless, the V3-based genotypic algorithms, Geno2pheno and PSSM, accurately predicted the tropism of the vast majority of subtype C viruses.

In contrast, a recent study reported that the same genotypic bioinformatic tools performed poorly, including PSSM, when used to predict the coreceptor usage of non-B subtypes.<sup>15</sup> But this study globally assessed pooled V3 sequences from non-B viruses. Only 13 of the 115 non-B viruses assessed belonged to subtype C, and the performances for each particular subtype were not detailed. Subtype-specific genotype–phenotype correlations should be assessed because the genotypic determinants of coreceptor usage may be different for some particular subtypes.

In conclusion, we find that the genotypic determinants of coreceptor usage for HIV-1 subtype C are mainly located in V3 and are globally similar to those for subtype B viruses. Hence, the algorithm combining 11/25 and net charge rules and the Geno2pheno and PSSM tools, built from subtype B viruses, perform well for predicting the tropism of HIV-1 subtype C. Differences in the frequency of CXCR4-using subtype C viruses between the patients recruited in France and Malawi

could reflect recent changes in the subtype C epidemic in eastern and southern Africa. Additional studies are urgently needed to extend our knowledge of the genotypic determinants of coreceptor usage for various non-B subtypes, notably because the first CCR5 antagonist was recently approved for clinical use.

### ACKNOWLEDGMENTS

*We thank the patients for taking part in the study; all the people involved in the Chiradzulu programme in Malawi. The English text was checked by Owen Parkes.*

### REFERENCES

- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, et al. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*. 1996;272:1955–1958.
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996;381:661–666.
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*. 1996;381:667–673.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, et al. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 1996;272:872–877.
- Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, et al. A new classification for HIV-1. *Nature*. 1998;391:240.
- Dorr P, Westby M, Dobbs S, et al. Maraviroc (UK-427857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:4721–4732.
- Daar ES, Kesler KL, Petropoulos CJ, et al. Baseline HIV type 1 coreceptor tropism predicts disease progression. *Clin Infect Dis*. 2007;45:643–649.
- Shepherd JC, Jacobson LP, Qiao W, et al. Emergence and persistence of CXCR4-tropic HIV-1 in a population of men from the Multicenter AIDS Cohort Study. *J Infect Dis*. 2008;198:1104–1112.
- Waters L, Mandalia S, Randell P, et al. The impact of HIV tropism on decreases in CD4 cell count, clinical progression, and subsequent response to a first antiretroviral therapy regimen. *Clin Infect Dis*. 2008;46:1617–1623.
- Weiser B, Philpott S, Klimkait T, et al. HIV-1 coreceptor usage and CXCR4-specific viral load predict clinical disease progression during combination antiretroviral therapy. *AIDS*. 2008;22:469–479.
- De Jong JJ, De Ronde A, Keulen W, et al. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol*. 1992;66:6777–6780.
- Fouchier RA, Groenink M, Kootstra NA, et al. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol*. 1992;66:3183–3187.
- Raymond S, Delobel P, Mavigner M, et al. Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism. *AIDS*. 2008;22:F11–F16.
- Delobel P, Nugeyre MT, Cazabat M, et al. Population-based sequencing of V3 env for predicting the coreceptor usage of HIV-1 quasispecies. *J Clin Microbiol*. 2007;45:1572–1580.
- Garrido C, Roulet V, Chueca N, et al. Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *J Clin Microbiol*. 2008;46:887–891.
- Cecilia D, Kulkarni SS, Tripathy SP, et al. Absence of coreceptor switch with disease progression in human immunodeficiency virus infections in India. *Virology*. 2000;271:253–258.
- Choge I, Cilliers T, Walker P, et al. Genotypic and phenotypic characterization of viral isolates from HIV-1 subtype C-infected children with slow and rapid disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006;22:458–465.
- Engelbrecht S, de Villiers T, Sampson CC, et al. Genetic analysis of the complete gag and env genes of HIV type 1 subtype C primary isolates from South Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001;17:1533–1547.
- Morris L, Cilliers T, Bredell H, et al. CCR5 is the major coreceptor used by HIV-1 subtype C isolates from patients with active tuberculosis. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001;17:697–701.
- Ping LH, Nelson JA, Hoffman IF, et al. Characterization of V3 sequence heterogeneity in subtype C human immunodeficiency virus type 1 isolates from Malawi: underrepresentation of X4 variants. *J Virol*. 1999;73:6271–6281.
- Connell BJ, Michler K, Capovilla A, et al. Emergence of X4 usage among HIV-1 subtype C: evidence for an evolving epidemic in South Africa. *AIDS*. 2008;22:896–899.
- Michler K, Connell BJ, Venter WD, et al. Genotypic characterization and comparison of full-length envelope glycoproteins from South African HIV type 1 subtype C primary isolates that utilize CCR5 and/or CXCR4. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008;24:743–751.
- Cilliers T, Nhlapo J, Coetzer M, et al. The CCR5 and CXCR4 coreceptors are both used by human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from subtype C. *J Virol*. 2003;77:4449–4456.
- Papathanasopoulos MA, Cilliers T, Morris L, et al. Full-length genome analysis of HIV-1 subtype C utilizing CXCR4 and intersubtype recombinants isolated in South Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002;18:879–886.
- Johnston ER, Zijenah LS, Mutetwa S, et al. High frequency of syncytium-inducing and CXCR4-tropic viruses among human immunodeficiency virus type 1 subtype C-infected patients receiving antiretroviral treatment. *J Virol*. 2003;77:7682–7688.
- Ferradini L, Jeannin A, Pinoges L, et al. Scaling up of highly active antiretroviral therapy in a rural district of Malawi: an effectiveness assessment. *Lancet*. 2006;367:1335–1342.
- Baba M, Nishimura O, Kanzaki N, et al. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:5698–5703.
- Schols D, Struyf S, Van Damme J, et al. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J Exp Med*. 1997;186:1383–1388.
- Briggs DR, Tuttle DL, Sleasman JW, et al. Envelope V3 amino acid sequence predicts HIV-1 phenotype (co-receptor usage and tropism for macrophages). *AIDS*. 2000;14:2937–2939.
- Pollakis G, Kang S, Kliphuis A, et al. N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J Biol Chem*. 2001;276:13433–13441.
- Coetzer M, Cilliers T, Ping LH, et al. Genetic characteristics of the V3 region associated with CXCR4 usage in HIV-1 subtype C isolates. *Virology*. 2006;356:95–105.
- Groenink M, Andeweg AC, Fouchier RA, et al. Phenotype-associated env gene variation among eight related human immunodeficiency virus type 1 clones: evidence for in vivo recombination and determinants of cytotropism outside the V3 domain. *J Virol*. 1992;66:6175–6180.
- Chesebro B, Wehrly K, Nishio J, et al. Mapping of independent V3 envelope determinants of human immunodeficiency virus type 1 macrophage tropism and syncytium formation in lymphocytes. *J Virol*. 1996;70:9055–9059.
- Jensen MA, Coetzer M, van 't Wout AB, et al. A reliable phenotype predictor for human immunodeficiency virus type 1 subtype C based on envelope V3 sequences. *J Virol*. 2006;80:4698–4704.
- Delobel P, Sandres-Saune K, Cazabat M, et al. R5 to X4 switch of the predominant HIV-1 population in cellular reservoirs during effective highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;38:382–392.

### III Caractérisation du tropisme du HIV-1 en primo-infection

#### ARTICLE 5

« CXCR4-using viruses in plasma and peripheral blood mononuclear cells during primary HIV-1 infection and impact on disease progression »

Raymond S., Delobel P., Mavigner M., Cazabat M., Encinas E., Souyris C., Bruel P., Sandres-Sauné K., Marchou B., Massip P., and Izopet J.

**AIDS 2010** sous-presse.

Les virus utilisant CCR5 pour l'entrée prédominent classiquement au stade de la primo-infection à HIV-1, tandis que les virus capables d'utiliser CXCR4 (virus X4 ou R5X4) émergent chez la moitié des patients environ à un stade tardif de la maladie. Les variants X4 sont associés à une évolution péjorative de la maladie avec une accélération de la décroissance des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et une progression vers le stade SIDA. La prédominance des virus R5 chez les patients au stade d'infection récente a été observée quels que soient le mode de transmission du virus ou le tropisme du virus du patient source. Cependant, des études récentes réalisées en Espagne et en France ont montré que les virus X4 ou R5X4 n'étaient pas forcément très rares à ce stade de l'infection. Des fréquences d'environ 17% ont été rapportées chez des sujets nouvellement infectés. Les méthodes de détermination du tropisme utilisées dans ces études, ainsi que le compartiment analysé, plasma sanguin ou cellules du sang périphérique, pourraient expliquer les discordances des résultats.

Notre objectif a été de déterminer le tropisme du HIV-1 dans le plasma et les cellules du sang périphérique chez des individus au stade de primo-infection en utilisant des approches génotypiques et phénotypiques. La majorité des patients inclus dans cette étude étaient infectés par un virus de sous-type B.

La détermination phénotypique du tropisme par le TTT a permis de mettre en évidence 6,4% d'infections par des virus utilisant CXCR4 pour l'entrée en plus de CCR5. Aucun virus X4 pur n'a été mis en évidence lors de la primo-infection. Les virus de sous-types B et non-B présentaient des prévalences similaires de virus X4. Le tropisme du virus isolé à partir des cellules du sang périphérique était concordant à 98% avec le tropisme du virus plasmatique.

La détermination génotypique du tropisme a été effectuée par séquençage direct de la région V3 de l'enveloppe et l'application d'algorithmes génotypiques précédemment validés. La règle combinée 11/25 et charge nette a montré une concordance de 95% avec les résultats du phénotype pour la prédiction de l'utilisation des corécepteurs d'entrée à partir des échantillons plasmatiques. La prévalence des virus X4 estimée avec la règle combinée était de 6,4%, identique à celle estimée par le test phénotypique, alors que l'algorithme Geno2pheno<sub>10</sub> estimait la prévalence des virus X4 à 12%. Dans cette étude, l'algorithme Geno2pheno avec un taux de faux positif fixé à 10% surestimait donc la prévalence des virus X4 en primo-infection, tandis qu'avec un taux de faux positif fixé à 5,75%, récemment proposé par certains, la prévalence des virus X4 était estimée à 5,6%. Le génotype V3 déterminé à partir de l'ADN viral des cellules sanguines était très bien corrélé au tropisme déterminé à partir de l'ARN plasmatique (corrélation 98%).

La charge virale HIV-1 et le taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> lors du diagnostic de l'infection étaient similaires chez les patients infectés par des virus R5X4 ou par des virus R5. Les modes de transmission n'étaient pas différents dans les deux groupes, mais les usagers de drogue intraveineuse étaient plus fréquents dans le groupe infecté par un virus R5X4, ce qui s'accompagnait d'une prévalence plus élevée de l'infection par le virus de l'hépatite C dans ce groupe par comparaison au groupe infecté par un virus R5. La plus grande fréquence d'usagers de drogue intraveineuse dans le groupe des patients infectés par des virus R5X4 en primo-infection a déjà été observée et pourrait reposer sur une meilleure transmission des virus X4 par voie parentérale en raison de la plus grande abondance des lymphocytes T exprimant CXCR4 dans le sang circulant comparée à celle des lymphocytes T exprimant CCR5. De plus, dans notre étude, la transmission des virus R5X4 s'accompagnait du maintien de ces virus un an après le diagnostic de l'infection, contrairement à ce que d'autres études avaient pu montrer.

Nous avons également analysé l'impact du tropisme du virus transmis en primo-infection sur l'évolution clinique de la maladie en contrôlant deux paramètres susceptibles d'influencer la progression clinique, l'âge et la charge virale HIV-1 plasmatique. Seuls les patients n'ayant pas reçu de traitement antirétroviral au stade de primo-infection ont été inclus et le suivi était interrompu dès l'initiation d'un traitement antirétroviral. Chaque patient infecté par un virus R5X4 a été apparié pour l'âge et la charge virale HIV-1 plasmatique avec cinq patients infectés par un virus R5. Les taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> étaient similaires dans les deux groupes lors de l'inclusion. L'estimation de la survie par la méthode de Kaplan-Meier a montré que l'infection par un virus R5X4 était associée à une progression accélérée

de la maladie, avec une progression plus rapide vers un taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> inférieur à 350 cellules/mm<sup>3</sup> et un délai plus court avant l'initiation d'un traitement antirétroviral, par comparaison avec l'infection par un virus R5.

En conclusion, la prévalence des virus utilisant CXCR4 en primo-infection était de seulement 6,4% dans le plasma en utilisant un test phénotypique très sensible. La détermination du tropisme du HIV-1 au stade de la primo-infection dans le plasma sanguin ou dans les cellules du sang périphérique a donné des résultats concordants. Les algorithmes génotypiques les plus spécifiques prédisaient correctement le tropisme du virus, mais une moindre spécificité ou la combinaison des algorithmes génotypiques pourraient être à l'origine d'une surestimation de la prévalence des virus X4. Enfin, il sera intéressant d'étudier l'impact du tropisme du virus ayant permis l'établissement de l'infection sur l'évolution du nombre de lymphocytes T CD4 circulant chez les patients sous traitement antirétroviral efficace.

# CXCR4-using viruses in plasma and peripheral blood mononuclear cells during primary HIV-1 infection and impact on disease progression

Stéphanie Raymond<sup>a,b,c</sup>, Pierre Delobel<sup>a,b,d</sup>, Maud Mavigner<sup>a</sup>,  
Michelle Cazabat<sup>a,c</sup>, Stéphanie Encinas<sup>a,c</sup>, Corinne Souyris<sup>a,c</sup>,  
Patrick Bruel<sup>a,c</sup>, Karine Sandres-Sauné<sup>a,b,c</sup>, Bruno Marchou<sup>d</sup>,  
Patrice Massip<sup>d</sup> and Jacques Izopet<sup>a,b,c</sup>

**Objective:** Cysteine-cysteine receptor 5 (CCR5)-using viruses classically predominate during HIV-1 primary infection but the frequency of cysteine-X-cysteine receptor 4 (CXCR4)-using viruses varies between studies and could be different between plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Thus, we determined HIV-1 tropism in both these compartments during primary infection and evaluated the impact of CXCR4-using viruses on disease progression.

**Design:** One hundred and thirty-three patients with primary HIV-1 infection were screened for HIV-1 coreceptor usage in plasma and PBMCs using both genotypic and phenotypic methods. The impact of CXCR4-using viruses' transmission on subsequent disease progression was assessed in a case-control study.

**Methods:** HIV-1 coreceptor usage was determined using a recombinant virus phenotypic entry assay and V3-based genotypic algorithms. We also monitored CD4<sup>+</sup> T-cell count, clinical events and therapeutic intervention.

**Results:** There was 6.4% of CXCR4-using HIV-1 in plasma during primary infection as measured by a phenotypic assay and combined criteria from the 11/25 and net charge genotypic rules. Geno2pheno<sub>10</sub> overestimated the prevalence of CXCR4-using viruses (12%). HIV-1 tropism in plasma and PBMCs was 98% concordant. The HIV-1 RNA load and CD4<sup>+</sup> T-cell count during primary infection were not related to virus tropism. Primary infection with CXCR4-using viruses was associated with an accelerated rate of disease progression, estimated by a faster decline of CD4<sup>+</sup> T-cell count under 350 cells/ $\mu$ l and by a reduced delay in initiating a first antiretroviral treatment.

**Conclusions:** Plasma or PBMC samples can be used for determining HIV-1 tropism during primary infection. CXCR4-using viruses are rare during primary infection but increase the risk of disease progression.

© 2010 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

*AIDS* 2010, **24**:2305–2312

**Keywords:** coreceptor, disease progression, entry phenotype, HIV-1 tropism, primary infection, V3 genotype

## Introduction

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) enters CD4-expressing cells using one or both of the chemokine

receptors cysteine-cysteine receptor 5 (CCR5) and cysteine-X-cysteine receptor 4 (CXCR4). CCR5-using viruses are classified as R5 variants, CXCR4-using viruses are classified as X4 variants, and viruses using both

<sup>a</sup>INSERM, U563 Toulouse, <sup>b</sup>Université Toulouse III Paul-Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, <sup>c</sup>CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Laboratoire de Virologie, and <sup>d</sup>CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Toulouse, France.

Correspondence to Jacques Izopet, CHU de Toulouse, Hôpital Purpan, Laboratoire de Virologie, Toulouse F-31300, France.

Tel: +33 5 67 69 04 24; fax: +33 5 67 69 04 25; e-mail: izopet.j@chu-toulouse.fr

Received: 20 April 2010; revised: 23 June 2010; accepted: 14 July 2010.

DOI:10.1097/QAD.0b013e32833e50bb

coreceptors are classified as R5X4 dualtropic variants [1]. A virus population may use both coreceptors because it contains R5X4 dualtropic clones and/or a mixture of pure R5 and X4 virus clones (dual/mixed R5X4 phenotype). R5 viruses usually predominate early in a HIV-1 infection, whereas R5X4 or X4 viruses emerge in half the patients at late stages [2,3]. The X4 variants present late in the infection are associated with the accelerated decline of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and progression to AIDS [2,4,5]. HIV-1 tropism in recent seroconverters seems to be restricted to R5 variants whatever the transmission route and the tropism of the variants in the source [6]. The mechanisms underlying the selective advantage of CCR5-tropic viruses in establishing an HIV-1 infection are poorly understood. It may be that target cells and tissues important for establishing the initial infection preferentially express CCR5 and/or there is an immune response preferentially directed against CXCR4-using viruses. The classic view that CCR5-tropic viruses massively predominate during primary HIV-1 infection has been challenged by recent finding that X4/R5X4 viruses are not necessarily rare during HIV-1 primary infection. Frequencies of 3–17.2% have been reported depending on the assay used to measure HIV-1 tropism [7–10].

HIV-1 coreceptor usage can be assessed by phenotypic assays, mainly using recombinant virus assays, or by culturing the HIV-1 isolate on MT-2 cells [11–13]. Genotypic assays that analyze the V3 region of *env* have also been developed for predicting HIV-1 tropism [14–16]. Phenotypic methods indicated that the plasma of patients with recent seroconversion contained about 3% of CXCR4-using viruses [9,10]. By contrast, genotypic methods found 13.4–17.2% of CXCR4-using viruses in the plasma of primary infected patients [7,17]. Another recent study using genotypic methods found 15.9% of CXCR4-using viruses in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of recently infected patients [18]. Cases of rapid disease progression after the transmission of CXCR4-using variants have been reported [5,19,20]. But the impact of the tropism of transmitted virus on the subsequent clinical evolution has rarely been studied in cohorts [10]. Moreover, characterization of HIV-1 tropism in primary infection is now of therapeutic interest because CCR5 antagonists have been developed.

The aim of this study was to determine the HIV-1 coreceptor usage in the plasma and PBMCs of patients with a primary HIV-1 infection using both phenotypic and genotypic approaches. We also monitored the biological and clinical outcomes of these patients to evaluate the impact of HIV-1 tropism on disease progression.

## Methods

### Study population and samples

We studied 133 consecutive patients with a primary HIV-1 infection treated at Toulouse University Hospital,

France, between 1995 and 2008. They all gave their informed consent for virological studies. Plasma samples were collected from each patient and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Samples of peripheral whole blood were also collected after 2000, and the Ficoll-separated PBMCs were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Recent HIV-1 seroconversion was defined as patients with a negative anti-HIV-1 antibody test and positive plasma HIV-1 RNA; a positive HIV-1 antibody test and a negative or indeterminate immunoblot, confirmed positive later; HIV-1 seropositivity that was seronegative when tested within the previous 6 months. Plasma HIV-1 RNA was measured by Amplicor HIV-1 Monitor until June 2004 and by COBAS Ampliprep/COBAS Taqman HIV test (Roche) thereafter. Genotypic resistance analyses were performed by the consensus method of the AC11 ANRS Resistance Group (<http://www.hivfrenchresistance.org>). CD4<sup>+</sup> T cells were counted by flow cytometry.

### Case-control study

We studied the impact of R5X4/X4 virus transmission on subsequent disease progression. Patients who were given antiretroviral treatment during the first 6 months following primary infection were excluded from this analysis. Each patient infected with an R5X4/X4 virus was matched with five control patients infected with an R5 virus for age ( $\pm 5$  years) and HIV-1 RNA load at the time of primary infection ( $\pm 0.5$  log copies/ml) because these two factors are associated with disease progression. Patients' follow-up was censored when antiretroviral therapy was started.

### Phenotypic characterization of HIV-1 coreceptor usage

Phenotypic characterization of HIV-1 tropism was performed using the Toulouse Tropism Test assay [21]. Briefly, a fragment encompassing the gp120 and the ectodomain of gp41 was amplified by RT-PCR using HIV-1 RNA isolated from the plasma or by PCR from HIV-1 DNA taken from PBMCs. The PCR products then underwent nested PCR. Two amplifications were performed in parallel from each sample and pooled to prevent sampling bias of the assessed virus population.

The phenotype of HIV-1 coreceptor usage was determined using a recombinant virus entry assay with the pNL43- $\Delta env$ -Luc2 vector. 293T cells were cotransfected with NheI-linearized pNL43- $\Delta env$ -Luc2 vector DNA and the product of the nested PCR obtained from the challenged HIV-1-containing sample. The chimeric recombinant virus particles released into the supernatant were used to infect U87 indicator cells bearing CD4 and either CCR5 or CXCR4. Virus entry was assessed by measuring the luciferase activity in lysed cells [as relative light units (RLUs)]. Minor X4 variants were detectable when present at 0.5% or higher. The reproducibility of the assay was assessed by 35 repeated experiments with the reference strains HXB2 and BaL; the coefficient of



variation was 3.4–6.2% in both U87 indicator cell lines.

### Genotypic prediction of HIV-1 coreceptor usage

The V3 region was directly sequenced from bulk *env* PCR products in both directions by the dideoxy chain termination method (BigDye Terminator v.3.1, Applied Biosystems) on an ABI 3130 DNA sequencer. Results were analyzed with Sequencher (Genecodes), blinded to the phenotype. Minor species were detected when the automated sequencer electrophoregram showed a second base peak. Multiple alignments were performed with CLUSTALW 1.83 (Conway Institute UCD Dublin), and sequence alignments were manually edited using BioEdit software. Phylogenetic analyses of the PCR product sequences excluded any possibility of sample contamination (see supplementary figure, <http://links.lww.com/QAD/A72>).

We used a combination of criteria from the 11/25 and net charge rules to predict HIV-1 tropism from the V3 genotype [16]. One of the following criteria is required for predicting CXCR4 coreceptor usage: 11R/K and/or 25K; 25R and a net charge of at least +5; a net charge of at least +6. The V3 net charge was calculated by subtracting the number of negatively charged amino acids (D and E) from the number of positively charged ones (K and R). All possible permutations were assessed when amino acid mixtures were found at some codons of V3. The combination resulting in the highest net charge was used to predict the tropism. We also compared the performances of these combined criteria for detecting CXCR4-using viruses with that of the bioinformatic tool Geno2pheno with false-positive rates of 10 and 5.75% [22]. Geno2pheno is available at <http://coreceptor.bioinf.mpi-sb.mpg.de/cgi-bin/coreceptor.pl> (January 2010).

### Statistical methods

We used STATA 8.0 (Stata Corporation, Grand Forks, North Dakota, USA) software for statistical analysis. Continuous variables were tested with the Mann–Whitney test. Categorical variables were tested by the chi-squared test or the Fisher's test. A statistically significant difference was defined as a *P* value of less than 0.05. Kaplan–Meier curves were used to provide a graphic representation of the time to disease progression according to virus tropism. Events were defined as a CD4<sup>+</sup> T-cell count dropping below 350 cells/μl, or the initiation of antiretroviral therapy. The log rank test was used to compare groups.

### Nucleotide sequence accession numbers

The sequences reported here were given Genbank accession numbers HM239515 to HM239639 for plasma RNA sequences and HM246186 to 246241 for cellular DNA sequences.

## Results

### Patient characteristics

We identified and prospectively monitored 133 patients who were at the stage of primary infection during the 13-year study. The median follow-up time was 31 months [interquartile range (IQR) 12–68]. The clinical, virological, and immunological characteristics of the patients are shown in Table 1. Their median age was 35 years and 83.5% were men. Most (85%) were infected with HIV-1 subtype B, but 15% had non-B subtypes (CRF01, CRF02, A, C, D, F1 and G). The median HIV-1 virus load was 5.5 log copies/ml; (IQR 4.5–6.5). The median CD4 cell count was 479 cells/μl (IQR 325–653) and the percentage of CD4 cells was 24% (IQR 16–32). Ten per cent of the patients harbored HIV-1 viruses resistant to at least one class among the nucleoside reverse transcriptase inhibitors, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors or protease inhibitors of HIV-1.

### Entry phenotype of HIV-1 at the time of primary infection

#### *Phenotypic characterization of coreceptor usage from plasma HIV-1 RNA*

The *env* gene was successfully amplified from plasma of 126 of the 133 patients. The phenotype was then determined for 125 of these 126 patients (94% of samples) and recombination failed for one sample. Amplification failed for three non-B subtype viruses and four subtype B viruses, probably because of mismatches in the priming site due to HIV-1 polymorphisms. We found 117 virus populations with an R5 phenotype and eight with a dual/mixed R5X4 phenotype. No virus had a pure X4 phenotype. There was thus 6.4% of CXCR4-using HIV-1 at the time of primary infection. We performed a phylogenetic analysis to exclude the possibility that the R5X4 variants belonged to a single transmission cluster; only two patients had related R5X4 viruses. The patients harboring subtype B viruses (7/109 subtype B, 6.4%) and those harboring non-B viruses (1/16 non-B subtypes, 6.2%) had similar percentages of CXCR4-using HIV-1.

**Table 1. Baseline characteristics of 133 patients with primary infection.**

Age (years), median (IQR)	35 (28.5–43)
Men, no. (%)	111 (83.5)
Transmission route, no. (%)	
Heterosexual	34 (25.6)
Homosexual	73 (54.9)
Intravenous drug use	4 (3)
Unknown	22 (16.5)
HIV-1 subtype B, no. (%)	113 (85)
HIV-1 resistance mutation to at least one drug, no. (%)	13 (10.2)
HIV-1 RNA load (log copies/ml)	
Median (IQR)	5.5 (4.5–6.5)
CD4 cell count (cells/μl)	
Median (IQR)	479 (325–653)
CD4 cell count (%)	
Median (IQR)	24 (16–32)

**Table 2. RLU signals of CXCR4-using viruses from plasma and PBMCs.**

Sample	Plasma HIV-1 RNA			Cellular HIV-1 DNA		
	Log RLU <sup>a</sup> signal		Tropism	Log RLU <sup>a</sup> signal		Tropism
	CCR5 <sup>+</sup> cells	CXCR4 <sup>+</sup> cells		CCR5 <sup>+</sup> cells	CXCR4 <sup>+</sup> cells	
BaL control	7.47	1.6	R5	6.94	1.35	R5
HXB2 control	2.05	7.49	X4	1.58	6.35	X4
Patient 15	6.58	6.85	R5X4	N/A <sup>b</sup>	N/A <sup>b</sup>	
Patient 23	4.13	6.02	R5X4	2.86	4.67	X4
Patient 55	7.41	6.62	R5X4	N/A <sup>b</sup>	N/A <sup>b</sup>	
Patient 87	6.84	7.13	R5X4	N/A <sup>b</sup>	N/A <sup>b</sup>	
Patient 93	7.06	6.6	R5X4	4.39	4.76	R5X4
Patient 95	7.51	4.12	R5X4	N/A <sup>b</sup>	N/A <sup>b</sup>	
Patient 106	7.62	4.94	R5X4	N/A <sup>b</sup>	N/A <sup>b</sup>	
Patient 111	5.85	5.39	R5X4	4.44	5.05	R5X4

N/A, not available; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; RLU, relative light unit.

<sup>a</sup>RLU, relative light units of luciferase.

<sup>b</sup>N/A, not available.

The only CRF01 strain was R5X4 and there was no R5X4 viruses among nine CRF02, one subtype A, one subtype C, one subtype D, one subtype F, one subtype G and one undetermined subtype. Five patients harbored dual/mixed R5X4 virus populations able to use both coreceptors with similar entry efficiencies (Table 2). In contrast, two patients (patients 95 and 106) harbored a dual/mixed R5X4 virus population that infected CXCR4<sup>+</sup> cells less efficiently than CCR5<sup>+</sup> cells; whereas one patient (patient 23) harbored a dual/mixed R5X4 virus population that infected CXCR4<sup>+</sup> cells more efficiently than CCR5<sup>+</sup> cells.

#### *Phenotypic characterization of coreceptor usage from cellular HIV-1 DNA*

Peripheral blood mononuclear cells were available for 74 patients, recruited after 2000, and gp140 was successfully amplified for 56 of them. The failure rate of amplification may be explained by mismatches in the priming site due to HIV-1 polymorphism and by the virus DNA load in cell samples being lower than the virus RNA load in the plasma. The phenotype was determined for 54 of the 56 amplified samples with 51 virus populations using exclusively CCR5, two dual/mixed R5X4 virus populations (patients 93 and 111) and one virus population using exclusively CXCR4 (patient 23). Thus the prevalence of CXCR4-using HIV-1 in PBMCs was 5.6%.

The 51 R5 and the two dual/mixed R5X4 virus populations identified in the PBMCs were concordant with the results for the plasma. Patient 23 harbored a virus population phenotyped as purely X4 in his PBMCs but dual/mixed R5X4 in his plasma. HIV-1 tropism in the plasma and PBMCs from patients at the stage of primary infection was thus 98% concordant.

#### **Genotypic prediction of HIV-1 tropism during primary infection**

##### *Genotypic prediction of tropism from plasma HIV-1 RNA*

We obtained the V3 genotype of plasma HIV-1 by direct sequencing from bulk *env* PCR products from 125 of the 126 patients for whom the *env* gene had successfully been amplified. The combined criteria from the 11/25 and net charge rules predicted 117 CCR5 and eight CXCR4-using virus populations (predicted prevalence of CXCR4-using viruses in plasma of 6.4%), whereas Geno2pheno<sub>10</sub> predicted 110 CCR5 and 15 CXCR4-using virus populations (predicted prevalence of CXCR4-using viruses in plasma of 12%). The capacity of the genotype to predict the observed phenotype was determined for 124 plasma samples that had been characterized by both assays (Table 3). The combined criteria from the 11/25 and net charge rules accurately predicted the entry phenotype of 113/116 CCR5-using viruses and 5/8 CXCR4-using viruses (concordance with observed phenotype 95.2%). Geno2pheno<sub>10</sub> accurately predicted 107 CCR5-using viruses and six CXCR4-using viruses (concordance 91.1%). Geno2pheno with an optimized cut-off at 5.75% accurately predicted 114/116 CCR5-using viruses and 5/8 CXCR4-using viruses (concordance 96%).

##### *Genotypic prediction of tropism from cellular HIV-1 DNA*

The V3 genotype was also characterized for the 56 patients whose HIV-1 DNA had been amplified successfully. The combined rule classified 53 CCR5 and three CXCR4-using virus populations (predicted prevalence of CXCR4-using viruses in PBMCs of 5.4%), whereas Geno2pheno<sub>10</sub> predicted 51 CCR5 and five CXCR4-using viruses (predicted prevalence of CXCR4-using viruses in PBMCs of 8.9%). The observed

**Table 3. Comparison of the genotypic prediction of HIV-1 tropism and the observed entry phenotype in plasma and cellular viruses during primary infection.**

Genotype	Phenotype		Concordance <sup>a</sup>
	R5	R5X4/X4	
Plasma HIV-1 RNA			
Combined 11/25 and net charge rule	R5 113 X4 3	3 5	95.2%
Geno2pheno <sub>10</sub>	R5 107 X4 9	2 6	91.1%
Geno2pheno <sub>5,75</sub>	R5 114 X4 2	3 5	96%
Cellular HIV-1 DNA			
Combined 11/25 and net charge rule	R5 51 X4 0	0 3	100%
Geno2pheno <sub>10</sub>	R5 49 X4 2	0 3	96.3%
Geno2pheno <sub>5,75</sub>	R5 51 X4 0	0 3	100%

<sup>a</sup>Concordance between each genotypic algorithm and the phenotype was calculated as follows: number of samples with a concordant R5 genotype and phenotype plus number of samples with a concordant R5X4/X4 genotype and phenotype, the whole divided by the total number of tested samples.

phenotype for 54 samples and the genotype determined with the combined rule or with Geno2pheno<sub>5,75</sub> were in complete agreement (100%), whereas the genotype determined with Geno2pheno<sub>10</sub> was almost as good (96.3%) (Table 3).

The V3 genotype predicted from HIV-1 DNA in the PBMCs correlated well with the tropism predicted from HIV-1 RNA in the plasma. Fifty-five viruses were concordant in the plasma and PBMCs using the combined rule or Geno2pheno to predict HIV-1 tropism. There was only one discordance between a plasma sequence predicted as CXCR4-using and the sequence of virus DNA predicted as CCR5-using. This difference is explained by a double population S/R at position 11 of V3 on the plasma virus, thus predicting a CXCR4-using

virus, whereas there was only an S residue on the viral DNA at this position.

### Relationships between HIV-1 tropism and characteristics of the patients at the time of primary infection

The characteristics of patients according to their plasma HIV-1 tropism are shown in Table 4. R5X4-infected patients were younger (median age 29 years), with fewer men (50%), than the R5-infected patients (37 years) and mostly men (88%). The HIV-1 transmission route was similar in both groups. But more of the R5X4 group were intravenous drug users (IDUs) (2/8 patients) than the R5 group (2 of 97 patients with known risk factors) ( $P=0.028$ ) (Table 4). In agreement with the higher frequency of IDUs among the patients harboring R5X4

**Table 4. Relationships between HIV-1 tropism in plasma and patient characteristics at the time of primary infection.**

Characteristics at baseline	Entry phenotype		<i>P</i> value
	R5X4 ( <i>n</i> =8)	R5 ( <i>n</i> =117)	
Age (years), median (IQR)	29 (19–37)	37 (30–43)	0.035
Men, no. (%)	4 (50)	103 (88)	0.015
Transmission route, no.			
Heterosexual	3	26	0.39
Homosexual	3	69	0.28
Intravenous drug use	2	2	0.028
Unknown	0	20	
T CD4 <sup>+</sup> cell count (cells/μl), median (IQR)	482 (399–768)	481 (317–652)	0.36
Positive HCV RNA, no. (%)	4 (50)	3 (2.6)	<0.0001
HIV-1 RNA load (log copies/ml), median (IQR)	5.9 (4.0–5.8)	5.6 (4.6–6.6)	0.27
Patients with HIV non-B subtype, no. (%)	1 (12.5)	13 (11.5)	1
HIV resistant to antiretroviral drug, no.	0	13	0.6
Year of seroconversion			
1995–1999	3	14	
2000–2004	2	42	0.128
2005–2008	3	61	

viruses, more of these patients were infected with hepatitis C virus (HCV) than in the R5 group. The HIV-1 viral load, CD4<sup>+</sup> T-cell count and the frequency of drug-resistant viruses at the time of the primary infection were similar in the two groups. We also analyzed a subgroup of patients diagnosed at an early stage of infection, when the HIV-1 antibody test was negative or the immunoblot was indeterminate. The four R5X4-infected patients and the 65 R5-infected patients had similar HIV-1 virus loads and CD4<sup>+</sup> T-cell counts. The prevalence of CXCR4-using viruses during primary infection did not vary throughout the study period.

### Impact of HIV-1 tropism during primary infection on the course of the subsequent infection

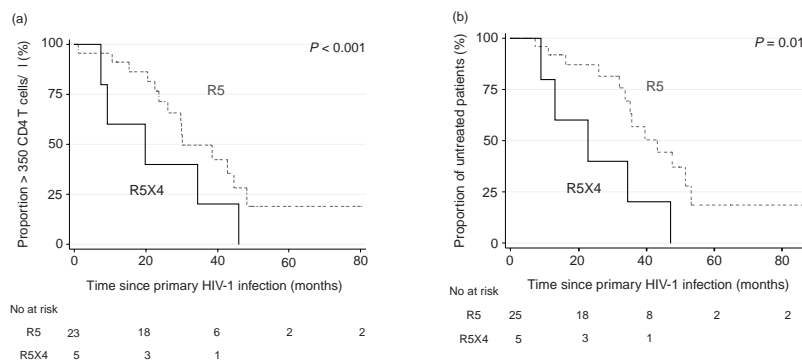
We studied the patients who were not given any antiretroviral treatment at the stage of primary infection to compare the natural evolution of the CD4<sup>+</sup> T-cell count and the delay before the first antiretroviral treatment in the patients infected with R5 and R5X4 viruses. Five R5X4-infected patients were analyzed and each of them was matched with five R5-infected control patients for age and baseline HIV-1 RNA load. We assessed HIV-1 coreceptor usage one year after the first characterization in four patients initially infected with dual/mixed R5X4 viruses. All four patients were persistently infected with R5X4 viruses (data not shown). Age and HIV-1 RNA load were similar in both groups, with medians of 30 years (IQR 22–39) in the R5X4 group and of 31 years (IQR 25–36) in the R5 group ( $P=0.8$ ), and medians of 5.0 log copies/ml (IQR 4.0–6.1) in the R5X4 group and of 4.9 log copies/ml (IQR 4.3–5.5) in the R5 group ( $P=0.9$ ). The CD4 cell counts at baseline were also similar, with medians of 477 cells/ $\mu$ l (IQR 386–850) in the R5X4 group and of 599 cells/ $\mu$ l (IQR 432–725) in the R5 group ( $P=0.88$ ). Kaplan–Meier estimate of the proportion of patients who

progressed to CD4<sup>+</sup> T-cell count under 350 cells/ $\mu$ l, stratified according to HIV-1 tropism, revealed that infection with R5X4 viruses was associated with an accelerated rate of disease progression (log rank test  $P<0.001$ ) (Fig. 1a). Infection with R5X4 viruses was also associated with a reduced delay in initiating a first antiretroviral treatment (log rank test  $P=0.01$ ) (Fig. 1b).

## Discussion

The determination of HIV-1 coreceptor usage is now of therapeutic interest as CCR5 antagonists have recently been developed. Conflicting results have recently been reported regarding the frequency of CXCR4-using viruses during HIV-1 primary infection. Previous studies have suggested that CCR5-using viruses overwhelmingly predominate during primary HIV-1 infection [2,3]. But recent studies using genotypic methods have found a prevalence of about 15% CXCR4-using viruses at this stage [7,17,18], particularly in PBMCs. We therefore investigated HIV-1 tropism during primary infection using an ultrasensitive phenotypic assay to examine the virus in both the plasma and PBMCs.

Phenotypic characterization of HIV-1 in the plasma indicated that dual-mixed R5X4 virus populations accounted for 6.4% of the total in patients with recent seroconversion, with the prevalence being similar in subtype B and non-B HIV-1 subtypes. These results are close to the 3% of CXCR4-using viruses in the plasma of recent seroconverters previously estimated with phenotypic methods [9,10]. More of the patients infected with dual-mixed R5X4 viruses were intravenous drug users than were those infected with R5 viruses. Phylogenetic analysis excluded a cluster of transmission with a unique strain of R5X4 viruses among the intravenous drug users.



**Fig. 1. Progression-free survival among untreated patients.** (a) Progression was defined in Kaplan–Meier curve as a CD4 T-cell count of less than 350 cells/ $\mu$ l (log rank test). Patients harboring R5X4 viruses (black solid line,  $n=5$ ) were compared to controls harboring R5 viruses (gray dashed line,  $n=25$ ). The table below the graph indicates the number of patients at risk in each group at the different times of the study. (b) Progression was defined in Kaplan–Meier curve as initiating an antiretroviral treatment (log rank test). Patients harboring R5X4 viruses (black solid line,  $n=5$ ) were compared to controls harboring R5 viruses (gray dashed line,  $n=25$ ). The table below the graph indicates the number of patients at risk in each group at the different times of the study.

The increased frequency of R5X4 virus among the patients infected via the parenteral route could be linked to the CXCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells being more abundant than CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in the blood [23]. By contrast, CCR5-expressing target cells are abundant in genital and rectal mucosae. Nevertheless, counterselection of CXCR4-using viruses following their transmission via the parenteral route had been reported [24,25], suggesting that the global advantage of R5 viruses in establishing primary HIV-1 infection is not only related to the mucosal transmission step. The transmitted R5X4 viruses were not counterselected in our study and remained predominant after the acute phase of the infection in all four patients whose longitudinal samples were analyzed. Others have reported similar findings [7,26] but larger studies are required to explore viral tropism in this transmission group. In addition, the patients infected with R5X4 viruses were younger and more often female than those harboring R5 viruses. This was not related to any specific characteristics of the intravenous drug user population, as women and young people were not over-represented in this particular group. We have determined HIV-1 tropism using phenotypic methods in both plasma and PBMC samples taken from recently infected patients. HIV-1 tropism in the two compartments was 98% concordant. A recent study suggested that CXCR4-using viruses were more frequent in PBMCs than in the plasma of patients with advanced disease [27]. However, the virus population during the first few months of HIV-1 infection is more homogenous than later in the disease evolution. This may explain why the HIV-1 tropism in the cellular and plasma compartments are similar at this stage. Thus, data for the plasma compartment during primary infection do not underestimate the prevalence of CXCR4-using viruses.

Several studies have shown that genotypic methods can be used to accurately determine HIV-1 tropism in chronically infected patients [14,16,17,28]. But little is known about how they perform during primary infection. We sequenced the V3 region of *env* from plasma HIV-1 RNA and used the combination of the 11/25 and net charge rules to predict coreceptor usage [16]. The concordance between the observed phenotype and the combined rule was better than 95% using both plasma and PBMC samples. The Geno2pheno<sub>10</sub> bioinformatic algorithm also performed well with a concordance better than 91% using samples from both compartments.

Genotypic methods predicted the prevalence of CXCR4-using viruses in the plasma to be 6.4% with the combined rule, and 12% with Geno2pheno<sub>10</sub>. The unexpected high prevalence of CXCR4-using viruses during primary infection found by others [7,17,18] may be due to the use of genotypic algorithms that overestimated the number of CXCR4-using viruses. We found that the Geno2pheno<sub>10</sub> positive predictive value was only 40% for plasma samples (six samples well

predicted X4 divided by a total of 15 samples predicted X4 by Geno2pheno<sub>10</sub>). Specificity was also significantly reduced by combining several genotypic algorithms in order to increase the sensitivity of detecting CXCR4-using viruses [7,8,18], and prevalence of CXCR4-using viruses was thus overestimated. Geno2pheno algorithm is now available with an optimized cut-off at 5.75% (false-positive rate). Using this new algorithm estimated better the prevalence of CXCR4-using viruses in this set of samples (5.6%).

CXCR4-using viruses are considered to be more pathogenic than R5 viruses, including at the time of primary infection in a few studies [7,19]. Previous studies have not agreed on the correlation between the CD4<sup>+</sup> T-cell count and HIV-1 tropism at the stage of primary infection [8,18]. HIV-1 coreceptor usage could influence the clinical evolution of these patients, as observed in other groups of patients [29,30]. We find that the CD4<sup>+</sup> T-cell counts in patients infected with R5 viruses and in those infected with R5X4 viruses are similar at the time of primary infection. We compared the clinical evolution of patients infected with CCR5 or CXCR4-using viruses in a case-control study. The patients infected with CXCR4-using viruses at the time of primary infection had an increased risk of disease progression, estimated by a CD4<sup>+</sup> T lymphocyte count under 350 cells/ $\mu$ l or by initiation of a first antiretroviral treatment.

In conclusion, the prevalence of CXCR4-using viruses at the time of primary infection was only of 6.4% in the plasma using an ultrasensitive phenotypic method. HIV-1 tropism in paired plasma and PBMC samples was essentially the same (concordance 98%) at the time of primary infection. The capacity of genotypic algorithms to predict CXCR4 usage by viruses identified during HIV-1 primary infection was similar to that previously described for viruses identified at a later stage of the disease. However, the use of low-specificity genotypic algorithms, or their combination to increase their sensitivity can lead to overestimation of the prevalence of CXCR4-using viruses. Finally, larger studies are required to confirm the negative impact of the transmitted CXCR4-using viruses on the subsequent evolution of HIV-1 disease.

## Acknowledgements

Author contributions: S.R., P.D., and J.I. designed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript. M.C., S.E., C.S. and P.B. performed the experiments. M.M., B.M. and P.M. contributed substantially to study conception and provided clinical samples. K.S.-S. performed statistical analysis.

The English text was checked by Owen Parkes.

Financial support: INSERM U563

## References

- Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, *et al.* **A new classification for HIV-1.** *Nature* 1998; **391**:240.
- Schuitmaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, van Steenwijk RP, *et al.* **Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocyctotropic to T-cell-tropic virus population.** *J Virol* 1992; **66**:1354–1360.
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM. **Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease.** *Annu Rev Immunol* 1999; **17**:657–700.
- Markowitz M, Mohri H, Mehandru S, Shet A, Berry L, Kalyanaraman R, *et al.* **Infection with multidrug resistant, dual-tropic HIV-1 and rapid progression to AIDS: a case report.** *Lancet* 2005; **365**:1031–1038.
- Yu XF, Wang Z, Vlahov D, Markham RB, Farzadegan H, Margolick JB. **Infection with dual-tropic human immunodeficiency virus type 1 variants associated with rapid total T cell decline and disease progression in injection drug users.** *J Infect Dis* 1998; **178**:388–396.
- van't Wout AB, Kootstra NA, Mulder-Kampinga GA, Albrecht-van Lent N, Scherpbier HJ, Veenstra J, *et al.* **Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission.** *J Clin Invest* 1994; **94**:2060–2067.
- de Mendoza C, Rodriguez C, Garcia F, Eiros JM, Ruiz L, Caballero E, *et al.* **Prevalence of X4 tropic viruses in patients recently infected with HIV-1 and lack of association with transmission of drug resistance.** *J Antimicrob Chemother* 2007; **59**:698–704.
- de Mendoza C, Van Baelen K, Poveda E, Rondelez E, Zahonero N, Stuyver L, *et al.* **Performance of a population-based HIV-1 tropism phenotypic assay and correlation with V3 genotypic prediction tools in recent HIV-1 seroconverters.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; **48**:241–244.
- Eshleman SH, Husnik M, Hudelson S, Donnell D, Huang Y, Huang W, *et al.* **Antiretroviral drug resistance, HIV-1 tropism, and HIV-1 subtype among men who have sex with men with recent HIV-1 infection.** *AIDS* 2007; **21**:1165–1174.
- Shepherd JC, Jacobson LP, Qiao W, Jamieson BD, Phair JP, Piazza P, *et al.* **Emergence and persistence of CXCR4-tropic HIV-1 in a population of men from the multicenter AIDS cohort study.** *J Infect Dis* 2008; **198**:1104–1112.
- Coakley E, Reeves JD, Huang W, Mangas-Ruiz M, Maurer I, Harskamp AM, *et al.* **Comparison of human immunodeficiency virus type 1 tropism profiles in clinical samples by the Trofile and MT-2 assays.** *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**:4686–4693.
- Skrabal K, Low AJ, Dong W, Sing T, Cheung PK, Mammano F, Harrigan PR. **Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting: degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model.** *J Clin Microbiol* 2007; **45**:279–284.
- Whitcomb JM, Huang W, Fransen S, Limoli K, Toma J, Wrin T, *et al.* **Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**:566–575.
- Delobel P, Nugeyre MT, Cazabat M, Pasquier C, Marchou B, Massip P, *et al.* **Population-based sequencing of V3 env for predicting the coreceptor usage of HIV-1 quaspecies.** *J Clin Microbiol* 2007; **45**:1572–1580.
- Jensen MA, Li FS, van't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, *et al.* **Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences.** *J Virol* 2003; **77**:13376–13388.
- Raymond S, Delobel P, Mavigner M, Cazabat M, Souyris C, Sandres-Saune K, *et al.* **Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism.** *AIDS* 2008; **22**:F11–16.
- Poveda E, Briz V, de Mendoza C, Benito JM, Corral A, Zahonero N, *et al.* **Prevalence of X4 tropic HIV-1 variants in patients with differences in disease stage and exposure to antiretroviral therapy.** *J Med Virol* 2007; **79**:1040–1046.
- Frange P, Galimand J, Goujard C, Deveau C, Ghosn J, Rouzioux C, *et al.* **High frequency of X4/DM-tropic viruses in PBMC samples from patients with primary HIV-1 subtype-B infection in 1996–2007: the French ANRS CO06 PRIMO Cohort Study.** *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**:135–141.
- Dalmau J, Puertas MC, Azuara M, Marino A, Frahm N, Mothe B, *et al.* **Contribution of immunological and virological factors to extremely severe primary HIV type 1 infection.** *Clin Infect Dis* 2009; **48**:229–238.
- Hayman A, Moss T, Arnold C, Naylor-Adamson L, Balfe P. **Disease progression in heterosexual patients infected with closely related subtype B strains of HIV type 1 with differing coreceptor usage properties.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; **20**:365–371.
- Raymond S, Delobel P, Mavigner M, Cazabat M, Souyris C, Encinas S, *et al.* **Development and performance of a new recombinant virus phenotypic entry assay to determine HIV-1 coreceptor usage.** *J Clin Virol* 2010; **47**:126–130.
- McGovern R, Dong W, Zhong X, Knapp D, Thielen A, Chapman D, *et al.* **Population-based sequencing of the V3-loop is comparable to the enhanced sensitivity trofile assay in predicting virologic response to maraviroc of treatment-naïve patients in the MERIT trial.** In *17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. San Francisco, CA; 2010.
- Moore JP, Kitchen SG, Pugach P, Zack JA. **The CCR5 and CXCR4 coreceptors: central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; **20**:111–126.
- Cornelissen M, Mulder-Kampinga G, Veenstra J, Zorgdrager F, Kuiken C, Hartman S, *et al.* **Syncytium-inducing (SI) phenotype suppression at seroconversion after intramuscular inoculation of a nonsyncytium-inducing/SI phenotypically mixed human immunodeficiency virus population.** *J Virol* 1995; **69**:1810–1818.
- Pratt RD, Shapiro JF, McKinney N, Kwok S, Spector SA. **Virologic characterization of primary human immunodeficiency virus type 1 infection in a healthcare worker following needlestick injury.** *J Infect Dis* 1995; **172**:851–854.
- Brumme ZL, Goodrich J, Mayer HB, Brumme CJ, Henrick BM, Wynhoven B, *et al.* **Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naïve individuals.** *J Infect Dis* 2005; **192**:466–474.
- Verhofstede C, Vandekerckhove L, Eygen VV, Demecheleer E, Vandenbroucke I, Winters B, *et al.* **CXCR4-using HIV type 1 variants are more commonly found in peripheral blood mononuclear cell DNA than in plasma RNA.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; **50**:126–136.
- Poveda E, Briz V, Roulet V, Del Mar Gonzalez M, Faudon JL, Skrabal K, Soriano V. **Correlation between a phenotypic assay and three bioinformatic tools for determining HIV co-receptor use.** *AIDS* 2007; **21**:1487–1490.
- Waters L, Mandalia S, Randell P, Wildfire A, Gazzard B, Moyle G. **The impact of HIV tropism on decreases in CD4 cell count, clinical progression, and subsequent response to a first antiretroviral therapy regimen.** *Clin Infect Dis* 2008; **46**:1617–1623.
- Weiser B, Philpott S, Klimkait T, Burger H, Kitchen C, Burgisser P, *et al.* **HIV-1 coreceptor usage and CXCR4-specific viral load predict clinical disease progression during combination antiretroviral therapy.** *AIDS* 2008; **22**:469–479.

## **DISCUSSION**

Au cours de nos travaux, nous nous sommes attachés à développer des outils génotypiques et phénotypiques de détermination de l'utilisation des corécepteurs d'entrée du HIV-1 de sous-types B et non-B. Nous avons ensuite utilisé ces outils afin de caractériser le tropisme du HIV-1 dans les compartiments du plasma sanguin et des cellules mononucléées du sang périphérique chez les patients nouvellement infectés afin d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de transmission des populations virales.

## **Caractérisation phénotypique de l'utilisation des corécepteurs d'entrée par le HIV-1**

### ***Évolution des tests de détermination phénotypique du tropisme du HIV-1***

Dans une première partie, nous avons développé et validé un nouveau test phénotypique d'entrée, le TTT, utilisant la production de virus recombinants pour déterminer les corécepteurs utilisés par le HIV-1. Les techniques fondées sur des virus recombinants sont plus sensibles et plus rapides à mettre en œuvre que celles nécessitant une étape de culture virale utilisant soit la lignée cellulaire MT2 soit les lignées de cellules exprimant les corécepteurs d'entrée (GHOST et U87 essentiellement). De plus, cette approche évite de cultiver les cellules plus longtemps, évitant ainsi les biais de sélection de la culture [Trouplin et al., 2001; Whitcomb et al., 2007]. Le test commercialisé Trofile<sup>TM</sup> (Monogram, Biosciences) a été utilisé pour la détermination du tropisme du HIV-1 dans les essais thérapeutiques comportant des antagonistes de CCR5 et donc validé cliniquement. Ce test ne permettait la détermination du tropisme viral qu'à partir d'échantillons plasmatiques avec une charge virale supérieure à 1000 copies/ml et présentait dans sa version initiale une sensibilité d'environ 10% pour la détection des virus X4.

Nous avons donc développé un nouveau test de détermination phénotypique du tropisme capable de caractériser le virus présent dans le plasma sanguin mais aussi dans les cellules sanguines, afin d'étudier l'impact du tropisme du virus isolé dans différents compartiments, y compris chez les patients dont la charge virale plasmatique est indétectable sous traitement. Deux protocoles d'amplification ont donc été mis au point avec un taux de succès plus élevé à partir de l'ARN plasmatique qu'à partir de l'ADN viral cellulaire, probablement en raison de la faible proportion de cellules du sang périphérique porteuses d'ADN viral. La variabilité du HIV-1 est un facteur limitant dans le succès de l'amplification du gène de l'enveloppe mais aussi dans l'étape de recombinaison homologue entre le produit amplifié et le vecteur plasmidique linéarisé. Nous avons donc validé le test TTT sur un large panel d'échantillons de sous-types B et non-B et analysé les performances de l'amplification



et de la détermination du phénotype pour les différents sous-types, avec des résultats satisfaisants pour l'ensemble des sous-types testés.

En l'absence de technique de référence dans ce domaine, l'analyse de la concordance entre les tests phénotypiques constitue une approche de choix. L'analyse des corrélations entre le test TTT et le test Trofile™ a montré une excellente concordance entre les deux techniques, supérieure à 90% et similaire à la concordance déjà publiée entre les tests Trofile™ et TRT (Tropism Recombinant Test) [Skrabal et al., 2007].

### ***Sensibilité des tests phénotypiques pour la détection des variants minoritaires X4***

Le test phénotypique TTT permet de détecter les virus X4 présents en faible proportion dans la population virale. L'amplification des échantillons en double et la révélation de l'infection des cellules cibles en luminométrie ont permis de montrer que la sensibilité du test était de 0,5% pour la détection des variants minoritaires utilisant CXCR4. Cette limite de détection est très proche de celle de la version sensibilisée du test Trofile, Trofile™ ESTA (Enhanced Sensitive Tropism Assay), qui est de 0,3%. L'infection par des virus utilisant CXCR4 pour l'entrée est associée à un échec virologique sous traitement par antagoniste de CCR5, mais la proportion de virus ayant un impact sur la réponse virologique reste à déterminer [Trinh L 2008]. Des échecs virologiques sous antagoniste de CCR5 avec sélection de variants X4 représentant moins de 1% de la population virale avant traitement ont été rapportés [Archer et al., 2009; Tsibris et al., 2009]. Pourtant, une étude récente a montré une bonne réponse virologique sous antagoniste de CCR5 lorsque les variants X4 représentaient moins de 10% de la population virale à l'initiation du traitement [Swenson L., 2009]. Des études prospectives sont donc nécessaires pour quantifier les variants minoritaires X4 avant l'introduction d'un antagoniste de CCR5 afin de déterminer le taux à partir duquel la réponse virologique est significativement modifiée.

Les approches génotypiques par séquençage direct ne permettent pas actuellement de détecter les variants minoritaires représentant moins de 20% de la population virale totale. Les nouvelles techniques de séquençage ultrasensible à haut débit pourraient être une alternative aux approches phénotypiques puisqu'elles permettent de détecter et de quantifier des séquences représentant moins de 1% de la population totale [Archer et al., 2009; Tsibris et al., 2009]. Ces techniques de nouvelle de génération constituent un compromis entre la sensibilité du phénotype et l'accessibilité des méthodes génotypiques, mais les performances globales dépendront des algorithmes d'interprétation utilisés.

## Détermination génotypique du tropisme du HIV-1

### *Utilisation des approches génotypiques pour la détermination du tropisme viral chez les patients candidats à un traitement par antagoniste de CCR5*

Les antagonistes de CCR5 sont des nouvelles molécules antirétrovirales qui ne peuvent être administrées que chez les patients infectés par un virus R5. Les approches phénotypiques étant longues et coûteuses, les méthodes génotypiques de détermination du tropisme présentent un avantage pratique considérable. Cependant, il importe de démontrer l'existence de très bonnes corrélations entre le génotype et le phénotype. Des études contradictoires ont été publiées sur ce sujet, la plupart mettant en évidence un manque de sensibilité du génotype pour la détection des virus utilisant CXCR4 pour l'entrée [Low et al., 2007; Sing et al., 2007] ou des performances inégales entre les algorithmes d'interprétation utilisés [de Mendoza et al., 2008; Recordon-Pinson et al., 2010]. Les corrélations génotype-phénotype semblent meilleures à l'échelle clonale que lorsqu'on analyse la population virale totale [Van Baelen et al., 2007]. Nous avons également retrouvé de bonnes corrélations entre le génotype et le phénotype sur des clones viraux [Delobel et al., 2007]. Dans cette étude, les analyses génotypiques ont conduit à la description d'une règle simple d'interprétation du génotype V3, combinant les règles 11/25 et charge nette, qui permet de prédire l'utilisation de CXCR4 pour l'entrée.

Le travail effectué chez les patients en échec thérapeutique avec des mutations de résistance pour les trois principales classes d'antirétroviraux, a permis d'évaluer les performances des algorithmes génotypiques pour la détermination du tropisme viral. Les résultats des génotypes analysés avec trois algorithmes bioinformatiques et avec la règle combinée étaient bien corrélés avec les résultats du test phénotypique TTT, avec une concordance globale comprise entre 87 et 90%. Les algorithmes Geno2pheno<sub>10</sub>, PSSM et la règle combinée 11/25 et charge nette ont montré des spécificités supérieures à 87% et des sensibilités comprises entre 69 et 88%, ce qui contraste avec les sensibilités de 22-50% rapportées dans d'autres études [Low et al., 2007; Sing et al., 2007]. Les mauvaises corrélations génotype-phénotype observées peuvent s'expliquer en partie par une certaine hétérogénéité des tests phénotypiques utilisés et par des biais d'amplification entre les méthodes génotypiques et les tests phénotypiques car les échantillons ont en général fait l'objet de deux analyses distinctes pour le génotypage V3 et le phénotypage.

Au contraire, la forte concordance observée dans notre travail entre le génotype et le phénotype pourrait être liée à une détermination du tropisme du HIV-1 avec des tests

phénotypique et génotypique réalisés en parallèle à partir du même produit de PCR du gène de l'enveloppe. Cette stratégie évite les biais d'échantillonnage de la population virale entre les deux tests de détermination du tropisme. De plus, les amorces de séquençage de V3 ont été élaborées en insérant des acides nucléiques dégénérés afin d'amplifier un maximum de variants présents dans la quasiespèce virale. L'analyse des électrophorégrammes de la région V3 doit être réalisée en accordant une attention particulière aux variants minoritaires, comme nous l'avons précédemment montré dans les comparaisons avec les analyses clonales [Delobel et al., 2007]. D'autres études ont évalué la concordance entre les algorithmes génotypiques et le phénotype réalisé avec les tests Trofile<sup>TM</sup> ou TRT (Tropism Recombinant Test). Ces valeurs, comprises entre 70 et 86%, confortent nos résultats [Poveda et al., 2007a; Poveda et al., 2007b]. Dans le cadre d'une étude multicentrique, nous avons observé une moindre sensibilité des tests génotypiques, réalisés dans les centres participants, pour prédire le phénotype réalisé avec le test Trofile<sup>TM</sup>, soulignant l'influence des facteurs techniques sur les corrélations génotype-phénotype [Recordon-Pinson et al., 2010].

La conclusion de notre travail sur une population de patients en échec thérapeutique est que les approches génotypiques par séquençage direct de V3 sont une alternative aux tests phénotypiques pour la détermination des corécepteurs utilisés par le HIV-1. Les données de prédiction de la réponse virologique aux antagonistes de CCR5 par les tests génotypiques ont été publiées récemment [McGovern et al., 2010b]. L'analyse rétrospective des échantillons des patients inclus dans les essais MOTIVATE a montré que la réponse virologique à 24 semaines était similaire chez les patients infectés par un virus typé R5, soit avec le test génotypique, soit avec le test phénotypique. Cependant, seule une étude prospective évaluant la prédiction de la réponse virologique sous antagonistes de CCR5 par les tests génotypiques permettra de conclure.

### ***Sensibilité de la détection des virus X4 avec les tests génotypiques***

Les techniques de séquençage direct permettent d'analyser les variants viraux qui représentent au moins 20% de la population virale totale. Les variants minoritaires ne sont donc pas pris en compte, ce qui peut expliquer en partie des discordances avec les résultats des tests phénotypiques ultrasensibles, capables de prendre en compte des variants représentant environ 0,5% de la population virale. Les performances des algorithmes ont été évaluées dans plusieurs études, mais le rôle des conditions techniques de traitement des échantillons, de PCR et d'analyse des séquences a rarement été étudié de manière détaillée. Nous avons validé les corrélations entre le génotype et le phénotype à partir d'extraits

d'acides nucléiques amplifiés en double puis mélangés en proportion égale afin d'augmenter la probabilité d'amplifier un variant minoritaire présent dans la quasi-espèce. L'analyse manuelle des électrophorogrammes permet de détecter les doubles pics lorsqu'il existe des populations virales mixtes. L'intérêt de réaliser plusieurs PCR a été évalué afin d'améliorer la sensibilité des tests génotypiques [Zhong et al., 2010]. Ce travail a montré que l'amplification était une étape limitante pour la détection des variants minoritaires, surtout pour les charges virales HIV-1 faibles. Ainsi, la détection de variants minoritaires représentant 12% de la population virale dans un échantillon à 1000 copies d'ARN HIV-1/ml passait de 50% avec un protocole comportant une seule PCR à 90% avec trois PCR. Les performances du génotypage V3 pourraient également être améliorées par l'analyse indépendante de trois séquençages directs par échantillon. La sensibilité pour la prédiction génotypique des virus R5X4/X4 avec l'algorithme PSSM<sub>X4R5</sub> était de 69%, mais la moitié des échantillons génotypés X4 avait au moins un résultat R5 parmi les trois séquençages réalisés [Swenson et al., 2010]. Il est intéressant de noter que nos résultats montrent des performances équivalentes sans le recours à un triple séquençage dont l'impact en coût et en temps de travail n'est pas négligeable.

Les conditions d'extraction, d'amplification et de séquençage sont donc des paramètres cruciaux pour les performances des approches génotypiques. Ces paramètres ont probablement plus d'importance sur la qualité de l'analyse de V3 qu'elles n'en ont dans l'analyse des gènes codant les enzymes virales (transcriptase inverse, protéase, intégrase), probablement en raison de la plus grande variabilité de V3 et donc du plus grand nombre de quasi-espèces.

### ***Détermination génotypique du tropisme des virus de sous-type non-B***

Les algorithmes de prédiction génotypique du tropisme du HIV-1 ont été élaborés pour les virus de sous-type B, majoritaire dans les pays où ont été effectuées les études sur le tropisme du HIV-1. Dans notre cohorte de patients en échec thérapeutique, la prévalence des sous-types non-B était de 15% avec une grande diversité des sous-types et CRFs représentés. La concordance entre le génotype V3 et le phénotype d'entrée pour les virus de sous-types non-B était similaire à la concordance observée pour les sous-types B. Cependant, une étude sur un plus grand échantillon de sous-types non-B a montré une moindre sensibilité des tests génotypiques pour prédire le tropisme de ces virus, comparé aux virus de sous-type B [Garrido et al., 2008]. Une analyse des corrélations génotype-phénotype pour chaque sous-type particulier du HIV-1 n'a pas été réalisée en raison d'effectifs faibles.

Pour les patients infectés par des virus de CRF02-AG, l'analyse des corrélations génotype-phénotype a montré des performances inégales pour les différents algorithmes d'interprétation du génotype V3, avec des sensibilités entre 40 et 80% pour la prédiction génotypique de virus X4. Ainsi l'algorithme Geno2pheno<sub>10</sub>, suffisamment sensible pour prédire le tropisme X4 des virus de sous-type B, prédisait très mal le tropisme des virus de sous-type CRF02-AG. En revanche, sur la même cohorte de patients, les algorithmes PSSM (X4/R5 et SI/NSI) et la règle combinée ont montré de bonnes performances pour la prédiction du phénotype d'entrée. Les déterminants génotypiques impliqués dans l'utilisation des corécepteurs d'entrée par les virus de sous-type CRF02-AG recrutés en France sont donc similaires à ceux des virus de sous-type B, mais les algorithmes de prédiction génotypique doivent être utilisés après validation des corrélations entre le génotype et le phénotype viraux. Une étude récente a décrit des déterminants génotypiques différents chez les virus CRF02-AG R5X4/X4 isolés en Guinée-Bissau [Esbjornsson et al., 2010], avec des séquences comportant peu d'acides aminés chargés positivement en position 11/25 de V3, mais un nombre total élevé d'acides aminés chargés (positivement et négativement) dans la région V3. Ces différences pourraient être dues soit à des biais d'amplification, soit plus probablement à des différences épidémiologiques entre les virus isolés en Guinée Bissau et ceux isolés en France.

Dans une autre étude, nous avons montré que les tests génotypiques développés au laboratoire étaient adaptés à la détermination du tropisme des virus de sous-type C. Bien que les déterminants génétiques de l'utilisation des corécepteurs d'entrée par les virus de sous-type C aient été peu étudiés, un algorithme spécifique pour la prédiction du tropisme, le PSSM<sub>SI/NSI</sub> sous-type C, a été élaboré [Jensen et al., 2006]. Les déterminants génétiques du tropisme pourraient donc être sensiblement différents pour ce sous-type viral. Nous avons étudié les corrélations entre le génotype V3 et le phénotype de virus R5 et R5X4/X4 de sous-type C. Les déterminants génotypiques associés à l'utilisation de CXCR4 pour l'entrée étaient la présence d'acides aminés chargés positivement en position 11 et/ou 25 et/ou une charge nette de la région V3  $>+5$ . La mutation du site de N-glycosylation était présente chez 5/15 virus de phénotype R5X4/X4 et chez 1/55 virus de phénotype R5. D'autres critères étaient retrouvés chez les virus R5X4/X4, mais ces modifications étaient associées aux déterminants classiques de l'utilisation de CXCR4, en particulier les critères 11/25 et charge nette. Dans notre étude, les déterminants génotypiques du tropisme pour les virus de sous-types B et C étaient donc similaires.

Nous avons donc évalué les performances des algorithmes génotypiques du sous-type B pour prédire les virus R5X4/X4 de sous-type C. Comme attendu, les algorithmes performants pour le sous-type B (Geno2pheno, PSSM et la règle combinée 11/25 et charge nette) l'étaient aussi pour le sous-type C, tandis que des algorithmes moins robustes comme C4.5, PART ou SVM, ont montré des sensibilités médiocres, de 20 à 53%, pour la prédiction des virus R5X4/X4. L'algorithme PSSM spécifique du sous-type C était plus sensible (93% versus 80%) que les versions du PSSM pour le sous-type B, mais était moins spécifique (82% versus 93 et 98%). En conclusion, l'algorithme génotypique le plus sensible (93%) et le plus spécifique (96%) pour prédire l'utilisation de CXCR4 par le HIV-1 de sous-type C était la règle combinée 11/25 et charge nette établie pour les virus de sous-type B. Les approches génotypiques de détermination du tropisme pourraient être d'un grand intérêt dans de larges études visant à comprendre la prédominance du sous-type C dans le monde.

### ***Caractérisation de la résistance aux antagonistes de CCR5***

L'utilisation des antagonistes de CCR5 en pratique clinique expose au problème de l'échec virologique et à sa caractérisation. Les mécanismes d'acquisition de la résistance au maraviroc (Pfizer) ont été décrits dans les essais cliniques [Lewis et al., 2008; Mori et al., 2007; Westby et al., 2006] et in vitro [Westby et al., 2007]. En effet, les essais thérapeutiques ont montré deux voies conduisant à l'échec virologique sous antagoniste de CCR5, qui sont la sélection de virus minoritaires préexistants utilisant CXCR4 pour l'entrée [Westby et al., 2006] et la sélection de variants R5 résistants capables d'utiliser CCR5 pour l'entrée malgré la présence d'anti-CCR5. Nos résultats montrent que les virus X4 peuvent être identifiés efficacement par des tests génotypiques. Par contre, l'identification des variants R5 résistants nécessite la pratique de tests phénotypiques car la connaissance des mutations d'échappement à l'anti-CCR5 est encore insuffisante [Lewis et al., 2008; Soulie et al., 2008]. Le principal mécanisme de résistance décrit pour les variants R5 est un mécanisme d'inhibition non compétitive avec un abaissement du plateau maximal d'inhibition aux fortes concentrations d'anti-CCR5 [Pugach et al., 2007; Westby et al., 2007]. Cependant, un cas d'acquisition de résistance au maraviroc impliquant un mécanisme d'inhibition compétitive entre le virus et la molécule avec un déplacement de la CI50 a été récemment décrit [Delobel et al., 2010].

A ce jour, les mutations décrites dans la région V3 de l'enveloppe chez les patients en échec virologique sous antagoniste de CCR5 ne permettent pas de prédire l'échec lorsqu'elles sont identifiées avant la mise sous anti-CCR5 [Lewis et al., 2010; Recordon-Pinson et al., 2010]. La grande variabilité du gène de l'enveloppe et l'hétérogénéité des mutations

observées lors des échecs virologiques constituent des obstacles importants pour le développement d'un algorithme génotypique d'interprétation de la résistance aux antagonistes de CCR5. Des études de corrélations du phénotype de résistance avec le génotype devraient permettre une meilleure caractérisation des déterminants génotypiques de la résistance aux antagonistes de CCR5 afin de simplifier les modalités de la prise en charge en pratique clinique.

## **Prévalence des virus R5X4 et X4 chez les patients à différents stades de l'infection**

### ***Tropisme du HIV-1 chez les patients à un stade avancé de la maladie***

Les virus utilisant CCR5 prédominent dans les phases initiales de l'infection, tandis que les virus utilisant CXCR4 pour l'entrée émergent à un stade avancé de la maladie chez environ 50% des patients, lorsque la chute des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> s'accélère. La prévalence des virus R5X4/X4 sous traitement antirétroviral diffère selon les études. Chez les patients en échec thérapeutique, nous avons observé seulement 25% d'infection par les virus R5X4/X4, tandis que d'autres études ont rapporté 40 à 50% de prévalence chez des patients pré-traités [Gulick et al., 2007; Melby et al., 2006]. La plus faible prévalence des virus R5X4/X4 observée dans notre étude pourrait être liée à une immunodépression moins sévère des patients. Une autre étude a montré une prévalence deux fois plus élevée des virus R5X4/X4 chez les patients traités avec une charge virale détectable (41%) que chez les patients naïfs de traitement (18%) [Hunt et al., 2006]. De plus, chez des patients avec un nadir de CD4 très bas et une mauvaise reconstitution immunitaire sous traitement antirétroviral efficace, une prévalence de 60% de virus R5X4/X4 a été rapportée [Delobel et al., 2006]. Des données sur le tropisme du HIV-1 chez des patients dépistés à un stade tardif de la maladie ont été récemment publiées. Seulement 38% de virus X4 (Geno2pheno<sub>20</sub>) ont été identifiés alors que ces patients avaient moins de 200 lymphocytes T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> [Simon et al., 2010]. Plusieurs semblent donc influencer le tropisme viral chez les patients à la phase chronique de l'infection ou au stade SIDA.

### ***Sous-type du HIV-1 et tropisme viral***

L'évolution du tropisme viral au cours de l'infection par le HIV-1 a été documentée essentiellement pour le sous-type B. Plusieurs études ont rapporté que les virus R5 étaient largement prédominants chez les patients infectés par un virus de sous-type C, y compris à un stade avancé de la maladie [Cecilia et al., 2000; Choge et al., 2006; Ping et al., 1999]. À

l'inverse, des études plus récentes ont retrouvé une prévalence d'environ 30% de virus X4 chez les patients à un stade avancé de la maladie [Cilliers et al., 2003; Connell et al., 2008; Johnston et al., 2003; Michler et al., 2008]. Cette apparente augmentation de fréquence des virus de sous-type C utilisant CXCR4 pour l'entrée pourrait être due à une amélioration de la sensibilité des tests pour la détection des variants X4, à la sélection de virus utilisant CXCR4 sous traitement antirétroviral, ou bien à une évolution de l'épidémiologie de l'infection par le sous-type C.

Nous avons étudié deux groupes de patients recrutés en France d'une part, et au Malawi d'autre part, pays où ce sous-type est prédominant. La prévalence des virus R5X4/X4 était de 29% chez les patients du Malawi, alors qu'elle était de 5% chez les patients vivant en France. Les patients du Malawi étaient en initiation d'un premier traitement antirétroviral, avec une médiane de la numération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de 114 cellules/mm<sup>3</sup>, tandis que 62% des patients recrutés en France étaient sous traitement antirétroviral depuis 3 ans en médiane et à un stade moins avancé de la maladie. De plus, les patients recrutés en France étaient infectés depuis plus de dix ans et vivaient en France depuis plusieurs années, la plupart ayant été infectés dans des pays d'Afrique de l'Est ou du Sud, mais aucun au Malawi. Ils n'ont donc probablement pas été exposés aux souches circulant plus récemment en Afrique et qui pourraient comporter plus de virus R5X4/X4 que les souches qui circulaient il y a quelques années.

Chez des patients infectés par le sous-type CRF02-AG en France, 19% de patients infectés par des virus R5X4 ont été identifiés. La médiane des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> était de 210 cellules/mm<sup>3</sup>. Une autre équipe a récemment rapporté 17% de virus CRF02-AG R5X4/X4 au Ghana [Brandful et al., 2007], tandis que des travaux plus anciens avaient mis en évidence une prévalence globale de 35% des virus SI (Syncytium Inducing) sur une large cohorte au Cameroun et jusqu'à 56% lorsque les CD4 étaient inférieurs à 200 cellules/mm<sup>3</sup> [Vergne et al., 2003]. Nos résultats sont donc concordants avec les données récentes du Ghana, où 74% des patients étaient pourtant au stade SIDA. Les différences observées avec les résultats du travail réalisé au Cameroun pourraient être expliquées par le test phénotypique utilisé qui repose sur l'induction de syncytia sur cellules MT2 ou par un stade clinique plus avancé des patients. Une étude récente en Guinée-Bissau a montré une augmentation, durant les dix dernières années, de la prévalence des virus CRF02-AG R5X4/X4 aux stades avancés de l'infection par le HIV, suggérant une possible évolution de l'épidémiologie de ce sous-type [Esbjornsson et al., 2010]. Notre cohorte ayant été recrutée sur une courte période, nous



n'avons pas pu analyser l'évolution de la prévalence des virus CRF02-AG R5X4 dans le temps.

Ainsi deux sous-types viraux prévalents en Afrique, les sous-types C et CRF02-AG, semblent subir une évolution épidémiologique, avec une augmentation de la capacité à utiliser CXCR4 pour l'entrée, en particulier chez les patients à un stade avancé de la maladie. Une confirmation de cette évolution dans de plus larges études pourrait avoir des conséquences sur la transmission virale et la physiopathologie de l'infection.

Par ailleurs, les patients infectés par un HIV-1 de sous-type D sont plus fréquemment porteurs de virus R5X4 ou X4 que les patients infectés par des sous-types B ou A [Huang et al., 2007]. Le tropisme du sous-type D est associé à une évolution péjorative de l'infection HIV-1 chez les patients infectés [Baeten et al., 2007; Kaleebu et al., 2002]. De plus, nous avons récemment montré que les algorithmes génotypiques étaient peu spécifiques pour prédire le tropisme R5X4/X4 des sous-types D isolés au stade de la primo-infection [Frange et al., 2010]. Des études sur le tropisme de ce sous-type viral sont nécessaires afin de mieux comprendre la physiopathologie de l'infection.

La dynamique du tropisme viral des différents sous-types du HIV-1 pourrait avoir un impact sur la prise en charge thérapeutique des patients. En effet, les antagonistes de CCR5 pourraient augmenter le risque de modification du tropisme viral chez les patients traités, provoquant un échec virologique et éventuellement une progression plus rapide de la maladie [Dolin, 2008; Kilby and Eron, 2003]. En fonction du sous-type viral et de sa fréquence d'évolution vers un tropisme X4, l'effet des antagonistes de CCR5 pourrait être différent, moins délétère sur les sous-types évoluant plus rarement vers l'utilisation de CXCR4, ou au contraire péjoratif sur les sous-types à forte propension d'évolution vers un tropisme X4.

### ***Prévalence des virus utilisant CXCR4 au stade de primo-infection***

Les virus R5 prédominent dans les phases précoces de l'infection, en particulier au stade de primo-infection HIV durant laquelle le tropisme viral semble restreint aux variants R5 quels que soient le mode de transmission et le tropisme des variants présents chez le patient source [van't Wout et al., 1994]. L'avantage sélectif des virus R5 en primo-infection pourrait être dû à l'expression préférentielle de CCR5 dans les tissus et cellules cibles importants pour l'établissement de l'infection HIV ou à la réponse immunitaire dirigée de façon plus efficace contre les virus utilisant CXCR4. Mais des données récentes ont montré une prévalence d'environ 15% des virus utilisant CXCR4 au stade précoce de l'infection [de Mendoza et al., 2007; de Mendoza et al., 2008; Frange et al., 2009; Poveda et al., 2007a].

L'hétérogénéité des tests utilisés et des compartiments étudiés pourrait expliquer les discordances des résultats. Nous avons déterminé le tropisme du HIV-1 chez les patients au stade de primo-infection par des approches génotypique et phénotypique à partir des compartiments du plasma sanguin et des cellules du sang périphérique. La prévalence des virus utilisant CXCR4 pour l'entrée était de 6,4% avec le test phénotypique TTT et le tropisme du virus plasmatique était corrélé à 98% avec le tropisme du virus isolé dans l'ADN cellulaire. À ce stade de l'infection, la population virale est relativement homogène ce qui explique l'excellente concordance entre les deux compartiments. Au contraire, aux stades plus tardifs de l'infection, il a été montré une prévalence plus élevée des virus X4 dans les cellules que dans le plasma sanguin [Verhofstede et al., 2009]. De même, une étude récente a montré que les virus de tropisme R5 sont largement prédominants en primo-infection chez les patients infectés par des virus de sous-types non-B en France [Frange et al., 2010].

Les études ayant déterminé le tropisme du HIV-1 par méthodes génotypiques au stade de primo-infection ont trouvé une prévalence de 13,4 à 17,2% de virus X4 dans le plasma [de Mendoza et al., 2007; Poveda et al., 2007a] et 15,9% dans les cellules mononucléées du sang périphérique [Frange et al., 2009]. Nous avons comparé la prévalence des virus R5X4/X4 dans le plasma sanguin déterminée en parallèle avec les approches phénotypique et génotypique. Comparés au test phénotypique qui retrouvait une prévalence de 6,4%, les algorithmes génotypiques utilisés trouvaient une prévalence de 5,6 à 12,1%. L'algorithme Geno2pheno<sub>10</sub>, largement utilisé pour sa bonne sensibilité, notamment chez les patients prétraités par antirétroviraux, surestimait la prévalence des virus utilisant CXCR4 en primo-infection (12,1% comparé à 6,4% avec le TTT). Au contraire, la règle combinée 11/25 et charge nette, plus spécifique, estimait correctement la prévalence des virus R5X4/X4 à 6,4%, et l'algorithme Geno2pheno avec un taux de faux positifs de 5,75% estimait cette prévalence à 5,6%. Le taux de faux positif de 5,75% de l'algorithme Geno2pheno a été établi à partir des résultats de l'essai MERIT indiquant que le seuil de 5,75% permettait de prédire la réponse virologique chez les patients recevant un premier traitement comportant du maraviroc [McGovern et al., 2010a]. Les tests manquants de spécificité surestiment donc la prévalence de l'infection par les virus R5X4/X4 d'autant plus que cette prévalence est faible dans la population de patients étudiés. Le choix des algorithmes d'interprétation pourrait donc dépendre de la population analysée. En effet, la détermination du tropisme pour l'utilisation des antagonistes de CCR5 privilégie la sensibilité de détection des virus X4, afin de ne pas exposer le patient à un échec virologique lié à la présence de virus X4 non détectés, tandis que

l'évaluation de la prévalence des virus utilisant CXCR4 pour l'entrée nécessite un meilleur compromis entre sensibilité et spécificité.

### ***Rôle du mode de transmission dans le tropisme du virus du patient nouvellement infecté***

La prédominance des virus R5 dans la transmission sexuelle du HIV-1 peut s'expliquer par l'expression abondante de CCR5 sur les cellules cibles présentes dans les muqueuses qui joueraient le rôle de filtre. Mais les virus R5 prédominent aussi après contamination par voie sanguine alors que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> prédominent largement dans le compartiment sanguin. La transmission préférentielle des virus R5 serait donc due à leur avantage répliatif dans l'interaction cellule dendritique/cellule T au niveau du tissu lymphoïde et serait donc indépendante de la voie de transmission. En effet, des cas de transmission parentérale de virus X4 ont été rapportés avec ensuite une sélection négative des variants X4 au profit des variants R5 [Cornelissen et al., 1995; Pratt et al., 1995]. Dans notre étude, nous avons au contraire observé la persistance des virus R5X4 transmis un an après la primo-infection, lorsque les prélèvements étaient disponibles. Contrairement à la transmission sexuelle, il n'y a pas de barrière à la transmission sanguine des virus X4. Leur fréquence en primo-infection pourrait donc être plus élevée en cas de contamination par voie sanguine. Dans notre étude sur le tropisme en primo-infection, nous avons observé une prévalence plus élevée des virus R5X4 chez les patients infectés par voie parentérale (50%) que dans les autres groupes de transmission (6,4%). Une autre étude a rapporté également une prévalence élevée de virus X4 (35%) après transmission parentérale [de Mendoza et al., 2007]. Chez les patients naïfs de traitement antirétroviral, des études ont également montré une plus grande fréquence de virus X4 chez les usagers de drogues intraveineuses [Brumme et al., 2005; Simon et al., 2010].

Les travaux les plus récents ont donc montré une fréquence élevée des virus R5X4/X4 chez les patients récemment infectés par voie parentérale, ce qui pourrait être du en partie à une amélioration de la sensibilité des tests pour la détection des virus X4. La transmission de virus X4 pourrait aussi être liée à une augmentation de la prévalence globale des virus X4 dans la population des patients infectés qui est la source des nouvelles contaminations.

### **Le tropisme du HIV-1 comme marqueur prédictif de l'évolution de la maladie**

#### ***Evolution du tropisme du HIV-1 chez les patients chroniquement infectés et impact sur l'évolution de la maladie***

L'émergence de virus utilisant CXCR4 pour l'entrée est associée à une progression de la maladie mais les mécanismes physiopathologiques expliquant cette association sont mal connus. Plusieurs études ont montré que l'émergence de virus X4 précédait l'accélération de la décroissance lymphocytaire [Koot et al., 1993; Maas et al., 2000]. La capacité du HIV-1 à utiliser CXCR4 pourrait faciliter la destruction des lymphocytes T naïfs, exprimant préférentiellement CXCR4, et pourrait donc contribuer à l'accélération de la déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Une équipe a étudié l'émergence des virus X4 chez les patients ayant présenté une séroconversion HIV, ainsi que l'évolution de la maladie en dehors de tout traitement antirétroviral [Shepherd et al., 2008]. Des variants X4 ont été détectés sur au moins un échantillon chez 52% des patients au cours du suivi (Trofile<sup>TM</sup>, Monogram, Biosciences). L'émergence des virus X4 précédait le point d'inflexion des lymphocytes T CD3<sup>+</sup> de 0,83 ans en médiane, et précédait le stade SIDA ou le passage en dessous de 200 lymphocytes T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> de 13,2 mois. Deux études ont également montré que la détection de virus X4 chez les patients infectés prédisait la progression de la maladie [Waters et al., 2008; Weiser et al., 2008]. Le tropisme du HIV-1 pourrait donc être utilisé pour identifier les patients à fort risque de progression clinique et pour initier ou optimiser un traitement antirétroviral. D'autres études sont cependant nécessaires pour évaluer l'intérêt de la détermination du tropisme du HIV-1 comme outil permettant de guider la prise en charge clinique et thérapeutique des patients infectés [Burger and Hoover, 2008].

### ***Impact du tropisme du HIV-1 transmis sur l'évolution de la maladie***

Bien que les virus R5 prédominent largement au stade de la primo-infection HIV, les virus R5X4/X4 semblent être transmis dans 5 à 15% des cas. Des cas de progression clinique rapide ont été décrits après transmission de virus utilisant CXCR4 pour l'entrée [Dalmau et al., 2009; Markowitz et al., 2005; Yu et al., 1998]. L'infection de plusieurs patients à partir de la même source infectée par un virus R5X4 a montré que les patients contaminés uniquement par des souches R5 étaient asymptomatiques malgré une infection ancienne, alors que les patients contaminés par des virus R5X4 étaient symptomatiques avec moins de 100 lymphocytes T CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> [Hayman et al., 2004]. Dans notre étude, les patients infectés par un virus R5X4 progressaient plus vite dans la maladie que les patients infectés par un virus R5, les deux groupes étant similaires au moment de la primo-infection en termes d'âge, de charge virale HIV-1 et de nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Nous avons observé une décroissance plus rapide des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en dessous de 350 cellules/mm<sup>3</sup> et une

initiation précoce d'un traitement antirétroviral lorsque le virus transmis avait un tropisme R5X4.

Ces données renforcent l'hypothèse d'une pathogénicité intrinsèque des virus utilisant CXCR4 pour l'entrée. L'impact du tropisme viral en primo-infection sur l'évolution de la maladie devra cependant être confirmé dans d'autres populations de patients nouvellement infectés.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Notre travail a permis de développer des outils pour la caractérisation du tropisme du HIV-1 afin d'étudier les implications de l'utilisation des corécepteurs d'entrée sur l'évolution de la maladie et sur l'utilisation de molécules antagonistes de CCR5.

Les virus infectant les cellules de la lignée MT2 et responsables d'une destruction rapide des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont caractérisés par la capacité à utiliser CXCR4 comme corécepteur d'entrée. À l'inverse, les virus utilisant uniquement CCR5 pour l'entrée ont un tropisme restreint aux cellules T CD4 mémoires centrales et effectrices et semblent moins pathogènes que les virus utilisant CXCR4. Les monocytes-macrophages, les cellules dendritiques et les cellules de Langerhans sont aussi infectés par le virus HIV-1 et expriment majoritairement CCR5 mais aussi CXCR4 à différents niveaux. Le principal corécepteur d'entrée du HIV-1 est donc CCR5, ce qui est vérifié en pratique clinique puisque les virus R5 sont transmis de façon préférentielle quel que soit le mode de contamination du HIV-1, et prédominant durant les premiers stades de la maladie [Berger et al., 1999; van't Wout et al., 1994]. Les virus utilisant CXCR4, principalement en complément de l'utilisation de CCR5, ont donc un tropisme élargi aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs par rapport aux virus utilisant CCR5. Les virus R5X4/X4 émergent aux stades tardifs de l'infection et sont associés à une accélération maladie vers le stade SIDA [Schuitemaker et al., 1992].

Afin d'étudier l'impact du tropisme viral sur la physiopathologie de l'infection, des tests de détermination du tropisme ont dû être développés. Les tests phénotypiques ont été optimisés en termes de sensibilité et de spécificité, pour aboutir aujourd'hui à la production de virus recombinants pseudotypés pour le gène de l'enveloppe du virus à tester et à l'infection de cellules indicatrices exprimant CCR5 ou CXCR4. L'approche phénotypique pour la détermination du tropisme du HIV-1 est à ce jour la seule technique validée de façon prospective dans les essais thérapeutiques comportant des antagonistes de CCR5 [Fatkenheuer et al., 2008]. Nous avons développé le test TTT afin de déterminer les corécepteurs d'entrée utilisés par le HIV-1 à partir d'échantillons de plasma sanguin et de cellules du sang périphérique, pour différents sous-types du HIV-1. L'autre enjeu des tests phénotypiques est la détection des variants minoritaires afin d'étudier leur impact sur l'évolution de la maladie et la réponse virologique aux antagonistes de CCR5. Le test TTT détecte les variants minoritaires X4 représentant au moins 0,5% de la population virale totale, ce qui est similaire à la sensibilité du test Trofile<sup>TM</sup> ESTA (Monogram, Biosciences) [Trinh L 2008]. Les tests phénotypiques sont aujourd'hui très sensibles et permettent de distinguer les virus utilisant les deux corécepteurs d'entrée (virus R5X4) des virus utilisant uniquement CXCR4 (virus X4). L'inconvénient est que ces tests sont de réalisation longue et coûteuse.

Les approches génotypiques sont simples et plus adaptées à la pratique courante, mais nécessitent l'identification des déterminants génotypiques du tropisme et l'élaboration d'algorithmes d'interprétation qui doivent ensuite être validés par l'analyse des corrélations génotype-phénotype. Les motifs moléculaires de la gp120 impliqués dans les interactions avec les corécepteurs CXCR4 et CCR5 ont été localisés essentiellement dans la région V3 et tous les algorithmes d'interprétation disponibles actuellement reposent sur l'analyse de cette région de 35 acides aminés. Les tests génotypiques ont parfois montré une sensibilité insuffisante pour prédire l'utilisation de CXCR4 par le HIV-1 [Low et al., 2007; Sing et al., 2007]. Notre équipe a montré qu'une règle simple, combinant les critères déjà décrits comme associés à l'utilisation de CXCR4 par le HIV-1, permettait de prédire le tropisme du virus à partir du séquençage direct de la région V3 [Delobel et al., 2007]. Notre travail a consisté ensuite à valider les performances de cette règle sur une population de patients en échec thérapeutique. Nous avons montré que le génotypage de V3 était une alternative performante aux tests phénotypiques de détermination du tropisme du HIV-1 de sous-type B dans l'optique de l'utilisation des antagonistes de CCR5.

Les déterminants génotypiques de l'utilisation des corécepteurs d'entrée par les virus de sous-type non-B nécessitent des études spécifiques car très peu de données sont disponibles. Nous avons étudié les corrélations génotype-phénotype des virus de sous-type CRF02-AG isolés en France et des virus de sous-type C isolés en France et au Malawi. Les approches génotypiques permettent de prédire le phénotype des virus de sous-types C et CRF02. La caractérisation du tropisme de ces virus non-B a permis d'observer des différences de prévalence des virus X4 chez les patients recrutés en France et en Afrique (les sous-types C du Malawi dans notre étude ou les CRF02-AG de Guinée-Bissau dans l'étude d'Esbjornsson *et al.*) [Esbjornsson et al., 2010]. Une évolution de l'épidémiologie du HIV-1 en Afrique pourrait expliquer ces discordances, qui devront être confirmées dans d'autres études et qui pourraient avoir un impact sur la prise en charge des patients infectés. En effet, la prévalence des virus X4 inciterait à utiliser les antagonistes de CCR5 dans les stades précoces de l'infection durant lesquels les virus R5 prédominent. Mais la susceptibilité d'émergence de virus X4 sous anti-CCR5 pourrait aussi être prise en compte et les choix thérapeutiques pourraient dépendre du sous-type du virus isolé chez le patient. Par ailleurs, les virus de sous-type D utilisent fréquemment CXCR4 pour l'entrée et sont responsables d'une évolution plus rapide de la maladie [Baeten et al., 2007; Kaleebu et al., 2002]. La détermination génotypique du tropisme des virus de sous-type D nécessite des études complémentaires car le travail réalisé récemment sur les primo-infections avec des virus non-



B a montré une mauvaise corrélation génotype-phénotype pour ce sous-type viral [Frange et al., 2010].

La sensibilité des tests génotypiques est un enjeu majeur pour l'utilisation des antagonistes de CCR5. Contrairement à d'autres équipes, nous observons une bonne sensibilité des approches génotypiques pour la détermination du tropisme viral, due en partie à une double amplification du gène de l'enveloppe. L'amélioration des performances des tests génotypiques par ce type de stratégie a été confirmée récemment [Swenson et al., 2010]. Pour améliorer la sensibilité, les nouvelles techniques de séquençage ultrasensible sont un compromis intéressant entre les approches phénotypiques et génotypiques, car elles combinent une très grande sensibilité avec la simplicité des approches génotypiques. Des études devront notamment évaluer l'impact des variants minoritaires X4 sur la réponse virologique aux traitements comportant des antagonistes de CCR5.

Le tropisme du HIV-1 se modifie au cours de l'évolution de l'infection. Les virus R5 prédominent au stade de la primo-infection, mais la prévalence des virus X4 à ce stade est controversée [de Mendoza et al., 2007; Eshleman et al., 2007; Frange et al., 2009]. Nous avons observé une prévalence de 6,4% de virus phénotypés R5X4 chez les patients diagnostiqués au stade de la primo-infection. La population virale étant homogène à ce stade, nous avons observé une excellente concordance des tests de tropisme entre les compartiments plasmatique et cellulaire du sang périphérique. Les algorithmes génotypiques manquant de spécificité peuvent surestimer la fréquence des virus X4, allant du simple au double en fonction des algorithmes utilisés, à ce stade de l'infection où la prévalence des virus R5X4/X4 est faible.

Nous avons observé, comme d'autres auteurs, une transmission plus élevée de virus R5X4 chez les usagers de drogues intraveineuses que chez les patients contaminés par voie sexuelle [de Mendoza et al., 2007; Simon et al., 2010]. La physiopathologie de la transmission du HIV-1 pourrait être mieux explorée chez les patients toxicomanes qui s'infectent avec un virus qui n'est pas soumis au filtre de la muqueuse génitale, contrairement à la majorité des cas transmission qui sont des contaminations sexuelles. Par ailleurs, nous avons montré que le tropisme du virus transmis en primo-infection était aussi un facteur prédictif de l'évolution de la maladie en dehors de tout traitement antirétroviral. Il sera intéressant d'étudier l'influence du tropisme du virus transmis sur la reconstitution immunitaire sous traitement antirétroviral efficace.

La documentation des virus transmis chez les patients récemment infectés pourrait permettre de comprendre la physiopathologie de l'infection. Peu d'études ont été réalisées sur

le tropisme des virus transmis de la mère à l'enfant. Les travaux sur ce groupe de transmission permettraient de documenter le virus chez la source et le patient contaminé ainsi que l'impact sur l'évolution de la maladie chez les enfants contaminés.

Chez les patients chroniquement infectés, le tropisme du HIV-1 pourrait être un marqueur prédictif de l'évolution de la maladie, car l'émergence des virus X4 semble précéder l'accélération de la décroissance des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et l'évolution vers le stade SIDA [Koot et al., 1993; Maas et al., 2000]. La définition de critères biologiques pour l'initiation d'un traitement antirétroviral est toujours à l'étude, les critères actuels tenant compte de l'impact bénéfique du traitement sur la préservation des lymphocytes T d'une part, et de la toxicité au long cours des molécules antirétrovirales d'autre part. Des études sont nécessaires pour évaluer l'apport du tropisme viral comme critère biologique de décision thérapeutique.

L'émergence des virus X4 survient chez 50% des patients environ dans l'infection par le HIV-1 de sous-type B. Les patients infectés par un virus R5 à un stade tardif de la maladie évoluent aussi vers le stade SIDA [Shankarappa et al., 1999]. Différents travaux suggèrent que les virus R5 pourraient évoluer vers une pathogénicité accrue sans évoluer vers un phénotype d'entrée X4. Les mécanismes qui pourraient contribuer à la pathogénicité accrue des virus R5 « tardifs » sont une augmentation de l'affinité de la gp120 de ces virus pour CCR5 et donc une moindre sensibilité à l'inhibition compétitive par les chimiokines MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  et RANTES, ou encore la capacité de la gp120 de ces virus à signaler via CXCR4 et induire l'apoptose sans entrer dans les cellules [Karlsson et al., 2004; Karlsson et al., 2005; Kwa et al., 2003]. Nous voulons étudier la pathogénicité des virus R5 « tardifs » dans des tests d'induction d'apoptose et dans le modèle macaque.

Enfin, l'utilisation des antagonistes de CCR5 a nécessité le développement des techniques de détermination du tropisme et requiert aujourd'hui la caractérisation des échecs virologiques. Les échecs virologiques sous anti-CCR5 peuvent être associés à la sélection de variants R5X4/X4 minoritaires avant la prescription du traitement ou à l'émergence de virus R5 capables d'utiliser le corécepteur CCR5 en présence de l'antagoniste [Westby et al., 2006; Westby et al., 2007]. Les tests phénotypiques sont actuellement les seuls à pouvoir déterminer la sensibilité du virus aux anti-CCR5, tandis que les déterminants génotypiques de la résistance se sont révélés hétérogènes entre les virus R5 isolés lors de l'échec [Lewis et al., 2010; Lewis et al., 2008]. Les techniques de séquençage à haut débit et de phénotypage permettront d'analyser les corrélations génotype-phénotype avec des tests ultrasensibles et

ainsi de développer des algorithmes génotypiques de résistance pour les antagonistes de CCR5 qui devraient faciliter la prise en charge thérapeutique des patients.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Alaeus A, Lidman K, Bjorkman A, Giesecke J, Albert J. 1999. Similar rate of disease progression among individuals infected with HIV-1 genetic subtypes A-D. *AIDS* (London, England) 13(8):901-907.
- Alfsen A, Bomsel M. 2002. HIV-1 gp41 envelope residues 650-685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide. *J Biol Chem* 277(28):25649-25659.
- Alkhatib G. 2009. The biology of CCR5 and CXCR4. *Current opinion in HIV and AIDS* 4(2):96-103.
- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272(5270):1955-1958.
- Archer J, Braverman MS, Taillon BE, Desany B, James I, Harrigan PR, Lewis M, Robertson DL. 2009. Detection of low-frequency pretherapy chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4)-using HIV-1 with ultra-deep pyrosequencing. *AIDS* (London, England) 23(10):1209-1218.
- Arthos J, Cicala C, Martinelli E, Macleod K, Van Ryk D, Wei D, Xiao Z, Veenstra TD, Conrad TP, Lempicki RA, McLaughlin S, Pascuccio M, Gopaul R, McNally J, Cruz CC, Censoplano N, Chung E, Reitano KN, Kottlilil S, Goode DJ, Fauci AS. 2008. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nature immunology* 9(3):301-309.
- Baeten JM, Chohan B, Lavreys L, Chohan V, McClelland RS, Certain L, Mandaliya K, Jaoko W, Overbaugh J. 2007. HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *The Journal of infectious diseases* 195(8):1177-1180.
- Balabanian K, Harriague J, Decrion C, Lagane B, Shorte S, Baleux F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Chakrabarti LA. 2004. CXCR4-tropic HIV-1 envelope glycoprotein functions as a viral chemokine in unstimulated primary CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 173(12):7150-7160.
- Balotta C, Bagnarelli P, Violin M, Ridolfo AL, Zhou D, Berlusconi A, Corvasce S, Corbellino M, Clementi M, Clerici M, Moroni M, Galli M. 1997. Homozygous delta 32 deletion of the CCR-5 chemokine receptor gene in an HIV-1-infected patient. *AIDS* (London, England) 11(10):F67-71.
- Bannert N, Schenten D, Craig S, Sodroski J. 2000. The level of CD4 expression limits infection of primary rhesus monkey macrophages by a T-tropic simian immunodeficiency virus and macrophagetropic human immunodeficiency viruses. *J Virol* 74(23):10984-10993.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220(4599):868-871.
- Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, Sattentau QJ, Schuitemaker H, Sodroski J, Weiss RA. 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* 391(6664):240.
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual review of immunology* 17:657-700.
- Bernstein HB, Wang G, Plasterer MC, Zack JA, Ramasastry P, Mumenthaler SM, Kitchen CM. 2009. CD4+ NK cells can be productively infected with HIV, leading to downregulation of CD4 expression and changes in function. *Virology* 387(1):59-66.
- Biti R, Ffrench R, Young J, Bennetts B, Stewart G, Liang T. 1997. HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nature medicine* 3(3):252-253.

- Blanpain C, Doranz BJ, Bondue A, Govaerts C, De Leener A, Vassart G, Doms RW, Proudfoot A, Parmentier M. 2003. The core domain of chemokines binds CCR5 extracellular domains while their amino terminus interacts with the transmembrane helix bundle. *J Biol Chem* 278(7):5179-5187.
- Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. 1997. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(5):1925-1930.
- Bobardt MD, Saphire AC, Hung HC, Yu X, Van der Schueren B, Zhang Z, David G, Galloway PA. 2003. Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. *Immunity* 18(1):27-39.
- Bomsel M, David V. 2002. Mucosal gatekeepers: selecting HIV viruses for early infection. *Nature medicine* 8(2):114-116.
- Bou-Habib DC, Roderiquez G, Oravec T, Berman PW, Lusso P, Norcross MA. 1994. Cryptic nature of envelope V3 region epitopes protects primary monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 from antibody neutralization. *J Virol* 68(9):6006-6013.
- Brandful JA, Coetzer ME, Cilliers T, Phoswa M, Papathanasopoulos MA, Morris L, Moore PL. 2007. Phenotypic characterization of HIV type 1 isolates from Ghana. *AIDS research and human retroviruses* 23(1):144-152.
- Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT, Douek DC. 2004. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine* 200(6):749-759.
- Briggs DR, Tuttle DL, Sleasman JW, Goodenow MM. 2000. Envelope V3 amino acid sequence predicts HIV-1 phenotype (co-receptor usage and tropism for macrophages). *AIDS (London, England)* 14(18):2937-2939.
- Brumme ZL, Goodrich J, Mayer HB, Brumme CJ, Henrick BM, Wynhoven B, Asselin JJ, Cheung PK, Hogg RS, Montaner JS, Harrigan PR. 2005. Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals. *The Journal of infectious diseases* 192(3):466-474.
- Burger H, Hoover D. 2008. HIV-1 tropism, disease progression, and clinical management. *The Journal of infectious diseases* 198(8):1095-1097.
- Caffrey M. 2001. Model for the structure of the HIV gp41 ectodomain: insight into the intermolecular interactions of the gp41 loop. *Biochimica et biophysica acta* 1536(2-3):116-122.
- Carter CC, Onafuwa-Nuga A, McNamara LA, Riddell Jt, Bixby D, Savona MR, Collins KL. 2010. HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. *Nature medicine* 16(4):446-451.
- Cecilia D, Kulkarni SS, Tripathy SP, Gangakhedkar RR, Paranjape RS, Gadkari DA. 2000. Absence of coreceptor switch with disease progression in human immunodeficiency virus infections in India. *Virology* 271(2):253-258.
- Chen B, Vogan EM, Gong H, Skehel JJ, Wiley DC, Harrison SC. 2005. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* 433(7028):834-841.
- Choge I, Cilliers T, Walker P, Taylor N, Phoswa M, Meyers T, Viljoen J, Violari A, Gray G, Moore PL, Papathanasopoulos M, Morris L. 2006. Genotypic and phenotypic characterization of viral isolates from HIV-1 subtype C-infected children with slow and rapid disease progression. *AIDS research and human retroviruses* 22(5):458-465.
- Cicala C, Arthos J, Martinelli E, Censoplano N, Cruz CC, Chung E, Selig SM, Van Ryk D, Yang J, Jagannatha S, Chun TW, Ren P, Lempicki RA, Fauci AS. 2006. R5 and X4

- HIV envelopes induce distinct gene expression profiles in primary peripheral blood mononuclear cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(10):3746-3751.
- Cicala C, Arthos J, Rubbert A, Selig S, Wildt K, Cohen OJ, Fauci AS. 2000. HIV-1 envelope induces activation of caspase-3 and cleavage of focal adhesion kinase in primary human CD4(+) T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(3):1178-1183.
- Cicala C, Arthos J, Ruiz M, Vaccarezza M, Rubbert A, Riva A, Wildt K, Cohen O, Fauci AS. 1999. Induction of phosphorylation and intracellular association of CC chemokine receptor 5 and focal adhesion kinase in primary human CD4+ T cells by macrophage-tropic HIV envelope. *J Immunol* 163(1):420-426.
- Cilliers T, Nhlapo J, Coetzer M, Orlovic D, Ketas T, Olson WC, Moore JP, Trkola A, Morris L. 2003. The CCR5 and CXCR4 coreceptors are both used by human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from subtype C. *J Virol* 77(7):4449-4456.
- Clavel F, Guyader M, Guetard D, Salle M, Montagnier L, Alizon M. 1986. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* 324(6098):691-695.
- Clerici M, Butto S, Lukwiya M, Saresella M, Declich S, Trabattoni D, Pastori C, Piconi S, Fracasso C, Fabiani M, Ferrante P, Rizzardini G, Lopalco L. 2000. Immune activation in africa is environmentally-driven and is associated with upregulation of CCR5. Italian-Ugandan AIDS Project. *AIDS (London, England)* 14(14):2083-2092.
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. 1995. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270(5243):1811-1815.
- Connell BJ, Michler K, Capovilla A, Venter WD, Stevens WS, Papathanasopoulos MA. 2008. Emergence of X4 usage among HIV-1 subtype C: evidence for an evolving epidemic in South Africa. *AIDS (London, England)* 22(7):896-899.
- Cornelissen M, Mulder-Kampinga G, Veenstra J, Zorgdrager F, Kuiken C, Hartman S, Dekker J, van der Hoek L, Sol C, Coutinho R, et al. 1995. Syncytium-inducing (SI) phenotype suppression at seroconversion after intramuscular inoculation of a non-syncytium-inducing/SI phenotypically mixed human immunodeficiency virus population. *J Virol* 69(3):1810-1818.
- Crabb C. 2006. GlaxoSmithKline ends aplavivoc trials. *AIDS (London, England)* 20(5):641.
- Curtis BM, Scharnowske S, Watson AJ. 1992. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(17):8356-8360.
- Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312(5996):763-767.
- Dalmau J, Puertas MC, Azuara M, Marino A, Frahm N, Mothe B, Izquierdo-Useros N, Buzon MJ, Paredes R, Matas L, Allen TM, Brander C, Rodrigo C, Clotet B, Martinez-Picado J. 2009. Contribution of immunological and virological factors to extremely severe primary HIV type 1 infection. *Clin Infect Dis* 48(2):229-238.
- Davenport MP, Zaunders JJ, Hazenberg MD, Schuitemaker H, van Rij RP. 2002. Cell turnover and cell tropism in HIV-1 infection. *Trends in microbiology* 10(6):275-278.
- De Jong JJ, De Ronde A, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J. 1992. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-

- inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol* 66(11):6777-6780.
- de Mendoza C, Rodriguez C, Garcia F, Eiros JM, Ruiz L, Caballero E, Aguilera A, Leiva P, Colomina J, Gutierrez F, del Romero J, Aguero J, Soriano V. 2007. Prevalence of X4 tropic viruses in patients recently infected with HIV-1 and lack of association with transmission of drug resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 59(4):698-704.
- de Mendoza C, Van Baelen K, Poveda E, Rondelez E, Zahonero N, Stuyver L, Garrido C, Villacian J, Soriano V. 2008. Performance of a population-based HIV-1 tropism phenotypic assay and correlation with V3 genotypic prediction tools in recent HIV-1 seroconverters. *J Acquir Immune Defic Syndr* 48(3):241-244.
- de Vries FP, van Der Ende A, van Putten JP, Dankert J. 1996. Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by *Neisseria meningitidis* is controlled by phase variation of multiple surface antigens. *Infection and immunity* 64(8):2998-3006.
- Deeks SG, Kitchen CM, Liu L, Guo H, Gascon R, Narvaez AB, Hunt P, Martin JN, Kahn JO, Levy J, McGrath MS, Hecht FM. 2004. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* 104(4):942-947.
- Delobel P, Nugeyre MT, Cazabat M, Pasquier C, Marchou B, Massip P, Barre-Sinoussi F, Israel N, Izopet J. 2007. Population-based sequencing of the V3 region of env for predicting the coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies. *J Clin Microbiol* 45(5):1572-1580.
- Delobel P, Nugeyre MT, Cazabat M, Sandres-Saune K, Pasquier C, Cuzin L, Marchou B, Massip P, Cheynier R, Barre-Sinoussi F, Izopet J, Israel N. 2006. Naive T-cell depletion related to infection by X4 human immunodeficiency virus type 1 in poor immunological responders to highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 80(20):10229-10236.
- Delobel P, Raymond S, Mavigner M, Cazabat M, Alvarez M, Marchou B, Massip P, Izopet J. 2010. Shift in phenotypic susceptibility suggests a competition mechanism in a case of acquired resistance to maraviroc. *AIDS (London, England)* 24(9):1382-1384.
- Delobel P, Sandres-Saune K, Cazabat M, Pasquier C, Marchou B, Massip P, Izopet J. 2005. R5 to X4 switch of the predominant HIV-1 population in cellular reservoirs during effective highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 38(4):382-392.
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381(6584):661-666.
- Di Mascio M, Sereti I, Matthews LT, Natarajan V, Adelsberger J, Lempicki R, Yoder C, Jones E, Chow C, Metcalf JA, Sidorov IA, Dimitrov DS, Polis MA, Kovacs JA. 2006. Naive T-cell dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection: effects of highly active antiretroviral therapy provide insights into the mechanisms of naive T-cell depletion. *J Virol* 80(6):2665-2674.
- Dolin R. 2008. A new class of anti-HIV therapy and new challenges. *The New England journal of medicine* 359(14):1509-1511.
- Doranz BJ, Fillion LG, Diaz-Mitoma F, Sitar DS, Sahai J, Baribaud F, Orsini MJ, Benovic JL, Cameron W, Doms RW. 2001. Safe use of the CXCR4 inhibitor ALX40-4C in humans. *AIDS research and human retroviruses* 17(6):475-486.
- Doranz BJ, Grovit-Ferbas K, Sharron MP, Mao SH, Goetz MB, Daar ES, Doms RW, O'Brien WA. 1997. A small-molecule inhibitor directed against the chemokine receptor



- CXCR4 prevents its use as an HIV-1 coreceptor. *The Journal of experimental medicine* 186(8):1395-1400.
- Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, Mori J, Rickett G, Smith-Burchnell C, Napier C, Webster R, Armour D, Price D, Stammen B, Wood A, Perros M. 2005. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49(11):4721-4732.
- Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, Polis MA, Haase AT, Feinberg MB, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack JA, Picker LJ, Koup RA. 1998. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396(6712):690-695.
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381(6584):667-673.
- Dragic T, Trkola A, Thompson DA, Cormier EG, Kajumo FA, Maxwell E, Lin SW, Ying W, Smith SO, Sakmar TP, Moore JP. 2000. A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(10):5639-5644.
- Edinger AL, Hoffman TL, Sharron M, Lee B, O'Dowd B, Doms RW. 1998. Use of GPR1, GPR15, and STRL33 as coreceptors by diverse human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus envelope proteins. *Virology* 249(2):367-378.
- Ellery PJ, Crowe SM. 2005. Phenotypic characterization of blood monocytes from HIV-infected individuals. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ 304):343-353.
- Ellery PJ, Tippett E, Chiu YL, Paukovics G, Cameron PU, Solomon A, Lewin SR, Gorry PR, Jaworowski A, Greene WC, Sonza S, Crowe SM. 2007. The CD16+ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. *J Immunol* 178(10):6581-6589.
- Esbjornsson J, Mansson F, Martinez-Arias W, Vincic E, Biague AJ, da Silva ZJ, Fenyo EM, Norrgren H, Medstrand P. 2010. Frequent CXCR4 tropism of HIV-1 subtype A and CRF02\_AG during late-stage disease--indication of an evolving epidemic in West Africa. *Retrovirology* 7:23.
- Eshleman SH, Husnik M, Hudelson S, Donnell D, Huang Y, Huang W, Hart S, Jackson B, Coates T, Chesney M, Koblin B. 2007. Antiretroviral drug resistance, HIV-1 tropism, and HIV-1 subtype among men who have sex with men with recent HIV-1 infection. *AIDS (London, England)* 21(9):1165-1174.
- Fackler OT, Peterlin BM. 2000. Endocytic entry of HIV-1. *Curr Biol* 10(16):1005-1008.
- Fatkenheuer G, Nelson M, Lazzarin A, Konourina I, Hoepelman AI, Lampiris H, Hirschel B, Tebas P, Raffi F, Trottier B, Bellos N, Saag M, Cooper DA, Westby M, Tawadrous M, Sullivan JF, Ridgway C, Dunne MW, Felstead S, Mayer H, van der Ryst E. 2008. Subgroup analyses of maraviroc in previously treated R5 HIV-1 infection. *The New England journal of medicine* 359(14):1442-1455.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272(5263):872-877.
- Ferri KF, Jacotot E, Blanco J, Este JA, Zamzami N, Susin SA, Xie Z, Brothers G, Reed JC, Penninger JM, Kroemer G. 2000. Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases. *The Journal of experimental medicine* 192(8):1081-1092.

- Fouchier RA, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F, Schuitemaker H. 1992. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol* 66(5):3183-3187.
- Frangé P, Chaix ML, Raymond S, Galimand J, Deveau C, Meyer L, Goujard C, Rouzioux C, Izopet J. 2010. Low frequency of CXCR4-using viruses in patients at the time of primary HIV-1 non-B infection. *J Clin Microbiol*.
- Frangé P, Galimand J, Goujard C, Deveau C, Ghosn J, Rouzioux C, Meyer L, Chaix ML. 2009. High frequency of X4/DM-tropic viruses in PBMC samples from patients with primary HIV-1 subtype-B infection in 1996-2007: the French ANRS CO06 PRIMO Cohort Study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 64(1):135-141.
- Furuta Y, Eriksson K, Svennerholm B, Fredman P, Horal P, Jeansson S, Vahlne A, Holmgren J, Czerkinsky C. 1994. Infection of vaginal and colonic epithelial cells by the human immunodeficiency virus type 1 is neutralized by antibodies raised against conserved epitopes in the envelope glycoprotein gp120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(26):12559-12563.
- Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397(6718):436-441.
- Gao F, Yue L, White AT, Pappas PG, Barchue J, Hanson AP, Greene BM, Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH. 1992. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* 358(6386):495-499.
- Garrido C, Roulet V, Chueca N, Poveda E, Aguilera A, Skrabal K, Zahonero N, Carlos S, Garcia F, Faudon JL, Soriano V, de Mendoza C. 2008. Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *J Clin Microbiol* 46(3):887-891.
- Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duinshoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100(5):587-597.
- Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, Shih R, Lewis J, Wiley DJ, Phair JP, Wolinsky SM, Detels R. 1999. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *The Journal of infectious diseases* 179(4):859-870.
- Glushakova S, Grivel JC, Fitzgerald W, Sylwester A, Zimmerberg J, Margolis LB. 1998. Evidence for the HIV-1 phenotype switch as a causal factor in acquired immunodeficiency. *Nature medicine* 4(3):346-349.
- Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G, Nibbs RJ, Freedman BI, Quinones MP, Bamshad MJ, Murthy KK, Rovin BH, Bradley W, Clark RA, Anderson SA, O'Connell R J, Agan BK, Ahuja SS, Bologna R, Sen L, Dolan MJ, Ahuja SK. 2005. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 307(5714):1434-1440.
- Goodnow MM, Collman RG. 2006. HIV-1 coreceptor preference is distinct from target cell tropism: a dual-parameter nomenclature to define viral phenotypes. *Journal of leukocyte biology* 80(5):965-972.
- Gordon CJ, Muesing MA, Proudfoot AE, Power CA, Moore JP, Trkola A. 1999. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection by the CC-chemokine RANTES is independent of the mechanism of virus-cell fusion. *J Virol* 73(1):684-694.

- Gorry PR, Zhang C, Wu S, Kunstman K, Trachtenberg E, Phair J, Wolinsky S, Gabuzda D. 2002. Persistence of dual-tropic HIV-1 in an individual homozygous for the CCR5 Delta 32 allele. *Lancet* 359(9320):1832-1834.
- Gougeon ML. 2003. Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nat Rev Immunol* 3(5):392-404.
- Granelli-Piperno A, Delgado E, Finkel V, Paxton W, Steinman RM. 1998. Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J Virol* 72(4):2733-2737.
- Grewe C, Beck A, Gelderblom HR. 1990. HIV: early virus-cell interactions. *J Acquir Immune Defic Syndr* 3(10):965-974.
- Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. 2006. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nature medicine* 12(3):289-295.
- Gulick RM, Su Z, Flexner C, Hughes MD, Skolnik PR, Wilkin TJ, Gross R, Krambrink A, Coakley E, Greaves WL, Zolopa A, Reichman R, Godfrey C, Hirsch M, Kuritzkes DR. 2007. Phase 2 study of the safety and efficacy of vicriviroc, a CCR5 inhibitor, in HIV-1-Infected, treatment-experienced patients: AIDS clinical trials group 5211. *The Journal of infectious diseases* 196(2):304-312.
- Harouse JM, Bhat S, Spitalnik SL, Laughlin M, Stefano K, Silberberg DH, Gonzalez-Scarano F. 1991. Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science* 253(5017):320-323.
- Harouse JM, Buckner C, Gettie A, Fuller R, Bohm R, Blanchard J, Cheng-Mayer C. 2003. CD8+ T cell-mediated CXCR4 chemokine receptor 4-simian/human immunodeficiency virus suppression in dually infected rhesus macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(19):10977-10982.
- Harouse JM, Gettie A, Tan RC, Blanchard J, Cheng-Mayer C. 1999. Distinct pathogenic sequela in rhesus macaques infected with CCR5 or CXCR4 utilizing SHIVs. *Science* 284(5415):816-819.
- Hayman A, Moss T, Arnold C, Naylor-Adamson L, Balfe P. 2004. Disease progression in heterosexual patients infected with closely related subtype B strains of HIV type 1 with differing coreceptor usage properties. *AIDS research and human retroviruses* 20(4):365-371.
- Hayward P. 2004. Viral proteins cause cell death in HIV-associated dementia. *Lancet neurology* 3(6):325.
- Hazenberg MD, Otto SA, Hamann D, Roos MT, Schuitemaker H, de Boer RJ, Miedema F. 2003. Depletion of naive CD4 T cells by CXCR4-using HIV-1 variants occurs mainly through increased T-cell death and activation. *AIDS (London, England)* 17(10):1419-1424.
- Herbeuval JP, Grivel JC, Boasso A, Hardy AW, Chougnat C, Dolan MJ, Yagita H, Lifson JD, Shearer GM. 2005. CD4+ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood* 106(10):3524-3531.
- Hirsch VM, Olmsted RA, Murphey-Corb M, Purcell RH, Johnson PR. 1989. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 339(6223):389-392.
- Ho SH, Shek L, Gettie A, Blanchard J, Cheng-Mayer C. 2005. V3 loop-determined coreceptor preference dictates the dynamics of CD4+-T-cell loss in simian-human immunodeficiency virus-infected macaques. *J Virol* 79(19):12296-12303.
- Hoetelmans RM. 1998. Sanctuary sites in HIV-1 infection. *Antiviral therapy* 3 Suppl 4:13-17.

- Hogan CM, Hammer SM. 2001. Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics. *Annals of internal medicine* 134(10):978-996.
- Hoshino Y, Tse DB, Rochford G, Prabhakar S, Hoshino S, Chitkara N, Kuwabara K, Ching E, Raju B, Gold JA, Borkowsky W, Rom WN, Pine R, Weiden M. 2004. Mycobacterium tuberculosis-induced CXCR4 and chemokine expression leads to preferential X4 HIV-1 replication in human macrophages. *J Immunol* 172(10):6251-6258.
- Huang CC, Tang M, Zhang MY, Majeed S, Montabana E, Stanfield RL, Dimitrov DS, Korber B, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt R, Kwong PD. 2005. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* 310(5750):1025-1028.
- Huang W, Eshleman SH, Toma J, Fransen S, Stawiski E, Paxinos EE, Whitcomb JM, Young AM, Donnell D, Mmiro F, Musoke P, Guay LA, Jackson JB, Parkin NT, Petropoulos CJ. 2007. Coreceptor tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtype D: high prevalence of CXCR4 tropism and heterogeneous composition of viral populations. *J Virol* 81(15):7885-7893.
- Huang W, Toma J, Fransen S, Stawiski E, Reeves JD, Whitcomb JM, Parkin N, Petropoulos CJ. 2008. Coreceptor tropism can be influenced by amino acid substitutions in the gp41 transmembrane subunit of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol* 82(11):5584-5593.
- Hunt PW, Harrigan PR, Huang W, Bates M, Williamson DW, McCune JM, Price RW, Spudich SS, Lampiris H, Hoh R, Leigler T, Martin JN, Deeks SG. 2006. Prevalence of CXCR4 tropism among antiretroviral-treated HIV-1-infected patients with detectable viremia. *The Journal of infectious diseases* 194(7):926-930.
- Hutter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Mussig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kucherer C, Blau O, Blau IW, Hofmann WK, Thiel E. 2009. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *The New England journal of medicine* 360(7):692-698.
- Hwang SS, Boyle TJ, Lysterly HK, Cullen BR. 1991. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* 253(5015):71-74.
- Ichiyama K, Yokoyama-Kumakura S, Tanaka Y, Tanaka R, Hirose K, Bannai K, Edamatsu T, Yanaka M, Niitani Y, Miyano-Kurosaki N, Takaku H, Koyanagi Y, Yamamoto N. 2003. A duodenally absorbable CXC chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(7):4185-4190.
- Izopet J, Cazabat M, Pasquier C, Sandres-Saune K, Bonnet E, Marchou B, Massip P, Puel J. 2002. Evolution of total and integrated HIV-1 DNA and change in DNA sequences in patients with sustained plasma virus suppression. *Virology* 302(2):393-404.
- Jayakumar P, Berger I, Autschbach F, Weinstein M, Funke B, Verdin E, Goldsmith MA, Keppler OT. 2005. Tissue-resident macrophages are productively infected ex vivo by primary X4 isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 79(8):5220-5226.
- Jensen MA, Coetzer M, van 't Wout AB, Morris L, Mullins JI. 2006. A reliable phenotype predictor for human immunodeficiency virus type 1 subtype C based on envelope V3 sequences. *J Virol* 80(10):4698-4704.
- Jensen MA, Li FS, van 't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, McLaughlin S, Shankarappa R, Margolick JB, Mullins JI. 2003. Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *J Virol* 77(24):13376-13388.

- Jensen MA, van 't Wout AB. 2003. Predicting HIV-1 coreceptor usage with sequence analysis. *AIDS reviews* 5(2):104-112.
- Jetzt AE, Yu H, Klarmann GJ, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP. 2000. High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* 74(3):1234-1240.
- Johnston ER, Zijenah LS, Mutetwa S, Kantor R, Kittinunvorakoon C, Katzenstein DA. 2003. High frequency of syncytium-inducing and CXCR4-tropic viruses among human immunodeficiency virus type 1 subtype C-infected patients receiving antiretroviral treatment. *J Virol* 77(13):7682-7688.
- Jolly C, Kashefi K, Hollinshead M, Sattentau QJ. 2004. HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *The Journal of experimental medicine* 199(2):283-293.
- Jung A, Maier R, Vartanian JP, Bocharov G, Jung V, Fischer U, Meese E, Wain-Hobson S, Meyerhans A. 2002. Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature* 418(6894):144.
- Kaleebu P, French N, Mahe C, Yirrell D, Watera C, Lyagoba F, Nakiyingi J, Rutebemberwa A, Morgan D, Weber J, Gilks C, Whitworth J. 2002. Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda. *The Journal of infectious diseases* 185(9):1244-1250.
- Kanbara K, Sato S, Tanuma J, Tamamura H, Gotoh K, Yoshimori M, Kanamoto T, Kitano M, Fujii N, Nakashima H. 2001. Biological and genetic characterization of a human immunodeficiency virus strain resistant to CXCR4 antagonist T134. *AIDS research and human retroviruses* 17(7):615-622.
- Karlsson I, Antonsson L, Shi Y, Oberg M, Karlsson A, Albert J, Olde B, Owman C, Jansson M, Fenyo EM. 2004. Coevolution of RANTES sensitivity and mode of CCR5 receptor use by human immunodeficiency virus type 1 of the R5 phenotype. *J Virol* 78(21):11807-11815.
- Karlsson I, Grivel JC, Chen SS, Karlsson A, Albert J, Fenyo EM, Margolis LB. 2005. Differential pathogenesis of primary CCR5-using human immunodeficiency virus type 1 isolates in ex vivo human lymphoid tissue. *J Virol* 79(17):11151-11160.
- Kawamura T, Gulden FO, Sugaya M, McNamara DT, Borris DL, Lederman MM, Orenstein JM, Zimmerman PA, Blauvelt A. 2003. R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(14):8401-8406.
- Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Chen Y, Wain LV, Liegeois F, Loul S, Ngole EM, Bienvenue Y, Delaporte E, Brookfield JF, Sharp PM, Shaw GM, Peeters M, Hahn BH. 2006. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313(5786):523-526.
- Kilby JM, Eron JJ. 2003. Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *The New England journal of medicine* 348(22):2228-2238.
- Kimata JT, Kuller L, Anderson DB, Dailey P, Overbaugh J. 1999. Emerging cytopathic and antigenic simian immunodeficiency virus variants influence AIDS progression. *Nature medicine* 5(5):535-541.
- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312(5996):767-768.
- Koot M, Keet IP, Vos AH, de Goede RE, Roos MT, Coutinho RA, Miedema F, Schellekens PT, Tersmette M. 1993. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for

- rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Annals of internal medicine* 118(9):681-688.
- Koot M, Vos AH, Keet RP, de Goede RE, Dercksen MW, Terpstra FG, Coutinho RA, Miedema F, Tersmette M. 1992. HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay. *AIDS (London, England)* 6(1):49-54.
- Kwa D, Vingerhoed J, Boeser B, Schuitemaker H. 2003. Increased in vitro cytopathicity of CC chemokine receptor 5-restricted human immunodeficiency virus type 1 primary isolates correlates with a progressive clinical course of infection. *The Journal of infectious diseases* 187(9):1397-1403.
- Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, Hendrickson WA, Littman DR. 2002. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* 16(1):135-144.
- Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393(6686):648-659.
- Lapidot T, Kollet O. 2002. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia* 16(10):1992-2003.
- Larkin M, Childs RA, Matthews TJ, Thiel S, Mizuochi T, Lawson AM, Savill JS, Haslett C, Diaz R, Feizi T. 1989. Oligosaccharide-mediated interactions of the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 that are independent of CD4 recognition. *AIDS (London, England)* 3(12):793-798.
- Laurent C, Bourgeois A, Faye MA, Mougnotou R, Seydi M, Gueye M, Liegeois F, Kane CT, Butel C, Mbuagbaw J, Zekeng L, Mboup S, Mpoudi-Ngole E, Peeters M, Delaporte E. 2002. No difference in clinical progression between patients infected with the predominant human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant form (CRF) 02\_AG strain and patients not infected with CRF02\_AG, in Western and West-Central Africa: a four-year prospective multicenter study. *The Journal of infectious diseases* 186(4):486-492.
- Lee B, Sharron M, Montaner LJ, Weissman D, Doms RW. 1999. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(9):5215-5220.
- Lehner T. 2002. The role of CCR5 chemokine ligands and antibodies to CCR5 coreceptors in preventing HIV infection. *Trends in immunology* 23(7):347-351.
- Lewis J, Simpson P, Delogne C, Sullivan J, Valdez H, dong W, Woods C, Harrigan PR, Westby M. 2010. Genotypic Analysis of the HIV-1 gp120 V3 Loop for Treatment-experienced Patients Enrolled into the MOTIVATE Studies and Who Received Maraviroc + Optimized Background Therapy. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco, California.
- Lewis M, Mori J, Simpson P, Whitcomb J, Li X, Robertson D, Westby M. 2008. Changes in V3 Loop Sequence Associated with Failure of Maraviroc Treatment in Patients Enrolled in the MOTIVATE 1 and 2 Trials. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, Massachusetts.
- Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y, Reilly C, Carlis J, Miller CJ, Haase AT. 2005. Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* 434(7037):1148-1152.
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR. 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for

- resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86(3):367-377.
- Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV. 1997. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 16(2):83-92.
- Low AJ, Dong W, Chan D, Sing T, Swanstrom R, Jensen M, Pillai S, Good B, Harrigan PR. 2007. Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4 co-receptor usage in clinical isolates. *AIDS (London, England)* 21(14):F17-24.
- Maas JJ, Gange SJ, Schuitemaker H, Coutinho RA, van Leeuwen R, Margolick JB. 2000. Strong association between failure of T cell homeostasis and the syncytium-inducing phenotype among HIV-1-infected men in the Amsterdam Cohort Study. *AIDS (London, England)* 14(9):1155-1161.
- Mack M, Luckow B, Nelson PJ, Cihak J, Simmons G, Clapham PR, Signoret N, Marsh M, Stangassinger M, Borlat F, Wells TN, Schlondorff D, Proudfoot AE. 1998. Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity. *The Journal of experimental medicine* 187(8):1215-1224.
- Mansky LM, Temin HM. 1995. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* 69(8):5087-5094.
- Marechal V, Prevost MC, Petit C, Perret E, Heard JM, Schwartz O. 2001. Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J Virol* 75(22):11166-11177.
- Markowitz M, Mohri H, Mehandru S, Shet A, Berry L, Kalyanaraman R, Kim A, Chung C, Jean-Pierre P, Horowitz A, La Mar M, Wrin T, Parkin N, Poles M, Petropoulos C, Mullen M, Boden D, Ho DD. 2005. Infection with multidrug resistant, dual-tropic HIV-1 and rapid progression to AIDS: a case report. *Lancet* 365(9464):1031-1038.
- Marozsan AJ, Torre VS, Johnson M, Ball SC, Cross JV, Templeton DJ, Quinones-Mateu ME, Offord RE, Arts EJ. 2001. Mechanisms involved in stimulation of human immunodeficiency virus type 1 replication by aminooxypentane RANTES. *J Virol* 75(18):8624-8638.
- Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. 2005. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 434(7037):1093-1097.
- Mavigner M, Delobel P, Cazabat M, Dubois M, L'Faqihi-Olive FE, Raymond S, Pasquier C, Marchou B, Massip P, Izopet J. 2009. HIV-1 residual viremia correlates with persistent T-cell activation in poor immunological responders to combination antiretroviral therapy. *PloS one* 4(10):e7658.
- McDonald D, Wu L, Bohks SM, KewalRamani VN, Unutmaz D, Hope TJ. 2003. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 300(5623):1295-1297.
- McGovern R, Dong W, Zhong X, Knapp D, Thielen A, Chapman D, Lewis M, James I, Valdez H, Harrigan PR. 2010a. Population-based Sequencing of the V3-loop Is Comparable to the Enhanced Sensitivity Trofile Assay in Predicting Virologic Response to Maraviroc of Treatment-naïve Patients in the MERIT Trial. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco, California.
- McGovern RA, Thielen A, Mo T, Dong W, Woods CK, Chapman D, Lewis M, James I, Heera J, Valdez H, Harrigan PR. 2010b. Population-based V3 genotypic tropism

- assay: a retrospective analysis using screening samples from the A4001029 and MOTIVATE studies. *AIDS* (London, England).
- Melar M, Ott DE, Hope TJ. 2007. Physiological levels of virion-associated human immunodeficiency virus type 1 envelope induce coreceptor-dependent calcium flux. *J Virol* 81(4):1773-1785.
- Melby T, Despirito M, Demasi R, Heilek-Snyder G, Greenberg ML, Graham N. 2006. HIV-1 coreceptor use in triple-class treatment-experienced patients: baseline prevalence, correlates, and relationship to enfuvirtide response. *The Journal of infectious diseases* 194(2):238-246.
- Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, Kingsley LA, Todd JA, Saah AJ, Detels R, Phair JP, Rinaldo CR, Jr. 1997. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Annals of internal medicine* 126(12):946-954.
- Mellors JW, Rinaldo CR, Jr., Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272(5265):1167-1170.
- Michler K, Connell BJ, Venter WD, Stevens WS, Capovilla A, Papathanasopoulos MA. 2008. Genotypic characterization and comparison of full-length envelope glycoproteins from South African HIV type 1 subtype C primary isolates that utilize CCR5 and/or CXCR4. *AIDS research and human retroviruses* 24(5):743-751.
- Miller CJ, Hu J. 1999. T cell-tropic simian immunodeficiency virus (SIV) and simian-human immunodeficiency viruses are readily transmitted by vaginal inoculation of rhesus macaques, and Langerhans' cells of the female genital tract are infected with SIV. *The Journal of infectious diseases* 179 Suppl 3:S413-417.
- Miller CJ, Shattock RJ. 2003. Target cells in vaginal HIV transmission. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5(1):59-67.
- Miyauchi K, Kim Y, Latinovic O, Morozov V, Melikyan GB. 2009. HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell* 137(3):433-444.
- Mo H, Monard S, Pollack H, Ip J, Rochford G, Wu L, Hoxie J, Borkowsky W, Ho DD, Moore JP. 1998. Expression patterns of the HIV type 1 coreceptors CCR5 and CXCR4 on CD4+ T cells and monocytes from cord and adult blood. *AIDS research and human retroviruses* 14(7):607-617.
- Mondor I, Ugolini S, Sattentau QJ. 1998. Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *J Virol* 72(5):3623-3634.
- Mori J, Mosley M, Lewis M, Simpson P, Toma J, Huang W, Whitcomb J, Ciaramella G, Westby M. 2007. Characterization of maraviroc resistance in patients failing treatment with CCR5-tropic virus in MOTIVATE 1 and MOTIVATE 2. XVI International HIV Drug Resistance Workshop. Barbados, West Indies.
- Murakami T, Nakajima T, Koyanagi Y, Tachibana K, Fujii N, Tamamura H, Yoshida N, Waki M, Matsumoto A, Yoshie O, Kishimoto T, Yamamoto N, Nagasawa T. 1997. A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *The Journal of experimental medicine* 186(8):1389-1393.
- Murdoch C. 2000. CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunological reviews* 177:175-184.
- Myszka DG, Sweet RW, Hensley P, Brigham-Burke M, Kwong PD, Hendrickson WA, Wyatt R, Sodroski J, Doyle ML. 2000. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(16):9026-9031.



- Naif HM, Cunningham AL, Alali M, Li S, Nasr N, Buhler MM, Schols D, de Clercq E, Stewart G. 2002. A human immunodeficiency virus type 1 isolate from an infected person homozygous for CCR5Delta32 exhibits dual tropism by infecting macrophages and MT2 cells via CXCR4. *J Virol* 76(7):3114-3124.
- Nishimura Y, Brown CR, Mattapallil JJ, Igarashi T, Buckler-White A, Lafont BA, Hirsch VM, Roederer M, Martin MA. 2005. Resting naive CD4+ T cells are massively infected and eliminated by X4-tropic simian-human immunodeficiency viruses in macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(22):8000-8005.
- Oppermann M. 2004. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cellular signalling* 16(11):1201-1210.
- Pantophlet R, Burton DR. 2006. GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annual review of immunology* 24:739-769.
- Pastore C, Nedellec R, Ramos A, Pontow S, Ratner L, Mosier DE. 2006. Human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching: V1/V2 gain-of-fitness mutations compensate for V3 loss-of-fitness mutations. *J Virol* 80(2):750-758.
- Pastore C, Picchio GR, Galimi F, Fish R, Hartley O, Offord RE, Mosier DE. 2003. Two mechanisms for human immunodeficiency virus type 1 inhibition by N-terminal modifications of RANTES. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47(2):509-517.
- Patterson BK, Landay A, Andersson J, Brown C, Behbahani H, Jiyamapa D, Burki Z, Stanislawski D, Czerniewski MA, Garcia P. 1998. Repertoire of chemokine receptor expression in the female genital tract: implications for human immunodeficiency virus transmission. *The American journal of pathology* 153(2):481-490.
- Pauza CD, Price TM. 1988. Human immunodeficiency virus infection of T cells and monocytes proceeds via receptor-mediated endocytosis. *The Journal of cell biology* 107(3):959-968.
- Peng G, Greenwell-Wild T, Nares S, Jin W, Lei KJ, Rangel ZG, Munson PJ, Wahl SM. 2007. Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. *Blood* 110(1):393-400.
- Penn ML, Grivel JC, Schramm B, Goldsmith MA, Margolis L. 1999. CXCR4 utilization is sufficient to trigger CD4+ T cell depletion in HIV-1-infected human lymphoid tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(2):663-668.
- Percherancier Y, Lagane B, Planchenault T, Staropoli I, Altmeyer R, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Hoessli DC, Bachelier F. 2003. HIV-1 entry into T-cells is not dependent on CD4 and CCR5 localization to sphingolipid-enriched, detergent-resistant, raft membrane domains. *J Biol Chem* 278(5):3153-3161.
- Perfettini JL, Castedo M, Roumier T, Andreau K, Nardacci R, Piacentini M, Kroemer G. 2005. Mechanisms of apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *Cell death and differentiation* 12 Suppl 1:916-923.
- Perfettini JL, Roumier T, Castedo M, Laroche N, Boya P, Raynal B, Lazar V, Ciccocanti F, Nardacci R, Penninger J, Piacentini M, Kroemer G. 2004. NF-kappaB and p53 are the dominant apoptosis-inducing transcription factors elicited by the HIV-1 envelope. *The Journal of experimental medicine* 199(5):629-640.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews* 3(9):639-650.
- Ping LH, Nelson JA, Hoffman IF, Schock J, Lamers SL, Goodman M, Vernazza P, Kazembe P, Maida M, Zimba D, Goodenow MM, Eron JJ, Jr., Fiscus SA, Cohen MS, Swanstrom R. 1999. Characterization of V3 sequence heterogeneity in subtype C

- human immunodeficiency virus type 1 isolates from Malawi: underrepresentation of X4 variants. *J Virol* 73(8):6271-6281.
- Pion M, Granelli-Piperno A, Mangeat B, Stalder R, Correa R, Steinman RM, Piguet V. 2006. APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *The Journal of experimental medicine* 203(13):2887-2893.
- Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, Damond F, Robertson DL, Simon F. 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine* 15(8):871-872.
- Pollakis G, Kang S, Kliphuis A, Chalaby MI, Goudsmit J, Paxton WA. 2001. N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J Biol Chem* 276(16):13433-13441.
- Pope M, Haase AT. 2003. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nature medicine* 9(7):847-852.
- Popik W, Alce TM. 2004. CD4 receptor localized to non-raft membrane microdomains supports HIV-1 entry. Identification of a novel raft localization marker in CD4. *J Biol Chem* 279(1):704-712.
- Popik W, Alce TM, Au WC. 2002. Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol* 76(10):4709-4722.
- Popik W, Pitha PM. 1998. Early activation of mitogen-activated protein kinase kinase, extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and c-Jun N-terminal kinase in response to binding of simian immunodeficiency virus to Jurkat T cells expressing CCR5 receptor. *Virology* 252(1):210-217.
- Poveda E, Briz V, de Mendoza C, Benito JM, Corral A, Zahonero N, Lozano S, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V. 2007a. Prevalence of X4 tropic HIV-1 variants in patients with differences in disease stage and exposure to antiretroviral therapy. *Journal of medical virology* 79(8):1040-1046.
- Poveda E, Briz V, Roulet V, Del Mar Gonzalez M, Faudon JL, Skrabal K, Soriano V. 2007b. Correlation between a phenotypic assay and three bioinformatic tools for determining HIV co-receptor use. *AIDS (London, England)* 21(11):1487-1490.
- Prahalad S. 2006. Negative association between the chemokine receptor CCR5-Delta32 polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Genes and immunity* 7(3):264-268.
- Pratt RD, Shapiro JF, McKinney N, Kwok S, Spector SA. 1995. Virologic characterization of primary human immunodeficiency virus type 1 infection in a health care worker following needlestick injury. *The Journal of infectious diseases* 172(3):851-854.
- Pugach P, Marozsan AJ, Ketas TJ, Landes EL, Moore JP, Kuhmann SE. 2007. HIV-1 clones resistant to a small molecule CCR5 inhibitor use the inhibitor-bound form of CCR5 for entry. *Virology* 361(1):212-228.
- Quillent C, Oberlin E, Braun J, Rousset D, Gonzalez-Canali G, Metais P, Montagnier L, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Beretta A. 1998. HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene. *Lancet* 351(9095):14-18.
- Recordon-Pinson P, Soulie C, Flandre P, Descamps D, Lazrek M, Charpentier C, Montes B, Trabaud MA, Cottalorda J, Schneider V, Morand-Joubert L, Tamalet C, Desbois D, Mace M, Ferre V, Vabret A, Ruffault A, Pallier C, Raymond S, Izopet J, Reynes J, Marcelin AG, Masquelier B. 2010. Evaluation of the genotypic prediction of HIV-1 coreceptor use versus a phenotypic assay and correlation with the virological response to maraviroc: the ANRS GenoTropism study. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54(8):3335-3340.

- Renjifo B, Gilbert P, Chaplin B, Msamanga G, Mwakagile D, Fawzi W, Essex M. 2004. Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D. *AIDS (London, England)* 18(12):1629-1636.
- Resch W, Hoffman N, Swanstrom R. 2001. Improved success of phenotype prediction of the human immunodeficiency virus type 1 from envelope variable loop 3 sequence using neural networks. *Virology* 288(1):51-62.
- Reynes J, Portales P, Segondy M, Baillat V, Andre P, Reant B, Avinens O, Couderc G, Benkirane M, Clot J, Eliaou JF, Corbeau P. 2000. CD4+ T cell surface CCR5 density as a determining factor of virus load in persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of infectious diseases* 181(3):927-932.
- Ribeiro RM, Hazenberg MD, Perelson AS, Davenport MP. 2006. Naive and memory cell turnover as drivers of CCR5-to-CXCR4 tropism switch in human immunodeficiency virus type 1: implications for therapy. *J Virol* 80(2):802-809.
- Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, Martin A, Nieto M, Sanchez-Madrid F, Proudfoot AE, Wells TN, Martinez AC, Mellado M. 1999. Similarities and differences in RANTES- and (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis. *The Journal of cell biology* 144(4):755-765.
- Roggero R, Robert-Hebmann V, Harrington S, Roland J, Vergne L, Jaleco S, Devaux C, Biard-Piechaczyk M. 2001. Binding of human immunodeficiency virus type 1 gp120 to CXCR4 induces mitochondrial transmembrane depolarization and cytochrome c-mediated apoptosis independently of Fas signaling. *Journal of virology* 75(16):7637-7650.
- Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401(6754):708-712.
- Salvatori F, Scarlatti G. 2001. HIV type 1 chemokine receptor usage in mother-to-child transmission. *AIDS research and human retroviruses* 17(10):925-935.
- Scarlatti G, Hodara V, Rossi P, Muggiasca L, Buccheri A, Albert J, Fenyo EM. 1993. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) from mother to child correlates with viral phenotype. *Virology* 197(2):624-629.
- Schmitt N, Chene L, Boutolleau D, Nugeyre MT, Guillemard E, Versmisse P, Jacquemot C, Barre-Sinoussi F, Israel N. 2003. Positive regulation of CXCR4 expression and signaling by interleukin-7 in CD4+ mature thymocytes correlates with their capacity to favor human immunodeficiency X4 virus replication. *J Virol* 77(10):5784-5793.
- Schols D, Struyf S, Van Damme J, Este JA, Henson G, De Clercq E. 1997. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *The Journal of experimental medicine* 186(8):1383-1388.
- Schols D, CS, De Clercq E., et al. 2002. AMD-3100, a CXCR4 antagonist, reduced HIV viral load and X4 viral levels in humans. 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Seattle, WA.
- Schols D, CS, Hatse S., et al. 2003. Anti-HIV activity profile of AMD070, an orally bioavailable CXCR4 antagonist. 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, MA.
- Schroder C, Pierson RN, 3rd, Nguyen BN, Kawka DW, Peterson LB, Wu G, Zhang T, Springer MS, Siciliano SJ, Iliff S, Ayala JM, Lu M, Mudgett JS, Lyons K, Mills SG, Miller GG, Singer, II, Azimzadeh AM, DeMartino JA. 2007. CCR5 blockade modulates inflammation and alloimmunity in primates. *J Immunol* 179(4):2289-2299.
- Schuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, van Steenwijk RP, Lange JM, Schattenkerk JK, Miedema F, Tersmette M. 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection:

- progression of disease is associated with a shift from monocyto-tropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 66(3):1354-1360.
- Seclen E, Del Mar Gonzalez M, De Mendoza C, Soriano V, Poveda E. 2010. Dynamics of HIV tropism under suppressive antiretroviral therapy: implications for tropism testing in subjects with undetectable viraemia. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 65(7):1493-1496.
- Shaheen F, Collman RG. 2004. Co-receptor antagonists as HIV-1 entry inhibitors. *Current opinion in infectious diseases* 17(1):7-16.
- Shankarappa R, Margolick JB, Gange SJ, Rodrigo AG, Upchurch D, Farzadegan H, Gupta P, Rinaldo CR, Learn GH, He X, Huang XL, Mullins JI. 1999. Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 73(12):10489-10502.
- Shapiro L, Heidenreich KA, Meintzer MK, Dinarello CA. 1998. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in HIV type 1 production in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(13):7422-7426.
- Shepherd JC, Jacobson LP, Qiao W, Jamieson BD, Phair JP, Piazza P, Quinn TC, Margolick JB. 2008. Emergence and Persistence of CXCR4-Tropic HIV-1 in a Population of Men from the Multicenter AIDS Cohort Study. *The Journal of infectious diseases* 198(8):1104-1112.
- Sheppard HW, Celum C, Michael NL, O'Brien S, Dean M, Carrington M, Dondero D, Buchbinder SP. 2002. HIV-1 infection in individuals with the CCR5-Delta32/Delta32 genotype: acquisition of syncytium-inducing virus at seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr* 29(3):307-313.
- Simmons G, Clapham PR, Picard L, Offord RE, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Buser R, Wells TN, Proudfoot AE. 1997. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* 276(5310):276-279.
- Simon B, Grabmeier-Pfistershammer K, Rieger A, Sarcletti M, Schmied B, Puchhammer-Stockl E. 2010. HIV coreceptor tropism in antiretroviral treatment-naive patients newly diagnosed at a late stage of HIV infection. *AIDS (London, England)* 24(13):2051-2058.
- Sing T, Low AJ, Beerenwinkel N, Sander O, Cheung PK, Domingues FS, Buch J, Daumer M, Kaiser R, Lengauer T, Harrigan PR. 2007. Predicting HIV coreceptor usage on the basis of genetic and clinical covariates. *Antiviral therapy* 12(7):1097-1106.
- Sirois S, Sing T, Chou KC. 2005. HIV-1 gp120 V3 loop for structure-based drug design. *Current protein & peptide science* 6(5):413-422.
- Skrabal K, Low AJ, Dong W, Sing T, Cheung PK, Mammano F, Harrigan PR. 2007. Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting: degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model. *J Clin Microbiol* 45(2):279-284.
- Sloane AJ, Raso V, Dimitrov DS, Xiao X, Deo S, Muljadi N, Restuccia D, Turville S, Kearney C, Broder CC, Zoellner H, Cunningham AL, Bendall L, Lynch GW. 2005. Marked structural and functional heterogeneity in CXCR4: separation of HIV-1 and SDF-1alpha responses. *Immunology and cell biology* 83(2):129-143.
- Somma F, Tuosto L, Gilardini Montani MS, Di Somma MM, Cundari E, Piccolella E. 2000. Engagement of CD4 before TCR triggering regulates both Bax- and Fas (CD95)-mediated apoptosis. *J Immunol* 164(10):5078-5087.
- Soulie C, Malet I, Lambert-Niclot S, Tubiana R, Thevenin M, Simon A, Murphy R, Katlama C, Calvez V, Marcelin AG. 2008. Primary genotypic resistance of HIV-1 to CCR5 antagonists in CCR5 antagonist treatment-naive patients. *AIDS (London, England)* 22(16):2212-2214.

- Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, Grossman Z, Victorino RM. 2002. CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol* 169(6):3400-3406.
- Spijkerman IJ, Koot M, Prins M, Keet IP, van den Hoek AJ, Miedema F, Coutinho RA. 1995. Lower prevalence and incidence of HIV-1 syncytium-inducing phenotype among injecting drug users compared with homosexual men. *AIDS (London, England)* 9(9):1085-1092.
- Steen A, Schwartz TW, Rosenkilde MM. 2010. Targeting CXCR4 in HIV Cell-Entry Inhibition. *Mini reviews in medicinal chemistry*.
- Strizki JM, Tremblay C, Xu S, Wojcik L, Wagner N, Gonsiorek W, Hipkin RW, Chou CC, Pugliese-Sivo C, Xiao Y, Tagat JR, Cox K, Priestley T, Sorota S, Huang W, Hirsch M, Reyes GR, Baroudy BM. 2005. Discovery and characterization of vicriviroc (SCH 417690), a CCR5 antagonist with potent activity against human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49(12):4911-4919.
- Swenson L. DW, Mo T., Woods C., Thielen A., Jensen M., Glascock C., Montaner J. and Harrigan R. 2009. Quantification of HIV Tropism by "Deep " Sequencing Shows a Broad Distribution of Prevalence of X4 variants in Clinical Samples that Is Associated with Virological Outcome. 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Montréal, Canada.
- Swenson LC, Moores A, Low AJ, Thielen A, Dong W, Woods C, Jensen MA, Wynhoven B, Chan D, Glascock C, Harrigan PR. 2010. Improved detection of CXCR4-using HIV by V3 genotyping: application of population-based and "deep" sequencing to plasma RNA and proviral DNA. *J Acquir Immune Defic Syndr* 54(5):506-510.
- Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. 1998. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393(6685):591-594.
- Tardif MR, Tremblay MJ. 2005. LFA-1 is a key determinant for preferential infection of memory CD4+ T cells by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 79(21):13714-13724.
- Taylor BS, Hammer SM. 2008. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *The New England journal of medicine* 359(18):1965-1966.
- Taylor JR, Jr., Kimbrell KC, Scoggins R, Delaney M, Wu L, Camerini D. 2001. Expression and function of chemokine receptors on human thymocytes: implications for infection by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 75(18):8752-8760.
- Telenti A. 2009. Safety concerns about CCR5 as an antiviral target. *Current opinion in HIV and AIDS* 4(2):131-135.
- Theodorou I, Meyer L, Magierowska M, Katlama C, Rouzioux C. 1997. HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR5 delta 32. Seroco Study Group. *Lancet* 349(9060):1219-1220.
- Townson JR, Graham GJ, Landau NR, Rasala B, Nibbs RJ. 2000. Aminooxypentane addition to the chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha P increases receptor affinities and HIV inhibition. *J Biol Chem* 275(50):39254-39261.
- Trinh L HD, Huang W, Wrin T, Larson J, Kiss L, Coakley E, Petropoulos CJ, Parkin N, Whitcomb JM and Reeves JD. 2008. Validation of an enhanced sensitivity Trofile™ HIV-1 co-receptor tropism assay for selecting patients for therapy with entry inhibitors targeting CCR5. . Ninth International Congress on Drug Therapy in HIV Infection. Glasgow, UK.

- Trkola A, Dragic T, Arthos J, Binley JM, Olson WC, Allaway GP, Cheng-Mayer C, Robinson J, Maddon PJ, Moore JP. 1996. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 384(6605):184-187.
- Trouplin V, Salvatori F, Cappello F, Obry V, Brelot A, Heveker N, Alizon M, Scarlatti G, Clavel F, Mammano F. 2001. Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using a recombinant phenotypic assay. *J Virol* 75(1):251-259.
- Trushin SA, Algeciras-Schimmich A, Vlahakis SR, Bren GD, Warren S, Schnepfle DJ, Badley AD. 2007. Glycoprotein 120 binding to CXCR4 causes p38-dependent primary T cell death that is facilitated by, but does not require cell-associated CD4. *J Immunol* 178(8):4846-4853.
- Tsibris AM, Korber B, Arnaout R, Russ C, Lo CC, Leitner T, Gaschen B, Theiler J, Paredes R, Su Z, Hughes MD, Gulick RM, Greaves W, Coakley E, Flexner C, Nusbaum C, Kuritzkes DR. 2009. Quantitative deep sequencing reveals dynamic HIV-1 escape and large population shifts during CCR5 antagonist therapy in vivo. *PloS one* 4(5):e5683.
- Tuosto L, Marinari B, Piccolella E. 2002. CD4-Lck through TCR and in the absence of Vav exchange factor induces Bax increase and mitochondrial damage. *J Immunol* 168(12):6106-6112.
- Valentin A, Rosati M, Patenaude DJ, Hatzakis A, Kostrikis LG, Lazanas M, Wyvill KM, Yarchoan R, Pavlakis GN. 2002. Persistent HIV-1 infection of natural killer cells in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(10):7015-7020.
- van't Wout AB, Kootstra NA, Mulder-Kampinga GA, Albrecht-van Lent N, Scherpbier HJ, Veenstra J, Boer K, Coutinho RA, Miedema F, Schuitemaker H. 1994. Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *The Journal of clinical investigation* 94(5):2060-2067.
- Van Baelen K, Vandenbroucke I, Rondelez E, Van Eygen V, Vermeiren H, Stuyver LJ. 2007. HIV-1 coreceptor usage determination in clinical isolates using clonal and population-based genotypic and phenotypic assays. *Journal of virological methods* 146(1-2):61-73.
- Veazey RS, Klasse PJ, Ketas TJ, Reeves JD, Piatak M, Jr., Kunstman K, Kuhmann SE, Marx PA, Lifson JD, Dufour J, Mefford M, Pandrea I, Wolinsky SM, Doms RW, DeMartino JA, Siciliano SJ, Lyons K, Springer MS, Moore JP. 2003. Use of a small molecule CCR5 inhibitor in macaques to treat simian immunodeficiency virus infection or prevent simian-human immunodeficiency virus infection. *The Journal of experimental medicine* 198(10):1551-1562.
- Veazey RS, Springer MS, Marx PA, Dufour J, Klasse PJ, Moore JP. 2005. Protection of macaques from vaginal SHIV challenge by an orally delivered CCR5 inhibitor. *Nature medicine* 11(12):1293-1294.
- Vergne L, Bourgeois A, Mpoudi-Ngole E, Mougnotou R, Mbuagbaw J, Liegeois F, Laurent C, Butel C, Zekeng L, Delaporte E, Peeters M. 2003. Biological and genetic characteristics of HIV infections in Cameroon reveals dual group M and O infections and a correlation between SI-inducing phenotype of the predominant CRF02\_AG variant and disease stage. *Virology* 310(2):254-266.
- Verhofstede C, Vandekerckhove L, Eygen VV, Demecheleer E, Vandenbroucke I, Winters B, Plum J, Vogelaers D, Stuyver L. 2009. CXCR4-using HIV type 1 variants are more commonly found in peripheral blood mononuclear cell DNA than in plasma RNA. *J Acquir Immune Defic Syndr* 50(2):126-136.

- Viard M, Parolini I, Sargiacomo M, Fecchi K, Ramoni C, Ablan S, Ruscetti FW, Wang JM, Blumenthal R. 2002. Role of cholesterol in human immunodeficiency virus type 1 envelope protein-mediated fusion with host cells. *J Virol* 76(22):11584-11595.
- Vila-Coro AJ, Mellado M, Martin de Ana A, Martinez AC, Rodriguez-Frade JM. 1999. Characterization of RANTES- and aminooxypentane-RANTES-triggered desensitization signals reveals differences in recruitment of the G protein-coupled receptor complex. *J Immunol* 163(6):3037-3044.
- Wang JH, Meijers R, Xiong Y, Liu JH, Sakihama T, Zhang R, Joachimiak A, Reinherz EL. 2001. Crystal structure of the human CD4 N-terminal two-domain fragment complexed to a class II MHC molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(19):10799-10804.
- Waters L, Mandalia S, Randell P, Wildfire A, Gazzard B, Moyle G. 2008. The impact of HIV tropism on decreases in CD4 cell count, clinical progression, and subsequent response to a first antiretroviral therapy regimen. *Clin Infect Dis* 46(10):1617-1623.
- Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, Frankenberger M, Weber KS, Ziegler-Heitbrock HW. 2000. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *Journal of leukocyte biology* 67(5):699-704.
- Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM. 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422(6929):307-312.
- Weiser B, Philpott S, Klimkait T, Burger H, Kitchen C, Burgisser P, Gorgievski M, Perrin L, Piffaretti JC, Ledergerber B. 2008. HIV-1 coreceptor usage and CXCR4-specific viral load predict clinical disease progression during combination antiretroviral therapy. *AIDS (London, England)* 22(4):469-479.
- Weissman D, Rabin RL, Arthos J, Rubbert A, Dybul M, Swofford R, Venkatesan S, Farber JM, Fauci AS. 1997. Macrophage-tropic HIV and SIV envelope proteins induce a signal through the CCR5 chemokine receptor. *Nature* 389(6654):981-985.
- Westby M, Lewis M, Whitcomb J, Youle M, Pozniak AL, James IT, Jenkins TM, Perros M, van der Ryst E. 2006. Emergence of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4-using virus reservoir. *J Virol* 80(10):4909-4920.
- Westby M, Smith-Burchnell C, Mori J, Lewis M, Mosley M, Stockdale M, Dorr P, Ciaramella G, Perros M. 2007. Reduced maximal inhibition in phenotypic susceptibility assays indicates that viral strains resistant to the CCR5 antagonist maraviroc utilize inhibitor-bound receptor for entry. *J Virol* 81(5):2359-2371.
- Whitcomb JM, Huang W, Fransen S, Limoli K, Toma J, Wrin T, Chappey C, Kiss LD, Paxinos EE, Petropoulos CJ. 2007. Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51(2):566-575.
- Wilkin TJ, Su Z, Krambrink A, Long J, Greaves W, Gross R, Hughes MD, Flexner C, Skolnik PR, Coakley E, Godfrey C, Hirsch M, Kuritzkes DR, Gulick RM. 2010. Three-year safety and efficacy of vicriviroc, a CCR5 antagonist, in HIV-1-infected treatment-experienced patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 54(5):470-476.
- Wilkin TJ, Su Z, Kuritzkes DR, Hughes M, Flexner C, Gross R, Coakley E, Greaves W, Godfrey C, Skolnik PR, Timpone J, Rodriguez B, Gulick RM. 2007. HIV type 1 chemokine coreceptor use among antiretroviral-experienced patients screened for a clinical trial of a CCR5 inhibitor: AIDS Clinical Trial Group A5211. *Clin Infect Dis* 44(4):591-595.

- Wu H, Kwong PD, Hendrickson WA. 1997. Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature* 387(6632):527-530.
- Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG. 1998. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 393(6686):705-711.
- Wyatt R, Moore J, Accola M, Desjardin E, Robinson J, Sodroski J. 1995. Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding. *J Virol* 69(9):5723-5733.
- Wyatt R, Sodroski J. 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280(5371):1884-1888.
- Xu Y, Kulkosky J, Acheampong E, Nunnari G, Sullivan J, Pomerantz RJ. 2004. HIV-1-mediated apoptosis of neuronal cells: Proximal molecular mechanisms of HIV-1-induced encephalopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(18):7070-7075.
- Yahi N, Baghdiguan S, Moreau H, Fantini J. 1992. Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells. *J Virol* 66(8):4848-4854.
- Yamaguchi Y, Gojobori T. 1997. Evolutionary mechanisms and population dynamics of the third variable envelope region of HIV within single hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(4):1264-1269.
- Yu XF, Wang Z, Vlahov D, Markham RB, Farzadegan H, Margolick JB. 1998. Infection with dual-tropic human immunodeficiency virus type 1 variants associated with rapid total T cell decline and disease progression in injection drug users. *The Journal of infectious diseases* 178(2):388-396.
- Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, Manischewitz J, Golding H. 1997. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nature medicine* 3(12):1369-1375.
- Zhong X, Lewis M, Dong W, Knapp D, Mo T, Swenson L, McGovern RA, Heera J, Harrigan PR. 2010. The influence of PCR amplification variation on the ability of population-based PCR to detect non-R5 HIV. 8th European HIV Drug Resistance Workshop. Sorrento, Italy.
- Zhou Y, Kurihara T, Ryseck RP, Yang Y, Ryan C, Loy J, Warr G, Bravo R. 1998. Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. *J Immunol* 160(8):4018-4025.
- Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393(6685):595-599.



## **ANNEXES**

## Evaluation of the Genotypic Prediction of HIV-1 Coreceptor Use versus a Phenotypic Assay and Correlation with the Virological Response to Maraviroc: the ANRS GenoTropism Study<sup>∇</sup>

Patricia Recordon-Pinson,<sup>1</sup> Cathia Soulié,<sup>2</sup> Philippe Flandre,<sup>2</sup> Diane Descamps,<sup>3</sup> Mouna Lazrek,<sup>4</sup> Charlotte Charpentier,<sup>5</sup> Brigitte Montes,<sup>6</sup> Mary-Anne Trabaud,<sup>7</sup> Jacqueline Cottalorda,<sup>8</sup> Véronique Schneider,<sup>9</sup> Laurence Morand-Joubert,<sup>10</sup> Catherine Tamalet,<sup>11</sup> Delphine Desbois,<sup>12</sup> Muriel Macé,<sup>13</sup> Virginie Ferré,<sup>14</sup> Astrid Vabret,<sup>15</sup> Annick Ruffault,<sup>16</sup> Coralie Pallier,<sup>17</sup> Stéphanie Raymond,<sup>18</sup> Jacques Izopet,<sup>18</sup> Jacques Reynes,<sup>19</sup> Anne-Geneviève Marcelin,<sup>2</sup> Bernard Masquelier,<sup>1\*</sup> and the ANRS AC11 Resistance Study Group

Laboratoire de Virologie, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France<sup>1</sup>; Laboratoire de Virologie, AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, UMPC Université Paris 06, INSERM U943, Paris, France<sup>2</sup>; Laboratoire de Virologie, AP-HP, Groupe Hospitalier Bichat-Claude Bernard, EA4409 Université Paris—Diderot, Paris 7, Paris, France<sup>3</sup>; Laboratoire de Virologie, CHU de Lille, Lille, France<sup>4</sup>; Laboratoire de Virologie, AP-HP, HEGP, Paris, France<sup>5</sup>; Laboratoire de Virologie, CHU de Montpellier, Montpellier, France<sup>6</sup>; Laboratoire de Virologie, Hospices Civils de Lyon, Hôpital de la Croix Rousse, Lyon, France<sup>7</sup>; Laboratoire de Virologie, CHU de Nice, Nice, France<sup>8</sup>; Laboratoire de Virologie, AP-HP, Hôpital Tenon, Paris, France<sup>9</sup>; Laboratoire de Virologie, AP-HP, CHU Saint Antoine, Paris, France<sup>10</sup>; Laboratoire de Virologie, CHU de Marseille, Marseille, France<sup>11</sup>; Laboratoire de Virologie, CHU Paul Brousse, Paris, France<sup>12</sup>; Laboratoire de Virologie, CHU d'Orléans, Orléans, France<sup>13</sup>; Laboratoire de Virologie, CHU de Nantes, Nantes, France<sup>14</sup>; Laboratoire de Virologie, CHU de Caen, Caen, France<sup>15</sup>; Laboratoire de Virologie, CHU de Rennes, France<sup>16</sup>; Laboratoire de Virologie, CHU Kremlin-Bicêtre, Kremlin Bicêtre, France<sup>17</sup>; Laboratoire de Virologie, CHU de Toulouse, Toulouse, France<sup>18</sup>; and Service de Maladies Infectieuses, CHU de Montpellier, Montpellier, France<sup>19</sup>

Received 2 February 2010/Returned for modification 11 March 2010/Accepted 27 May 2010

**Genotypic algorithms for prediction of HIV-1 coreceptor usage need to be evaluated in a clinical setting. We aimed at studying (i) the correlation of genotypic prediction of coreceptor use in comparison with a phenotypic assay and (ii) the relationship between genotypic prediction of coreceptor use at baseline and the virological response (VR) to a therapy including maraviroc (MVC). Antiretroviral-experienced patients were included in the MVC Expanded Access Program if they had an R5 screening result with Trofile (Monogram Biosciences). V3 loop sequences were determined at screening, and coreceptor use was predicted using 13 genotypic algorithms or combinations of algorithms. Genotypic predictions were compared to Trofile; dual or mixed (D/M) variants were considered as X4 variants. Both genotypic and phenotypic results were obtained for 189 patients at screening, with 54 isolates scored as X4 or D/M and 135 scored as R5 with Trofile. The highest sensitivity (59.3%) for detection of X4 was obtained with the Geno2pheno algorithm, with a false-positive rate set up at 10% (Geno2pheno10). In the 112 patients receiving MVC, a plasma viral RNA load of <50 copies/ml was obtained in 68% of cases at month 6. In multivariate analysis, the prediction of the X4 genotype at baseline with the Geno2pheno10 algorithm including baseline viral load and CD4 nadir was independently associated with a worse VR at months 1 and 3. The baseline weighted genotypic sensitivity score was associated with VR at month 6. There were strong arguments in favor of using genotypic coreceptor use assays for determining which patients would respond to CCR5 antagonist.**

During the entry process of HIV-1 in the target cell, the interaction of the viral surface glycoprotein gp120 with a cellular chemokine receptor, the coreceptor, is an essential step, besides attachment to the CD4 receptor, and precedes the fusion of the viral envelope to the cell membrane. The V3 hypervariable loop of gp120 is involved in coreceptor binding. Two coreceptors are most commonly used *in vivo*: CCR5 and CXCR4 (1). Viral coreceptor use (i.e., usage of either CCR5 or CXCR4) differs between viral isolates. If CCR5-using iso-

lates (R5 isolates) are by far predominant at the early stage of early infection and seem to be selected during HIV-1 transmission, CXCR4 usage (X4 tropism) will become more prevalent as the infection progresses, with approximately half of X4 or dual or mixed (D/M) tropism in antiretroviral-experienced patients with advanced HIV-1 disease (10).

Maraviroc (MVC), a CCR5 inhibitor, binds specifically to CCR5 and blocks HIV-1 binding to this coreceptor (5). MVC has shown a potent antiviral effect in antiretroviral-experienced patients with R5 HIV-1 infection in a placebo-controlled trial (7) and is currently prescribed in this indication. As MVC has shown little activity in patients with X4 viruses, the determination of HIV-1 coreceptor use has become mandatory before the prescription of CCR5 inhibitors (8).

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Virologie, Hôpital Pellegrin, Place Amélie Raba Léon, 33076 Bordeaux Cedex, France. Phone: 33556795510. Fax: 335556795673. E-mail: bernard.masquelier@chu-bordeaux.fr.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 7 June 2010.

Two different methods can be used for determining HIV-1 coreceptor use. Phenotypic assays (4, 11, 17, 18) are based on recombinant virus assays or replication-defective pseudoviruses. They have been widely used but are expensive and time-consuming and require specialized facilities and personnel. Several bioinformatic tools have been proposed to predict coreceptor usage by interpretation of genotypic data—mainly through the use of V3 loop sequencing (9). It is now of importance to evaluate the performance of these genotypic algorithms, for predicting both HIV-1 coreceptor use and virological response (VR) to CCR5 inhibitors. We present here the results of the GenoTropism Study, a multicentric, prospective study aimed at evaluating the genotypic prediction of HIV coreceptor use versus a phenotypic assay and establishing correlations between genotypic tools and the virological response to MVC.

### MATERIALS AND METHODS

**Study population.** The patients included in this study were screened for the Maraviroc Expanded Access Program (MVC EAP) in France between January, 2007 and August 2008 and received MVC associated with an optimized background therapy if the result of the phenotypic assay for coreceptor use determination was CCR5, using a previously validated assay (Trofile; Monogram Biosciences) (18). For the last group of patients included, a modified version with an optimized sensitivity of the assay was performed (16). All screened patients were included in the genotype-phenotype comparison, whereas only patients treated with MVC were included in the study correlating VR to the genotypic results.

Inclusion criteria for the MVC EAP were HIV-1 infection,  $\geq 18$  years of age, previous antiretroviral therapy, and virological failure with a plasma HIV-1 RNA load of  $>1,000$  copies/ml. The patients were included in the GenoTropism Study in 18 participating centers in France. Sociodemographic data, clinical data, and treatment histories were collected for all enrolled patients at the screening date. MVC-treated patients were followed up at baseline (month 0 [M0]) and at months 1, 3, and 6 (M1, M3, and M6, respectively) on MVC-containing regimens. The patients had signed the MVC EAP informed consent form and were specifically informed about their participation in the GenoTropism Study. The study was approved by the Comité Consultatif de Traitement de l'Information dans la Recherche Scientifique et Médicale and the Commission Nationale Informatique et Libertés.

**Virological methods. (i) gp120 sequence analysis and genotypic prediction of coreceptor use.** The gp120 sequence analysis comprising the complete V3 loop sequence was performed from plasma sampled at the date of screening of the MVC EAP, when a sample was also sent for the Trofile assay. PCR primers and conditions and sequencing primers are described in the ANRS (Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales, Paris, France) consensus techniques (<http://www.hivfrenchresistance.org>). The bulk V3 sequences were determined by all participant laboratories. Sequences in the FASTA format including possibilities of mixed populations were sent to a central laboratory, where all possible combinations of V3 amino acid sequences present as a result of nucleotide mixtures were considered.

The V3 sequences were then interpreted using 13 different bioinformatics predictors of coreceptor use. The bioinformatic tools C4.5, C4.5 with p8-p12, PART, SVM, and Charge Rule are available at <http://genomic2.ucsd.edu:8080/wetcat/v3.html>; PSM<sub>R5X4</sub> and PSM<sub>SINSI</sub> are available at <http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/pssm>. Geno2pheno is available at <http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>. For PSM, the coreceptor use prediction was based on subtype B. For the Geno2pheno website, the false-positive rates (FPRs) for prediction of X4 variants were 5% or 10%. The Geno2pheno interpretation was made with the "clonal" data set (only using bulk sequence analysis) with FPRs of 5% (Geno2pheno5) and 10% (Geno2pheno10) and with the "clinical" data set with an FPR of 10% (Geno2pheno10Clin). In the latter case, the CD4 nadir value, when available, and the viral load at screening were also taken into account.

Finally, three combinations of algorithms were also tested, by scoring X4 when the prediction was X4 with any algorithm: PSM<sub>R5X4</sub> with a Geno2pheno FPR of 5% or 10% or all available online algorithms. In all cases, HIV-1 isolates were classified as R5- or X4-tropic, with the latter including pure X4 and mixed R5 and/or X4 isolates on the basis of the analysis of multiple genotypic populations.

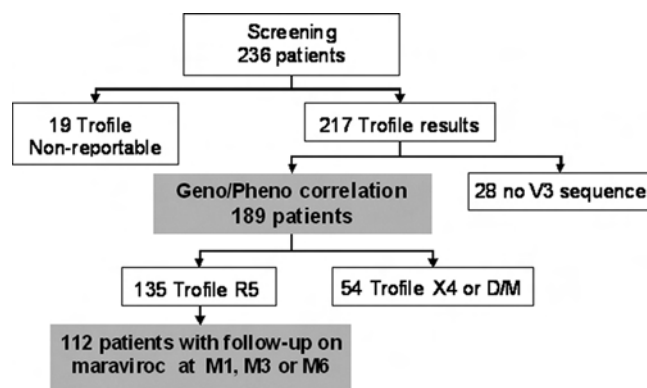


FIG. 1. Study design.

**(ii) Genotypic resistance analysis and GSS.** Sequences of the protease and reverse transcriptase (RT) genes were determined at baseline MVC in each laboratory using the ANRS consensus technique, (<http://www.hivfrenchresistance.org>), the Siemens TruGene kit, and the Abbott ViroSeq kit or an in-house method. The genotypic resistance analysis was interpreted using the ANRS algorithm, as updated in July 2008 (<http://www.hivfrenchresistance.org>). The weighted genotypic sensitivity score (wGSS) was calculated as previously reported (C. Boucher, J. M. Schapiro, D. R. Kuritzkes, J. M. Llibre, M. Lewis, P. Simpson, C. Delogne, V. Sharma, A. Parliyan, D. Chapman, M. Perros, H. Valdez, and M. Westby, presented at the XVIII International HIV Drug Resistance workshop, Fort Myers, FL, 2009). Briefly, one nucleoside RT inhibitor was scored as 0.5 when the virus was sensitive and 0 when the virus was possibly resistant or resistant. A nonnucleoside RT inhibitor, a fusion inhibitor (enfuvirtide), or an integrase inhibitor (raltegravir) was scored as 1 when the virus was sensitive and 0 when the virus was resistant or possibly resistant. A boosted protease inhibitor was scored as 1 when the virus was sensitive, 0.5 when the virus was possibly resistant, and 0 when the virus was resistant. The wGSS was the sum of the scores obtained for the drugs coprescribed with MVC.

**(iii) HIV-1 subtype analysis.** HIV-1 subtype was determined by phylogenetic analysis of RT and gp120 sequences. The nucleotide sequences were aligned by ClustalW1.74 with known reference strains of groups M, N, and O ([http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/SUBTYPE\\_REF/align.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/SUBTYPE_REF/align.html)). Phylogenetic trees were inferred using the neighbor-joining method and two Kimura parameters with 1,000 bootstrap values.

**(iv) Statistical analyses.** The first part of the study was performed to correlate HIV-1 coreceptor use results between the Trofile assay and different genotypic algorithms, while the second part was performed to determine the factors associated with VR to MVC in patients receiving an MVC-containing regimen on the basis of the Trofile assay. The sensitivity and specificity for predicting CXCR4 were computed for patients included in the first part of our study.

Three virologic responses were defined at three distinct time points. VR was defined as a reduction of at least 1 log<sub>10</sub> copy/ml and/or an HIV RNA level of  $<50$  copies/ml at month 1 (M1), a reduction of at least 1.5 log<sub>10</sub> copies/ml and/or an HIV-RNA level of  $<50$  copies/ml at M2, and an HIV RNA level of  $<50$  copies/ml at M6. The impact of baseline HIV RNA, baseline CD4 cell count, nadir CD4 cell count, wGSS, and genotypic predictions of CXCR4 on the VR to MVC was investigated. A logistic regression model was performed to search for independent predictive factors associated with VR to MVC. A stepwise selection procedure was used to build final multivariate models.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The reverse transcriptase, protease, and gp120 sequences from the patients in this study were given GenBank accession no. HM035546 to HM035976.

### RESULTS

**Study population.** The study design is described in Fig. 1. During the screening period, 236 patients were screened for the MVC EAP, and corresponding plasma samples were sent for the Trofile assay. The Trofile results were nonreportable for 19 patients and were thus available for 217 patients. Within these 217 patients, 28 patients had no gp120 sequence deter-

TABLE 1. Patients' characteristics at screening and at baseline maraviroc

Characteristic <sup>a</sup>	Result at:	
	Screening (n = 189)	Baseline MVC (n = 112)
<b>General</b>		
Male (%)	78.1	77.5
Median age, yr (IQR)	45.3 (41.8–50.7)	45.7 (42.1–51.2)
Median CD4 cell count/ μl (IQR)	247 (110–396)	257 (123–394)
Median nadir CD4 cell count/μl (IQR)	75 (14–160)	99 (27–177)
Median plasma HIV-1 RNA log <sub>10</sub> copies/ml (IQR)	4.2 (3.5–4.8)	4.2 (3.4–4.9)
<b>Previous antiretroviral treatment</b>		
Median no. of NRTIs (IQR)	6 (5–7)	6 (5–7)
Median no. of NNRTs (IQR)	1 (1–2)	1 (1–2)
Median no. of PIs (IQR)	4 (3–6)	4 (3–6)
Enfuvirtide (%)	45.0	45.0
Raltegravir (%)	22.2	22.2
HIV-1 subtype B (%)	88.7	90.4
<b>Trofile result (%)</b>		
CCR5	71.4	100
CXCR4	2.7	0
D/M	25.9	0
<b>Coprescribed antiretroviral drugs (%)</b>		
Raltegravir	NA <sup>b</sup>	67.9
Darunavir	NA	53.6
Etravirine	NA	28.6
Enfuvirtide	NA	17.0
Median wGSS (IQR)	NA	1 (0.5–1)

<sup>a</sup> MVC, maraviroc; IQR, interquartile range; NRTIs, nucleoside RT inhibitors; NNRTIs, nonnucleoside RT inhibitors; PIs, protease inhibitors; D/M, dual/mixed; wGSS, weighed genotypic sensitivity score.

<sup>b</sup> NA, not applicable.

mination, because of nonavailability of plasma sample or failure of PCR amplification. Thus, 189 patients had both Trofile and gp120 sequence determination and were included in the study comparing genotypic and phenotypic determinations of coreceptor use. Within these 189 patients, 165 had the standard Trofile assay and 24 had the enhanced-sensitivity assay.

Within these 189 patients, 54 had a Trofile result of X4 or dual or mixed (D/M) and 135 were scored as R5 with Trofile and were treated with MVC. The correlation between VR and MVC and the baseline genotypic parameters was assessed in 112 patients with available follow-up. The patients' characteristics at screening and at baseline MVC appear in Table 1. The median CD4 cell count was 213 (interquartile range [IQR], 92 to 345) in patients with a Trofile result of X4 or D/M compared with 267 (IQR, 121 to 417) in patients with an R5 result (Wilcoxon test, *P* = 0.05). The median GSS was 1 (IQR, 0 to 1). The percentage of patients with GSS at 0 or 0.5 was 34%, while 44% of patients had a GSS of 1, and 22% of patients had

a GSS of 1.5. The nadir of the CD4 cell count was missing for 42 and 26 patients, respectively, among the 189 and 112 patients presented in Table 1.

**Correlation between phenotypic and genotypic predictions of coreceptor use.** The V3 loop sequence enabled the prediction of HIV-1 coreceptor use according to 14 genotypic algorithms or combinations of algorithms in 189 patients. The sensitivity and specificity of the prediction of X4 tropism in comparison with Trofile appear in Fig. 2 for the different algorithms. The highest sensitivity for individual algorithms was obtained with Geno2pheno at a 10% FPR using either the “clonal” or the “clinical” data set (both sensitivities of 59.3%). No increase in sensitivity was obtained when combining both Geno2pheno and PSSM algorithms. A high sensitivity (78.8%) was obtained with the global combination of all individual algorithms for the prediction of X4 viruses.

The specificity of the detection of X4 in comparison with Trofile was high (79.3% to 98.5%) for all individual algorithms or dual combinations of algorithms. A decrease of specificity (62.9%) was observed with the global combination of individual algorithms.

**Virological and immunological responses to MVC.** The VR to MVC was studied at M1, M3, and M6. The VR at M1 was obtained in 94/111 (85%) patients, the VR at M3 was obtained in 88/105 (84%) patients, and the VR at M6 was reached in 67/98 (68%) patients. At M6, the median decrease in plasma HIV-1

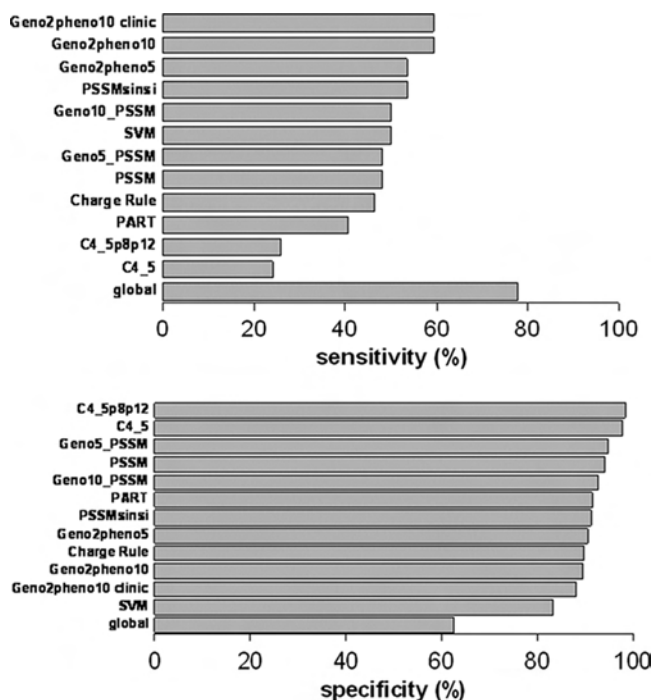


FIG. 2. Sensitivity and specificity of the detection of X4 or dual/mixed isolates according to 14 genotypic algorithms or combinations of algorithms compared to Trofile (n = 189 patients). Geno2pheno5 and Geno2pheno10, Geno2pheno algorithms with a false-positive rate set up at 10% or 5%, respectively; Geno2pheno10Clinic, Geno2pheno10 with “clinical” parameters (baseline HIV-1 RNA and nadir CD4<sup>+</sup> cell count); Geno5PSSM or Geno10PSSM, combinations of Geno2pheno and PSSM algorithms; global, combination of all individual algorithms for detection of X4 or dual/mixed isolates.



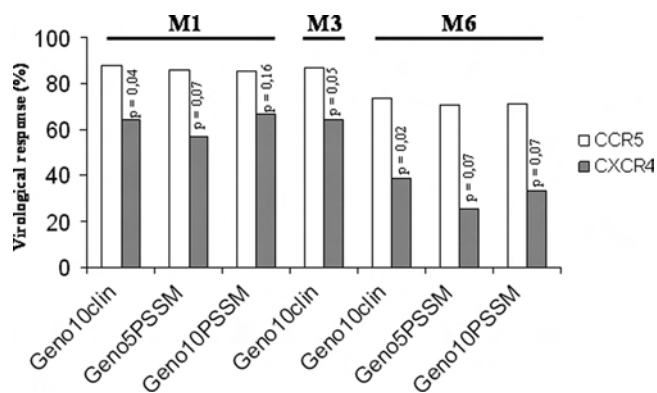


FIG. 3. Virological response to maraviroc-based regimens according to the baseline HIV-1 coreceptor use predicted by different genotypic algorithms (*n* = 112 patients). Geno10clin, Geno2pheno algorithm with false-positive rate set at 10% and with “clinical” parameters (baseline HIV-1 RNA and nadir CD4<sup>+</sup> cell count); Geno5PSSM or Geno10PSSM, combinations of Geno2pheno (with false-positive rates set at 5% or 10%) and PSSM algorithms; M1, M2, and M3, date (in months) of follow-up.

RNA was -2.34 log<sub>10</sub> copies/ml (IQR, -1.35 to -2.97) and the median increase in CD4<sup>+</sup> cells was 81 cells/μl (IQR, 25 to 180).

**Association between genotypic prediction of coreceptor use and virological response.** The association between the genotypic prediction of coreceptor use and the VR to MVC plus optimized background therapy (OBT) was studied at M1, M3, and M6, by using the different genotypic algorithms or combinations of algorithms. The percentage of prediction of X4 tropism in the 112 studied patients with an R5 result with the phenotypic assay comprised between 2% and 21%, according to the different interpretation systems. Significant associations between genotypic coreceptor use and VR (*P* < 0.05) or trends

(*P* < 0.2) are shown in Fig. 3. The percentage of VR was significantly higher in patients with baseline R5 according to the Geno2pheno10 algorithm with a clinical data set (Geno2pheno10Clin) at M1, M3, and M6. There was a trend toward association with VR for Geno2pheno5 plus PSSM<sub>R5X4</sub> (Geno2pheno5+PSSM) and Geno2pheno10 plus PSSM<sub>R5X4</sub> (Geno2pheno10+PSSM) at M1 and M6, respectively.

**Baseline V3 loop mutations and virological response to MVC.** The gp120 V3 loop amino acid substitutions were determined before treatment with MVC. Particular amino acid patterns, previously reported to be associated with phenotypic resistance to MVC and which had been shown to be polymorphic in MVC-naïve patients (15), were investigated. The prevalences of the different patterns were as follows: 11S plus 26V, 7.5%; 18G plus 22T, 1.0%; 19S plus 26V, 1.0%; 20F plus 25D plus 26V, 3.0%; 20F plus 21I, 0.5%; and 21T plus 28V, 0%. No significant association between the presence of these patterns at baseline and the subsequent VR to MVC-based regimens could be evidenced. We also searched for an association between all individual baseline V3 loop polymorphisms and VR; no significant association was found (data not shown).

**Multivariate analysis of the factors associated with VR to MVC.** In the univariate analysis (Table 2), the baseline coreceptor use prediction with Geno2pheno10Clin algorithm was at each time of follow-up was significantly associated with the VR to MVC. The nadir of CD4 cell count, the baseline of HIV RNA, wGSS (in which a wGSS of ≥1 was associated with a better VR), and the coreceptor use prediction with Geno2pheno5 plus PSSM were at some points of follow-up associated with the VR to MVC. As mentioned previously, information on the nadir of CD4 cell count is missing in 26 (23%) out of the 112 patients included in this analysis. We then built multivariate models with and without inclusion of the nadir variable in the stepwise selection procedure for each VR.

TABLE 2. Factors associated with the absence of virological response on maraviroc-containing regimens<sup>a</sup>

Time of VR and variables	Univariate analysis		Multivariate analysis <sup>b</sup>			
	OR (95% CI)	<i>P</i>	Without CD4 nadir		With CD4 nadir	
			OR (95% CI)	<i>P</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>
<b>M1</b>						
Geno2pheno10Clin	3.94 (1.06–13.55)	0.041	3.94 (1.06–13.55)	0.041		
Geno2pheno5+PSSM	1.57 (0.97–23.87)	0.07				
Geno2pheno10+PSSM	3.14 (0.61–13.45)	0.16				
Nadir CD4	2.20 (1.04–5.54)	0.039				
<b>M3</b>						
Geno2pheno10Clin	3.66 (0.99–12.61)	0.052	3.66 (0.99–12.61)	0.052		
Baseline VL	1.45 (0.90–2.33)	0.12				
<b>M6</b>						
Geno2pheno10Clin	4.31 (1.31–15.57)	0.017				
Baseline VL	0.58 (0.34–0.91)	0.016			0.43 (0.21–0.86)	0.017
wGSS	3.31 (1.37–8.20)	0.008	3.31 (1.37–8.20)	0.008	3.15 (1.01–9.89)	0.049
Nadir CD4	2.98 (1.53–6.62)	0.0007			2.31 (1.06–5.00)	0.035
Geno2pheno5+PSSM	7.07 (0.86–146)	0.069				
Geno2pheno10+PSSM	4.81 (0.89–36.2)	0.069				

<sup>a</sup> VR, virological response; OR, odds ratio; CI, confidence interval; M1, -3, and -6, number of months on MVC; Geno2pheno10Clin, baseline virus scored as X4 with the algorithm Geno2pheno with clinical parameters and with a false-positive rate (FPR) set at 10%; Geno2pheno5+PSSM and Geno2pheno10+PSSM, baseline virus scored as X4 either with the algorithm Geno2pheno with an FPR set at 5% or 10% or with the PSSM algorithm; Nadir CD4, nadir of CD4<sup>+</sup> cell count/μl; Baseline VL, baseline viral load; wGSS, weighed genotypic sensitivity score.

<sup>b</sup> Shown are results for the multivariate model without the CD4 cell count nadir and with the CD4 cell count nadir included in the stepwise selection procedure.

The multivariate logistic model without inclusion of the CD4 cell count nadir in the stepwise selection procedure retained only one variable for each distinct follow-up. Including the CD4 cell count nadir, no variables were retained in the association with VR at both month 1 and month 3. At month 6, a lower baseline HIV RNA, a wGSS of  $\geq 1$ , and a higher CD4 cell count nadir were independently associated with VR to MVC.

## DISCUSSION

In the setting of the treatment of HIV-1 infection by CCR5 inhibitors, the possibility to use accurate and clinically validated tests for prediction of HIV-1 coreceptor use has become a priority. In this multicenter prospective study, we could evaluate the performance of genotypic tools in comparison with a phenotypic assay for the determination of coreceptor usage. Furthermore, we could study the relationship between the baseline genotype-predicted coreceptor use and the VR to MVC in antiretroviral-experienced patients.

We compared the prediction of coreceptor use by 13 different genotypic algorithms or combinations of algorithms with the Trofile phenotypic assay considered as the reference. We could show important differences between algorithms in the sensitivity of detection of X4 isolates. The most sensitive bioinformatic tools were PSSM and Geno2pheno, with sensitivities at about 60%. We found no evidence of increased sensitivity by combining these two algorithms for the detection of X4. In contrast, the specificity of the predicted X4 tropism was high for most algorithms. Similar performances of genotypic prediction compared to the standard Trofile assay have been reported after analysis of the MOTIVATE-1 Study database (P. R. Harrigan, R. McGovern, W. Dong, L. Swenson, A. Thielen, M. Jensen, T. Mo, D. Chapman, M. Lewis, I. James, J. Heera, S. Ellery, and H. Valdez, presented at the 5th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, CapeTown, South Africa, 2009). However, in other studies comparing phenotypic and genotypic predictions of coreceptor use, higher sensitivities of genotypic algorithms could be found (3, 13). Several factors can explain this somewhat low sensitivity of bioinformatic tools for the detection of X4 in our study. First, in our patients the percentage of X4 or D/M isolates at screening was quite low (28.8%), and higher sensitivities could have been found with a less rare X4-D/M event. Second, the sequences generated for genotypic analysis and for the Trofile assay corresponded to different PCR assays, which could have created some discrepancy; our study was a prospective, multicentric study, certainly more likely to evaluate the use of genotypic tools in routine diagnosis than monocentric studies on selected samples. Third, a minority of patients (24/189) had a Trofile assay of the enhanced-sensitivity version, which could have resulted in a better sensitivity than genotypic tests for detecting X4 isolates. However, no higher sensitivities of genotypic tests were found when considering only patients who had the standard Trofile assay. Fourth, considering the median viral load, the input copy number was relatively high in this study. However, it could be a limitation for the representation of viral diversity in patients with low viral load. Additional studies including the use of the triplicate versus single PCR and sequence are warranted in this setting. Finally, further

development of bioinformatic tools, including the analysis of viral determinants of coreceptor use outside of the V3 loop, could improve their sensitivity in the future.

Another important result of our study is the association between genotypic prediction of coreceptor use and VR to MVC-based regimens. We could show that the Geno2pheno algorithm using "clinical" parameters (baseline viral load and nadir of CD4<sup>+</sup> cell count) in addition to the gp120 V3 loop sequence for predicting coreceptor use, could be predictive of the VR to MVC. The association between a better VR at months 1 and 3 on MVC and a predicted R5 coreceptor use was conserved in multivariate models which showed that a higher wGSS was also independently associated with a better VR at month 6. There was also a trend toward an association with VR for the combination of algorithms Geno2pheno and PSSM. The association between Geno2phenoClin and VR was not found in multivariate models, including the nadir CD4 count, probably because the nadir CD4 count was itself used for the prediction of coreceptor use with this algorithm. It was thus difficult to completely demonstrate the significance of prediction of VR by the coreceptor use prediction, because of the important predictivity of the nadir CD4 cell count and the overall good VR, due to MVC but also due to background therapy.

It is of importance that this clinical validation of the genotypic prediction of coreceptor use was assessed in a particular population of viruses which had first been screened as R5 by the Trofile assay. We thus showed that even in this biased population, genotypic tools can be associated with VR. In a larger, and more diverse viral population including patients screened as R5 but also found to be X4 or D/M by Trofile, Harrigan et al. (presented at the 5th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, CapeTown, South Africa, 2009) showed that genotypic tools (Geno2pheno and PSSM) could predict the VR to MVC-based regimens with an accuracy comparable to that of the Trofile assay. Both studies are thus in favor of the use of genotypic tools for coreceptor use determination in order to prescribe MVC in antiretroviral-experienced patients. Similar conclusions were also obtained from the Berlin Maraviroc Cohort (M. Obermeier, A. Carganico, T. Berg, B. Hintsche, S. Köppe, A. Moll, C. Mayr, B. Bienek, F. Scholte, and A. Baumgarten, presented at the 7th European HIV Drug Resistance Workshop, Stockholm, Sweden, 2009). One important point for determining the coreceptor usage with the Geno2pheno algorithm is the determination of the false-positive rate (FPR) for the detection of X4 isolates. A higher FPR enables the detection of more X4 viruses, but with less specificity. Our data suggest that an FPR of 10% leads to a good balance between sensitivity and specificity and shows the highest correlation with VR. Interestingly, a recent study of the MOTIVATE Trial suggested that a Geno2pheno score of 7.5% provided a good discrimination for the prediction of an optimal VR to MVC (P. R. Harrigan, R. McGovern, W. Dong, T. Mo, X. Zhong, D. Chapman, M. Lewis, A. Thielen, M. Jensen, H. Valdez, J. Heera, et al., presented at the 12th European AIDS Conference, Cologne, Germany, 2009).

Because of emerging evidence that the determinants of viral resistance to MVC (i.e., CCR5 use in the presence of the inhibitor) can be found predominantly within the V3 loop (2), we studied the prevalence of specific substitutions previously

associated with resistance to MVC in the baseline isolates before therapy including MVC. Although some patterns were found at a prevalence of 0.5% to 7.5%, no association between the presence of these substitutions at baseline and a poorer VR to MVC could be shown. Additional studies with higher statistical power should be set up in order to further document this question.

Other studies will be needed to further study the prediction of coreceptor use in HIV-1 non-B subtypes, since their prevalence was low in our patients. An initial report showed a poor performance of genotypic tools for non-B subtypes (6). However, two more recent studies are in favor of this approach for CRF02\_AG and subtype C (12, 14).

In conclusion, our study provides both biological and clinical validation of genotypic tools for the prediction of HIV-1 coreceptor use in antiretroviral-experienced patients. Our results and other already cited concordant studies were the basis for the recommendation of genotypic tests in this setting by the French Health Agency (<http://www.has-sante.fr>) and by the European guidelines ([www.europeanaidscouncilsociety.org/guidelines.asp](http://www.europeanaidscouncilsociety.org/guidelines.asp)). Genotypic tools for coreceptor usage will now be used to prescribe CCR5 inhibitors in antiretroviral-experienced patients. Further studies will be needed to clinically validate the genotypic prediction of coreceptor use before prescription of CCR5 inhibitors in antiretroviral-naïve patients or from HIV-1 DNA in patients with undetectable viremia.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank all patients included in the study. We thank Pascal Bonot and Chantal Leduc for excellent technical assistance.

This study was funded by the ANRS (Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites Virales, Paris, France) and Pfizer (we thank Nathalie Dang and Adyb Baakili). The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under the project "Collaborative HIV and Anti-HIV Drug Resistance Network (CHAIN)"—grant agreement no. 223131.

The members of the ANRS AC11 Study Group are given by location as follows. The following members represent the virology laboratories: Bordeaux, P. Recordon-Pinson, H. Fleury, and B. Masquelier; Caen, A. Vabret; Kremlin-Bicêtre, C. Pallier; Lille, M. Lazrek; Lyon, P. Andre, J. C. Tardy, and M. A. Traubaud; Marseille, C. Tamalet; Montpellier, B. Montes and M. Segondy; Nantes, V. Ferré; Nice, J. Cottalorda; Orléans, M. Macé; Paris—Bichat Claude Bernard, D. Descamps and F. Brun-Vézinet; Paris—HEGP, A. Si-Mohammed and C. Charpentier; Paris—Paul Brousse, D. Desbois and E. Dussaix; Paris—Pitié Salpêtrière, A. G. Marcelin, C. Soulié, V. Calvez, and F. Flandre (statistical analysis); Paris—Saint Antoine, L. Morand-Joubert; Paris—Tenon, C. Amiel and V. Schneider; Rennes, A. Maillard and A. Ruffault; and Toulouse, J. Izopet, F. Nicot, P. Delobel, and S. Raymond. The following members represent the clinical centers: Bordeaux, P. Morlat, I. Louis, J. M. Ragnaud, D. Neau, M. Dupon, and I. Raymond; Caen, R. Verdon; Kremlin-Bicêtre, J. F. Delfraissy; Lille, Y. Yazdanpanah; Lyon, C. Chidiac and L. Cotte; Marseille, I. Poizot-Martin and I. Ravaut; Montpellier, J. Reynes; Nantes, F. Raffi; Nice, J. Durant; Orléans, T. Prazuck; Paris—Bichat Claude Bernard, P. Yeni; Paris—HEGP, L. Weiss; Paris—Paul Brousse, D. Vittecoq; Paris—Pitié Salpêtrière, C. Katlama; Paris—Saint Antoine, P. M. Girard; Paris—Tenon, G. Pialoux; Rennes, C. Michelet; and Toulouse, B. Marchou.

#### REFERENCES

- Berger, E. A., P. M. Murphy, and J. M. Farber. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* **17**:657–700.
- Berro, R., R. W. Sanders, M. Lu, P. J. Klasse, and J. P. Moore. 2009. Two HIV-1 variants resistant to small molecule CCR5 inhibitors differ in how they use CCR5 for entry. *PLoS Pathog.* **5**:e1000548.
- Chueca, N., C. Garrido, M. Alvarez, E. Poveda, J. de Dios Luna, N. Zahonero, J. Hernandez-Quero, V. Soriano, C. Maroto, C. de Mendoza, and F. Garcia. 2009. Improvement in the determination of HIV-1 tropism using the V3 gene sequence and a combination of bioinformatic tools. *J. Med. Virol.* **81**:763–767.
- Coakley, E., C. J. Petropoulos, and J. M. Whitcomb. 2005. Assessing chemokine co-receptor usage in HIV. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **18**:9–15.
- Dorr, P., M. Westby, S. Dobbs, P. Griffin, B. Irvine, M. Macartney, J. Mori, G. Rickett, C. Smith-Burchnell, C. Napier, R. Webster, D. Armour, D. Price, B. Stammen, A. Wood, and M. Perros. 2005. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4721–4732.
- Garrido, C., V. Roulet, N. Chueca, E. Poveda, A. Aguilera, K. Skrabal, N. Zahonero, S. Carlos, F. Garcia, J. L. Faudon, V. Soriano, and C. de Mendoza. 2008. Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *J. Clin. Microbiol.* **46**:887–891.
- Gulick, R. M., J. Lalezari, J. Goodrich, N. Clumeck, E. DeJesus, A. Horban, J. Nadel, B. Clotet, A. Karlsson, M. Wohlfeiler, J. B. Montano, M. McHale, J. Sullivan, C. Ridgway, S. Felstead, M. W. Dunne, E. van der Ryst, and H. Mayer. 2008. Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* **359**:1429–1441.
- Hirsch, M. S., H. F. Gunthard, J. M. Schapiro, F. Brun-Vézinet, B. Clotet, S. M. Hammer, V. A. Johnson, D. R. Kuritzkes, J. W. Mellors, D. Pillay, P. G. Yeni, D. M. Jacobsen, and D. D. Richman. 2008. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society—U.S.A. panel. *Clin. Infect. Dis.* **47**:266–285.
- Lengauer, T., O. Sander, S. Sierra, A. Thielen, and R. Kaiser. 2007. Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. *Nat. Biotechnol.* **25**:1407–1410.
- Moyle, G. J., A. Wildfire, S. Mandalia, H. Mayer, J. Goodrich, J. Whitcomb, and B. G. Gazzard. 2005. Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* **191**:866–872.
- Raymond, S., P. Delobel, M. Mavigner, M. Cazabat, C. Souyris, S. Encinas, P. Bruel, K. Sandres-Saune, B. Marchou, P. Massip, and J. Izopet. 2010. Development and performance of a new recombinant virus phenotypic entry assay to determine HIV-1 coreceptor usage. *J. Clin. Virol.* **47**:126–130.
- Raymond, S., P. Delobel, M. Mavigner, M. Cazabat, C. Souyris, S. Encinas, K. Sandres-Saune, C. Pasquier, B. Marchou, P. Massip, and J. Izopet. 2009. Genotypic prediction of human immunodeficiency virus type 1 CRF02-AG tropism. *J. Clin. Microbiol.* **47**:2292–2294.
- Raymond, S., P. Delobel, M. Mavigner, M. Cazabat, C. Souyris, K. Sandres-Saune, L. Cuzin, B. Marchou, P. Massip, and J. Izopet. 2008. Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism. *AIDS* **22**:F11–F16.
- Raymond, S., P. Delobel, M. Mavigner, L. Ferradini, M. Cazabat, C. Souyris, K. Sandres-Saune, C. Pasquier, B. Marchou, P. Massip, and J. Izopet. 2010. Prediction of HIV type 1 subtype C tropism by genotypic algorithms built from subtype B viruses. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **53**:167–175.
- Soulie, C., I. Malet, S. Lambert-Niclot, R. Tubiana, M. Thevenin, A. Simon, R. Murphy, C. Katlama, V. Calvez, and A. G. Marcelin. 2008. Primary genotypic resistance of HIV-1 to CCR5 antagonists in CCR5 antagonist treatment-naïve patients. *AIDS* **22**:2212–2214.
- Su, Z., R. M. Gulick, A. Krambrink, E. Coakley, M. D. Hughes, D. Han, C. Flexner, T. J. Wilkin, P. R. Skolnik, W. L. Greaves, D. R. Kuritzkes, and J. D. Reeves. 2009. Response to vicriviroc in treatment-experienced subjects, as determined by an enhanced-sensitivity coreceptor tropism assay: reanalysis of AIDS Clinical Trials Group A5211. *J. Infect. Dis.* **200**:1724–1728.
- Trouplin, V., F. Salvatori, F. Cappello, V. Obry, A. Brelot, N. Heveker, M. Alizon, G. Scarlatti, F. Clavel, and F. Mammano. 2001. Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using a recombinant phenotypic assay. *J. Virol.* **75**:251–259.
- Whitcomb, J. M., W. Huang, S. Fransen, K. Limoli, J. Toma, T. Wrin, C. Chappey, L. D. Kiss, E. E. Paxinos, and C. J. Petropoulos. 2007. Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:566–575.

- S. McLaughlin, R. Shankarappa, J. B. Margolick, and J. I. Mullins. 2003. Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 *env* V3 loop sequences. *J. Virol.* **77**:13376–13388.
13. Raymond, S., P. Delobel, M. Mavigner, M. Cazabat, C. Souyris, K. Sandres-Saune, L. Cuzin, B. Marchou, P. Massip, and J. Izopet. 2008. Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism. *AIDS* **22**:F11–F16.
  14. Taylor, B. S., and S. M. Hammer. 2008. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N. Engl. J. Med.* **359**:1965–1966.
  15. Tebit, D. M., L. Zekeng, L. Kaptue, M. Salminen, H. G. Krausslich, and O. Herchenroder. 2002. Genotypic and phenotypic analysis of HIV type 1 primary isolates from western Cameroon. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **18**:39–48.
  16. Vergne, L., A. Bourgeois, E. Mpoudi-Ngole, R. Mougnotou, J. Mbuagbaw, F. Liegeois, C. Laurent, C. Butel, L. Zekeng, E. Delaporte, and M. Peeters. 2003. Biological and genetic characteristics of HIV infections in Cameroon reveals dual group M and O infections and a correlation between SI-inducing phenotype of the predominant CRF02\_AG variant and disease stage. *Virology* **310**:254–266.



## Low Frequency of CXCR4-Using Viruses in Patients at the Time of Primary Non-Subtype-B HIV-1 Infection<sup>∇</sup>

Pierre Frange,<sup>1,2†</sup> Marie-Laure Chaix,<sup>1†\*</sup> Stéphanie Raymond,<sup>3</sup> Julie Galimand,<sup>1</sup> Christiane Deveau,<sup>4</sup> Laurence Meyer,<sup>4</sup> Cécile Goujard,<sup>5</sup> Christine Rouzioux,<sup>1</sup> Jacques Izopet,<sup>3</sup> and the French ANRS CO 06 PRIMO Cohort Study Group

*Université Paris Descartes, EA 3620, AP-HP, Laboratoire de Virologie, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris,<sup>1</sup> Unité d'Immunologie, Hématologie et Rhumatologie Pédiatriques, Hôpital Necker-Enfants Malades, AP-HP, Paris,<sup>2</sup> INSERM U563, Laboratoire de Virologie, Hôpital Purpan, Toulouse,<sup>3</sup> INSERM, U1018, Université Paris-Sud, Faculté de Médecine Paris-Sud, AP-HP, Hôpital Bicêtre, Service d'Épidémiologie et de Santé Publique, Le Kremlin-Bicêtre,<sup>4</sup> and Service de Médecine Interne et Maladies Infectieuses, Hôpital Bicêtre, AP-HP, Le Kremlin-Bicêtre,<sup>5</sup> France*

Received 7 April 2010/Returned for modification 27 June 2010/Accepted 24 July 2010

**We used genotypic and phenotypic assays to estimate the frequency of X4/DM viruses in 131 patients infected with non-subtype-B viruses at the time of primary HIV-1 infection (PHI). All patients were enrolled in the French PRIMO Cohort from 1996 to 2007. Most strains belonged to CRF02\_AG (51.1%) and subtype A (14.5%). Sixteen viruses (12.2%) were classified as CXCR4 tropic (“X4 strains”) by the combined criteria of amino acids 11 and 25 of the V3 loop (11/25) and net charge rules and/or the SVMgeno2pheno<sub>10%</sub> algorithm: 6 strains by the combined genotypic rule, 7 by the SVMgeno2pheno<sub>10%</sub> algorithm, and 3, clustering in subtype D, by both algorithms. However, only one strain (0.8%), belonging to subtype A, was defined as a dual-tropic (DM) virus by the phenotypic assay. The 67 CRF02\_AG strains included 2 classified as X4 strains by the combined genotypic rule (3%) and 2 others classified as X4 strains by SVMgeno2pheno<sub>10%</sub> (3%), but none of these 4 strains was an X4 or DM strain according to the phenotypic assay. These results suggest that the cellular virus reservoir was established with X4 strains in very few non-subtype-B-infected patients at the time of PHI. Genotypic predictions can overestimate the proportion of non-subtype-B X4 viruses at PHI.**

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) can be characterized by the host chemokine coreceptor that it uses to enter CD4-expressing cells. HIV-1 variants usually bind to the CCR5 chemokine coreceptor early in the course of disease. These are “R5” viruses (3, 31, 48). Viruses that use another chemokine coreceptor, CXCR4, are “X4” viruses, and they emerge later in HIV infection. They can account for up to 40 to 50% of all viruses in heavily treated patients with advanced disease (1, 32). The presence of X4 viruses has been associated with accelerated disease progression and a precipitous loss of CD4 T cells (27, 29, 40). A recent Swiss study suggested that the presence of X4 strains and the X4-specific virus load strongly predict clinical disease progression during combined antiretroviral therapy (cART), in addition to the CD4 T-cell count or viral load (44). This potential correlation between virus tropism and disease progression has important clinical implications. The development of coreceptor CCR5 antagonists for treating retroviruses and the lack of a virological response by patients infected with X4 or dual/mixed (X4/DM) viruses have increased the need to determine HIV-1 tropism.

Recent studies have found the frequency of X4/DM dual-tropic strains in plasma samples from recently infected patients in the United States and Spain to be from 3.2% to 17.5% (14, 15, 16). Similarly, we found 15.9% (95% confidence interval

[CI], 12.3% to 19.5%) strains of X4/DM viruses in 390 HIV-1 subtype B-infected patients diagnosed at the time of primary HIV-1 infection (PHI) in France from 1996 to 2007 (18).

One of the major challenges of determining tropism is to select the best method for identifying coreceptor usage. HIV coreceptor usage is most commonly determined with a recombinant phenotype assay in clinical studies (28, 45). Bioinformatic tools based on the virus genotype may also be able to predict coreceptor usage. They are faster, less expensive, and more suitable for studies of a large number of patients than are phenotypic recombinant assays. Each available genotypic test is adequately specific but not very sensitive for detecting X4/DM or X4 variants. An overall concordance of 71.2 to 92% between genotypic and phenotypic assays has been reported (8, 15, 37, 41). However, most of these studies included HIV-1 subtype B strains. Genotypic algorithms may not be suitable for predicting the tropism of non-subtype-B HIV-1 strains (20). Two recent studies demonstrated that genotypic tests performed well for predicting the coreceptor usage of CRF02\_AG and subtype C strains (36, 38), but no study has examined the correlation between genotypic and phenotypic tests for predicting the tropism of non-subtype-B HIV-1 at the time of PHI. The French PRIMO Cohort contained a large proportion of patients infected with a non-subtype-B virus (25.5% in 2005 to 2006) (6).

We have therefore estimated the frequency of X4/DM viruses in 131 patients infected with non-subtype-B viruses at the time of PHI. All of them were enrolled in the French PRIMO Cohort from 1996 to 2007. We also studied the concordance between genotypic and phenotypic assays for

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Virologie, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149 Rue de Sèvres, 75015 Paris, France. Phone: 33(1)44.49.49.62. Fax: 33(1)44.49.49.60. E-mail: marie-laure.chaix@nck.aphp.fr.

† P.F. and M.-L.C. contributed equally to the work.

∇ Published ahead of print on 4 August 2010.

predicting the tropism of non-subtype-B viruses in these patients.

### MATERIALS AND METHODS

**Study population.** The patients studied presented with PHI when enrolled in the multicenter ANRS PRIMO Cohort (22). The PRIMO study protocol was approved by the Paris Cochin Ethics Committee, and all subjects gave their written informed consent. Subjects diagnosed during or soon after PHI, whether symptomatic or not, were enrolled. Recent infection was confirmed by (i) a negative or indeterminate HIV enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) result together with a positive antigenemia or plasma HIV RNA result, (ii) a Western blot (WB) profile compatible with ongoing seroconversion (incomplete WB with an absence of antibodies to *pol* proteins), or (iii) an initially negative test for HIV antibodies followed within 6 months by a positive HIV serology. The date of infection was estimated as the date of symptom onset minus 15 days, the date of the incomplete WB minus 1 month, or the midpoint between a negative and a positive ELISA. The interval between the estimated date of infection and enrollment could not exceed 6 months. Each patient underwent a physical examination at enrollment, and blood samples (plasma and peripheral blood mononuclear cells [PBMCs]) were collected for immunological and virological studies at the time of the enrollment in the cohort. No patient had received antiretroviral drugs at the time of inclusion.

**V3 *env* sequences.** Total DNA was extracted from frozen PBMCs with the QIAamp DNA minikit (Qiagen SA, Courtaboeuf, France). The *env* (340 bp) C2V3 regions were then amplified by using ED3/ED12 as outer primers and Env7/ED33 as inner primers (13). Each PCR mixture contained 1  $\mu$ g of template DNA, 0.2  $\mu$ M each primer in Expand high-fidelity buffer (5 $\times$ ) with 75 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), and 2.5 U of Expand high-fidelity *Taq* polymerase (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) in a final volume of 50  $\mu$ l. The amplified products were separated by electrophoresis and purified by using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Nucleotide sequences were obtained by directly sequencing the amplified DNA using the inner primers of each PCR and Big Dye Terminator V1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. Electrophoresis and data collection were performed with an ABI 3130 genetic analyzer sequencer (Applied Biosystems), and alignments were carried out by using Sequence Navigator software.

**Phylogenetic analysis of the V3 region.** The HIV-1 subtype was systematically determined after phylogenetic analysis of the V3 sequences. Phylogenetic relationships between V3 *env* sequences were estimated by comparing sequences with previously reported sequences representative of group M, including reference sequences of subtypes, sub-subtypes, and all the circulating recombinant form (CRF) sequences available in the HIV database or GenBank (until CRF43) (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>). Sequences were aligned by using the Clustal X program (42). Pairwise evolutionary distances were estimated by using Kimura's two-parameter method. Phylogenetic trees were constructed by a neighbor-joining method (neighbor program implemented in the Phylip package). The reliability of the tree topology was estimated from 1,000 bootstrap replicates. TreeView Win16 was used to draw trees for illustration (34).

**Genotypic methods for determining virus tropism.** We determined the HIV-1 coreceptor usage of each sample by two genotypic methods. One method was the SVMgeno2pheno algorithm (available at <http://coreceptor.bioinf.mpi-sb.mpg.de/cgi-bin/coreceptor.pl>), used with a false-positive rate of 10%. The other method was a genotypic rule based on amino acid residues at positions 11 and 25 and the overall net charge of V3 (4, 10, 17). One of the following criteria was required for predicting X4 coreceptor usage: (i) R or K at position 11 of V3 and/or K at position 25, (ii) R at position 25 of V3 and a net charge of  $\geq +5$ , or (iii) a net charge of  $\geq +6$  (36–38). The V3 net charge was calculated by subtracting the number of negatively charged amino acids (D and E) from the number of positively charged ones (K and R).

**Phenotypic method for determining virus tropism.** A region spanning gp120 and the ectodomain of the gp41 *env* gene of plasma HIV-1 RNA was amplified by reverse transcription-PCR. The phenotype of HIV-1 coreceptor usage was determined by using a recombinant virus entry assay, as previously described (35). The sensitivity of the assay for detecting minor amounts of CXCR4-using viruses was 0.5% (35).

**Nucleotide sequence accession numbers.** Virus sequences were submitted to GenBank with the following accession numbers AM851091, GQ409975 to GQ409981, GQ409985, GQ409988 to GQ409991, GQ409993 to GQ409994, GQ409997, GQ409999 to GQ410007, GQ410009 to GQ410010, GQ410013, GQ410015 to GQ410017, GQ410019, and GU988902 to GU989000.

TABLE 1. Baseline characteristics of the 131 patients infected with non-subtype-B HIV-1

Parameter <sup>a</sup>	Value
No. (%) of male patients.....	91 (69.5)
No. (%) of patients in risk group	
MSM.....	55 (41.9)
Heterosexual.....	69 (52.7)
i.v. drug user.....	1 (0.8)
Other.....	6 (4.3)
Median time since infection (days) (range).....	35.5 (18–169)
Median CD4 cell count (cells/mm <sup>3</sup> ) (range).....	523 (128–1,393)
Median HIV RNA (log <sub>10</sub> copies/ml) (range).....	4.84 (2.65–8.33)
Median HIV DNA (log <sub>10</sub> copies/10 <sup>6</sup> PBMCs) (range).....	3.20 (1.84–4.55) <sup>b</sup>

<sup>a</sup> i.v., intravenous.

<sup>b</sup> Data not available for five patients.

### RESULTS

A total of 870 patients were enrolled in the French ANRS PRIMO Cohort between 1996 and December 2007. Of these patients, 207 were infected with a non-subtype-B strain based on the phylogenetic analysis of the *env* gene. This substudy was carried out with 131 patients (Table 1) because samples were not available for the other 76 patients. The median time between infection and enrollment was 35.5 days (range, 18 to 169 days). Six strains (4.6%) were resistant to at least one class of antiretrovirals, and two viruses were resistant to two classes (1.5%). The distribution of the viruses into subtypes/CRFs was as follows: 19 subtype A (14.5%), 4 subtype C (3.1%), 6 subtype D (4.6%), 8 subtype F (6.1%), 9 subtype G (6.9%), 2 CRF01\_AE (1.5%), 67 CRF02\_AG (51.1%), 2 CRF09\_cpx (1.5%), and 2 CRF27\_cpx (1.5%) strains. Twelve strains (9.2%) remained undetermined, as they did not cluster with any known subtype or CRF. We have previously sequenced the full lengths of four of them: three subtype B/C/U recombinant viruses and one subtype A/K/U recombinant virus (19).

We found 16 viruses (12.2%) classified as X4/DM by at least one of the two genotypic rules/algorithms. Of these, 10 strains (7.6%) were classified as X4/DM with the SVMgeno2pheno<sub>10%</sub> algorithm: they belonged to subtype A ( $n = 1$ ), subtype D ( $n = 3$ ), CRF01\_AE ( $n = 2$ ), CRF02\_AG ( $n = 2$ ), and CRF27\_cpx ( $n = 1$ ); the last one remained undetermined. We identified 9 strains (6.9%) as being X4/DM strains by the combined genotypic rule: 1 subtype A strain, 4 subtype D strains, 2 CRF02\_AG strains, 1 subtype G strain, and 1 undetermined strain. Three strains (2.3%) were classified as X4/DM with both SVMgeno2pheno<sub>10%</sub> and the combined genotypic rule: all of them belonged to subtype D.

Only one strain (0.8%), which clustered into subtype A, was defined as a dual-tropic virus by the phenotypic assay: it was classified as a X4/DM strain by the combined genotypic rule but as an R5 strain by SVMgeno2pheno<sub>10%</sub>. This strain was isolated from a patient infected after heterosexual contact.

The agreement between the genotypic classification based on the combined criteria of the 11/25 and net charge rules and the SVMgeno2pheno<sub>10%</sub> tool and the phenotype according to the HIV subtype are summarized in Table 2. Two of the 67 CRF02\_AG strains were classified as X4 tropic by the combined genotypic rule (3%), and two others were classified as

TABLE 2. Genotypic prediction of HIV-1 tropism and observed phenotypes for predicting CXCR4 usage of CRF02\_AG, subtype A, subtype D, and other non-subtype-B strains

Prediction method	No. of strains of indicated predicted phenotype							
	CRF02_AG ( <i>n</i> = 67)		Subtype A ( <i>n</i> = 19)		Subtype D ( <i>n</i> = 6)		Other subtype ( <i>n</i> = 39)	
	R5	R5X4/X4	R5	R5X4/X4	R5	R5X4/X4	R5	R5X4/X4
Combined 11/25 and net charge rules								
R5	65	0	18	0	2	0	37	0
X4	2	0	0	1	4	0	2	0
Geno2pheno <sub>10%</sub> <sup>a</sup>								
R5	65	0	17	1	3	0	35	0
X4	2	0	1	0	3	0	4	0

<sup>a</sup> Value of the fixed false-positive rate.

X4 tropic by SVMgeno2pheno<sub>10%</sub> (3%), but none of these four strains was identified as an X4 strain by the phenotype assay.

**DISCUSSION**

The phenotypic assay identified very few (0.8%) X4/DM viruses in the 131 patients infected with a non-subtype-B strain and diagnosed at the time of PHI in France from 1996 to 2007. This is one of the largest series of such patients examined to date. The genotypic rules identified 12.2% of strains (16/131) as being X4/DM viruses: 7 strains were classified as X4/DM strains by the SVMgeno2pheno<sub>10%</sub> algorithm, 6 were classified as X4/DM strains by the combined genotypic rule, and 3 were classified as X4/DM strains by both algorithms. Because only one strain was dual tropic with the phenotypic assay, we could not evaluate the sensitivity of the genotypic methods to predict viral tropism. Further studies are needed to perform this evaluation.

Previous studies have shown that the combined genotypic algorithm is better than the 11/25 and net charge rules used separately to predict HIV-1 coreceptor usage in subtype B viruses (11, 37). A recent report found that genotypic tools were not very sensitive for detecting X4 variants in non-B subtypes. However, no details of their performance for a particular subtype were given (20). In another study, Raymond et al. found that the SVMgeno2pheno<sub>10%</sub> tool lacked sensitivity for predicting the CXCR4 usage of CRF02\_AG strains, whereas the combined 11/25 and net charge rule criteria were equally good at predicting the CXCR4 usage of both CRF02\_AG and subtype B strains (36, 37). We could not evaluate the sensitivity of these genotypic tools because none of our patients was infected with an X4-tropic CRF02\_AG virus. However, we confirmed their previously reported high specificity for this subtype (97%; 95% CI, 89.6% to 99.6%).

The combined 11/25 and net charge rule criteria seemed to be more sensitive for detecting CXCR4 usage in the 19 subtype A strains than was the SVMgeno2pheno<sub>10%</sub> algorithm, but their specificities were similar (≥94%).

As the phenotypic test is complex to implement in a clinical setting, our results suggest that using the combined 11/25 and net charge rule criteria or using the SVMgeno2pheno<sub>10%</sub> algorithm can provide reliable information on HIV-1 tropism when testing CRF02\_AG or subtype A strains. Genotypic as-

says can be useful for predicting the tropism of CRF02\_AG recombinant subtype and subtype A strains in clinical practice, as these are the predominant non-B subtypes of HIV-1 in Western Europe.

We tried to evaluate the performance of the genotypic algorithms for subtype D viruses, although these have been rarely found in the French PRIMO Cohort, as this subtype is said to be mainly X4 tropic. The algorithms gave different results, but the SVMgeno2pheno<sub>10%</sub> tool was more specific. Further studies on more subtype D strains are needed to estimate the validity of such genotypic rules for predicting coreceptor usage for this subtype.

Although some studies found no difference in coreceptor tropism among the different virus subtypes (47), recent reports suggested that syncytium-inducing (SI) or CXCR4-using strains predominate in some subtypes (subtype D and CRF01\_AE) (9, 23, 26, 43, 46), while non-SI/CCR5-using strains tend to predominate in some other subtypes (subtypes A and C) (2, 26, 33, 43, 46). The fact that we find no differences between subtypes/CRFs could be due to the small number of strains of each type (except CRF02\_AG). However, 20 to 45% of the strains that were classified as X4-tropic viruses by the successive genotypic algorithms belonged to subtype D, and the two CRF01\_AE viruses were defined as X4 tropic with the SVMgeno2pheno<sub>10%</sub> algorithm. This could be due to the poor sensitivity of the phenotypic assay for detecting minor CXCR4-using virus variants. However, our phenotypic assay detects minor CXCR4-using variants when they account for as little as 0.5% of the virus population, which is substantially better than the analytical sensitivity of direct sequencing (≥10 to 20%). In addition, our study was performed at the time of PHI, when the dominant homogenous population is usually expanding (12, 21). These discordant results could also be due to the poor specificity of the genotypic algorithms for non-subtype-B strains that include few X4 viruses.

We find a smaller proportion of X4/DM strains in patients with an acute infection than the 3.2 to 17.2% reported in previous studies (14, 15, 16, 18). However, those earlier studies included very few non-subtype-B strains: there were no non-subtype-B viruses in the French and American reports and 4 (6.5%) and 10 (5%) viruses in the Spanish studies, which found no X4/DM non-subtype-B viruses. This rarity of X4/DM viruses is in line with what was reported previously for large



cohorts of antiretroviral-naïve chronically infected individuals, in which the proportion of non-subtype-B-infected patients was very low, if it was reported (5, 25, 32).

We performed our study on cell-associated viruses using HIV DNA extracted from PBMCs, which is representative of the virus in the cellular reservoir. In contrast, most studies have carried out tropism tests on HIV RNA extracted from plasma. A recent report by Raymond et al. described the good agreement between HIV-1 tropisms in PBMCs and plasma at the stage of PHI (39). Our results suggest that the cellular virus reservoir is established with X4/DM strains in a very small proportion of patients infected with non-subtype-B viruses at the time of PHI. Further studies are needed to evaluate the virus tropism in the tissues of patients during primary HIV-1 infection, especially in cases where a patient is infected with a X4/DM strain, as Mefford et al. recently reported that bioinformatics prediction programs underestimate the frequency of CXCR4 usage by R5X4 strains in the brain and other tissues (30).

X4/DM strains were found in fewer PRIMO Cohort patients infected with non-subtype B HIV than in patients infected with subtype B, where 14.3% of X4/DM-tropic viruses were identified in PBMC samples using the SVMgeno2pheno<sub>10%</sub> algorithm (18). These results could be explained by differences in the demographics and behaviors of the two groups of PRIMO Cohort patients. The patients infected with subtype B strains were mainly native French men who had had sex with men (MSM). Clusters could be frequently isolated from these men in phylogenetic studies. Many of the non-subtype-B-infected patients were heterosexual men and women originally from sub-Saharan countries. We postulate that the subtype B patients had been infected by chronically infected, intensively treated, patients whose strains were more frequently X4/DM tropic.

The difference between the two populations is also supported by the fact that more subtype B group patients were infected with a resistant strain than were non-subtype-B patients during the first decade of the PRIMO Cohort (data not shown). This study, which includes the majority of non-subtype-B-infected patients enrolled since 1996, finds that fewer non-subtype-B-infected patients were infected with resistant viruses (4.6%) than the subtype B-infected patients (15.9%) tested in our previous study (18), which included recently infected patients from the PRIMO Cohort.

There could be another explanation for the differences in the coreceptor usages of the subtype B and non-subtype-B strains isolated from the PRIMO Cohort patients. Several studies have shown that while the V3 region is a major determinant of coreceptor tropism, other regions outside the coreceptor binding site and outside the gp120 surface subunit (in the gp41 transmembrane subunit) can contribute to coreceptor usage (7, 23, 24). These regions, which have yet to be fully characterized, differ between HIV-1 subtypes and influence the susceptibility of certain virus subtypes to use predominantly a CCR5 or CXCR4 coreceptor.

Finally, the lower prevalence of X4-tropic non-subtype-B strains in this report than in our previous study on subtype B-infected patients from the PRIMO Cohort could be due to the smaller number of subjects studied. This could have un-

derestimated the frequency of CXCR4 use in non-subtype-B viruses.

In conclusion, the frequency (0.8%) of X4/DM viruses in patients infected with non-subtype-B strains of HIV-1 is very low at the time of PHI. The use of genotypic methods at this time could overestimate the proportion of non-subtype-B X4-tropic strains.

#### ACKNOWLEDGMENTS

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

We are indebted to the patients enrolled in the cohort. Without their participation, none of these studies would have been possible. The English text was edited by Owen Parkes. The full list of investigators in the French Primo Study group can be found at <http://u822.kb.inserm.fr/COHAD/participantsPRIMO.ht>.

#### REFERENCES

- Berger, E. A., P. M. Murphy, and J. M. Farber. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* **17**:657–700.
- Bjorndal, A., A. Sonnerborg, C. Tscherning, J. Albert, and E. M. Fenyo. 1999. Phenotypic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 subtype C isolates of Ethiopian AIDS patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **15**:647–653.
- Bonsel, M., and V. David. 2002. Mucosal gatekeepers: selecting HIV viruses for early infection. *Nat. Med.* **8**:114–116.
- Briggs, D. R., D. L. Tuttle, J. W. Sleasman, and M. M. Goodenow. 2000. Envelope V3 amino acid sequence predicts HIV-1 phenotype (co-receptor usage and tropism for macrophages). *AIDS* **14**:2937–2939.
- Brumme, Z. L., J. Goodrich, H. B. Mayer, C. J. Brumme, B. M. Henrick, B. Wynhoven, J. J. Asselin, P. K. Cheung, R. S. Hogg, J. S. Montaner, and P. R. Harrigan. 2005. Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naïve individuals. *J. Infect. Dis.* **192**:466–474.
- Chaix, M. L., D. Descamps, M. Wirden, L. Bocket, C. Delaugerre, C. Tamalet, V. Schneider, J. Izopet, B. Masquelier, C. Rouzioux, L. Meyer, and D. Costagliola. 2009. Stable frequency of HIV-1 transmitted drug resistance in patients at the time of primary infection over 1996–2006 in France. *AIDS* **23**:717–724.
- Chesebro, B., K. Wehrly, J. Nishio, and S. Perryman. 1996. Mapping of independent V3 envelope determinants of human immunodeficiency virus type 1 macrophage tropism and syncytium formation in lymphocytes. *J. Virol.* **70**:9055–9059.
- Chueca, N., C. Garrido, M. Alvarez, E. Poveda, J. de Dios Luna, N. Zahonero, J. Hernandez-Quero, V. Soriano, C. Maroto, C. de Mendoza, and F. Garcia. 2009. Improvement in the determination of HIV-1 tropism using the V3 gene sequence and a combination of bioinformatic tools. *J. Med. Virol.* **81**:763–767.
- Church, J. D., W. Huang, A. Mwatha, J. Toma, E. Stawiski, D. Donnell, L. A. Guay, F. Mmoro, P. Musoke, J. B. Jackson, N. Parkin, and S. H. Eshleman. 2008. HIV-1 tropism and survival in vertically infected Ugandan infants. *J. Infect. Dis.* **197**:1382–1388.
- De Jong, J. J., A. De Ronde, W. Keulen, M. Tersmette, and J. Goudsmit. 1992. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J. Virol.* **66**:6777–6780.
- Delobel, P., M. T. Nugeyre, M. Cazabat, C. Pasquier, B. Marchou, P. Masisip, F. Barre-Sinoussi, N. Israel, and J. Izopet. 2007. Population-based sequencing of the V3 region of env for predicting the coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1572–1580.
- Delwart, E., M. Magierowska, M. Royz, B. Foley, L. Peddada, R. Smith, C. Heldebrandt, A. Conrad, and M. Busch. 2002. Homogeneous quasispecies in 16 out of 17 individuals during very early HIV-1 primary infection. *AIDS* **16**:189–195.
- Delwart, E. L., E. G. Shpaer, J. Louwagie, F. E. McCutchan, M. Grez, H. Rubsamens-Waigmann, and J. I. Mullins. 1993. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science* **262**:1257–1261.
- de Mendoza, C., C. Rodriguez, F. Garcia, J. M. Eiros, L. Ruiz, E. Caballero, A. Aguilera, P. Leiva, J. Colomina, F. Gutierrez, J. del Romero, J. Agüero, and V. Soriano. 2007. Prevalence of X4 tropic viruses in patients recently infected with HIV-1 and lack of association with transmission of drug resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**:698–704.
- de Mendoza, C., K. Van Baelen, E. Poveda, E. Rondelez, N. Zahonero, L. Stuyver, C. Garrido, J. Villacian, and V. Soriano. 2008. Performance of a

- population-based HIV-1 tropism phenotypic assay and correlation with V3 genotypic prediction tools in recent HIV-1 seroconverters. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **48**:241–244.
16. Eshleman, S. H., M. Husnik, S. Hudelson, D. Donnell, Y. Huang, W. Huang, S. Hart, B. Jackson, T. Coates, M. Chesney, and B. Koblin. 2007. Antiretroviral drug resistance, HIV-1 tropism, and HIV-1 subtype among men who have sex with men with recent HIV-1 infection. *AIDS* **21**:1165–1174.
  17. Fouchier, R. A., M. Groenink, N. A. Kootstra, M. Tersmette, H. G. Huisman, F. Miedema, and H. Schuitemaker. 1992. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J. Virol.* **66**:3183–3187.
  18. Frange, P., J. Galimand, C. Goujard, C. Deveau, J. Ghosn, C. Rouzioux, L. Meyer, and M. L. Chaix. 2009. High frequency of X4/DM-tropic viruses in PBMC samples from patients with primary HIV-1 subtype-B infection in 1996-2007: the French ANRS CO06 PRIMO Cohort Study. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**:135–141.
  19. Frange, P., J. Galimand, N. Vidal, C. Goujard, C. Deveau, F. Souala, M. Peeters, L. Meyer, C. Rouzioux, and M. L. Chaix. 2008. New and old complex recombinant HIV-1 strains among patients with primary infection in 1996-2006 in France: the French ANRS CO06 Primo Cohort Study. *Retrovirology* **5**:69.
  20. Garrido, C., V. Roulet, N. Chueca, E. Poveda, A. Aguilera, K. Skrabal, N. Zahonero, S. Carlos, F. Garcia, J. L. Faudon, V. Soriano, and C. de Mendoza. 2008. Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *J. Clin. Microbiol.* **46**:887–891.
  21. Ghosn, J., I. Pellegrin, C. Goujard, C. Deveau, J. P. Viard, J. Galimand, M. Harzic, C. Tamalet, L. Meyer, C. Rouzioux, and M. L. Chaix. 2006. HIV-1 resistant strains acquired at the time of primary infection massively fuel the cellular reservoir and persist for lengthy periods of time. *AIDS* **20**:159–170.
  22. Goujard, C., M. Bonarek, L. Meyer, F. Bonnet, M. L. Chaix, C. Deveau, M. Sinet, J. Galimand, J. F. Delfraissy, A. Venet, C. Rouzioux, and P. Morlat. 2006. CD4 cell count and HIV DNA level are independent predictors of disease progression after primary HIV type 1 infection in untreated patients. *Clin. Infect. Dis.* **42**:709–715.
  23. Huang, W., S. H. Eshleman, J. Toma, S. Fransen, E. Stawiski, E. E. Paxinos, J. M. Whitcomb, A. M. Young, D. Donnell, F. Mmiro, P. Musoke, L. A. Guay, J. B. Jackson, N. T. Parkin, and C. J. Petropoulos. 2007. Coreceptor tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtype D: high prevalence of CXCR4 tropism and heterogeneous composition of viral populations. *J. Virol.* **81**:7885–7893.
  24. Huang, W., J. Toma, S. Fransen, E. Stawiski, J. D. Reeves, J. M. Whitcomb, N. Parkin, and C. J. Petropoulos. 2008. Coreceptor tropism can be influenced by amino acid substitutions in the gp41 transmembrane subunit of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* **82**:5584–5593.
  25. Hunt, P. W., P. R. Harrigan, W. Huang, M. Bates, D. W. Williamson, J. M. McCune, R. W. Price, S. S. Spudich, H. Lampiris, R. Hoh, T. Leigler, J. N. Martin, and S. G. Deeks. 2006. Prevalence of CXCR4 tropism among antiretroviral-treated HIV-1-infected patients with detectable viremia. *J. Infect. Dis.* **194**:926–930.
  26. Kaleebu, P., I. L. Nankya, D. L. Yirrell, L. A. Shafer, J. Kyosiimire-Lugemwa, D. B. Lule, D. Morgan, S. Beddows, J. Weber, and J. A. Whitworth. 2007. Relation between chemokine receptor use, disease stage, and HIV-1 subtypes A and D: results from a rural Ugandan cohort. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **45**:28–33.
  27. Koot, M., I. P. Keet, A. H. Vos, R. E. de Goede, M. T. Roos, R. A. Coutinho, F. Miedema, P. T. Schellekens, and M. Tersmette. 1993. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann. Intern. Med.* **118**:681–688.
  28. Low, A. J., W. Dong, D. Chan, T. Sing, R. Swanstrom, M. Jensen, S. Pillai, B. Good, and P. R. Harrigan. 2007. Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4 co-receptor usage in clinical isolates. *AIDS* **21**:F17–F24.
  29. Maas, J. J., S. J. Gange, H. Schuitemaker, R. A. Coutinho, R. van Leeuwen, and J. B. Margolick. 2000. Strong association between failure of T cell homeostasis and the syncytium-inducing phenotype among HIV-1-infected men in the Amsterdam Cohort Study. *AIDS* **14**:1155–1161.
  30. Mefford, M. E., P. R. Gorry, K. Kunstman, S. M. Wolinsky, and D. Gabuzda. 2008. Bioinformatic prediction programs underestimate the frequency of CXCR4 usage by R5X4 HIV type 1 in brain and other tissues. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **24**:1215–1220.
  31. Moore, J. P., S. G. Kitchen, P. Pugach, and J. A. Zack. 2004. The CCR5 and CXCR4 coreceptors—central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **20**:111–126.
  32. Moyle, G. J., A. Wildfire, S. Mandalia, H. Mayer, J. Goodrich, J. Whitcomb, and B. G. Gazzard. 2005. Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* **191**:866–872.
  33. Ndung'u, T., E. Sepako, M. F. McLane, F. Chand, K. Bedi, S. Gaseitsiwe, F. Doualla-Bell, T. Peter, I. Thior, S. M. Moyo, P. B. Gilbert, V. A. Novitsky, and M. Essex. 2006. HIV-1 subtype C in vitro growth and coreceptor utilization. *Virology* **347**:247–260.
  34. Page, R. D. 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**:357–358.
  35. Raymond, S., P. Delobel, M. Mavigner, M. Cazabat, C. Souyris, S. Encinas, P. Bruel, K. Sandres-Saune, B. Marchou, P. Massip, and J. Izopet. 2009. Development and performance of a new recombinant virus phenotypic entry assay to determine HIV-1 coreceptor usage. *J. Clin. Virol.* **47**:126–130.
  36. Raymond, S., P. Delobel, M. Mavigner, M. Cazabat, C. Souyris, S. Encinas, K. Sandres-Saune, C. Pasquier, B. Marchou, P. Massip, and J. Izopet. 2009. Genotypic prediction of human immunodeficiency virus type 1 CRF02-AG tropism. *J. Clin. Microbiol.* **47**:2292–2294.
  37. Raymond, S., P. Delobel, M. Mavigner, M. Cazabat, C. Souyris, K. Sandres-Saune, L. Cuzin, B. Marchou, P. Massip, and J. Izopet. 2008. Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism. *AIDS* **22**:F11–F16.
  38. Raymond, S., P. Delobel, M. Mavigner, L. Ferradini, M. Cazabat, C. Souyris, K. Sandres-Saune, C. Pasquier, B. Marchou, P. Massip, and J. Izopet. 2010. Prediction of HIV type 1 subtype C tropism by genotypic algorithms built from subtype B viruses. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **53**:167–175.
  39. Raymond, S., P. Delobel, M. Mavigner, M. Cazabat, S. Encinas, P. Bruel, K. Saune, B. Marchou, P. Massip, and J. Izopet. 2010. Phenotypic characterization of HIV-1 co-receptor use in primary infection in both plasma and PBMC samples, abstr. 470. Abstr. 17th Conf. Retroviruses Opportun. Infect., San Francisco, CA.
  40. Shepherd, J. C., L. P. Jacobson, W. Qiao, B. D. Jamieson, J. P. Phair, P. Piazza, T. C. Quinn, and J. B. Margolick. 2008. Emergence and persistence of CXCR4-tropic HIV-1 in a population of men from the multicenter AIDS cohort study. *J. Infect. Dis.* **198**:1104–1112.
  41. Skrabal, K., A. J. Low, W. Dong, T. Sing, P. K. Cheung, F. Mammano, and P. R. Harrigan. 2007. Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting: degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model. *J. Clin. Microbiol.* **45**:279–284.
  42. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**:4876–4882.
  43. Tscherning, C., A. Alaeus, R. Fredriksson, A. Bjorndal, H. Deng, D. R. Littman, E. M. Fenyo, and J. Albert. 1998. Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. *Virology* **241**:181–188.
  44. Weiser, B., S. Philpott, T. Klimkait, H. Burger, C. Kitchen, P. Burgisser, M. Gorgievski, L. Perrin, J. C. Piffaretti, and B. Ledergerber. 2008. HIV-1 coreceptor usage and CXCR4-specific viral load predict clinical disease progression during combination antiretroviral therapy. *AIDS* **22**:469–479.
  45. Whitcomb, J. M., W. Huang, S. Fransen, K. Limoli, J. Toma, T. Wrin, C. Chappey, L. D. Kiss, E. E. Paxinos, and C. J. Petropoulos. 2007. Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:566–575.
  46. Zhang, C., S. Xu, J. Wei, and H. Guo. 2009. Predicted co-receptor tropism and sequence characteristics of China HIV-1 V3 loops: implications for the future usage of CCR5 antagonists and AIDS vaccine development. *Int. J. Infect. Dis.* **13**:e212–e216.
  47. Zhang, L., C. D. Carruthers, T. He, Y. Huang, Y. Cao, G. Wang, B. Hahn, and D. D. Ho. 1997. HIV type 1 subtypes, coreceptor usage, and CCR5 polymorphism. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **13**:1357–1366.
  48. Zhu, T., H. Mo, N. Wang, D. S. Nam, Y. Cao, R. A. Koup, and D. D. Ho. 1993. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* **261**:1179–1181.

## **TITLE**

Characterization of HIV-1 tropism: implications for pathophysiology and therapy

## **ABSTRACT**

Determining the coreceptor used by HIV-1 for entry is necessary to study the impact of HIV-1 tropism on disease progression and the virological response to CCR5 antagonists and requires methods with validated performances. We developed a sensitive phenotypic entry assay based on the production of recombinant viruses and genotypic approaches for assessing HIV-1 tropism. Then, we studied the concordance between both genotypic and phenotypic approaches and we demonstrated that the genotypic determination of HIV-1 coreceptor use by V3 direct sequencing was a reliable alternative to phenotypic assays for tropism determination before using CCR5 antagonists in subtype B, but also in subtypes C and CRF02-AG infected patients. We also found that primary HIV infection with a CXCR4-using virus was rare but predictive of a faster disease progression than primary infection with a virus using exclusively CCR5.

**AUTEUR** : Stéphanie RAYMOND

**TITRE** : Caractérisation du tropisme du HIV-1 : implications physiopathologiques et thérapeutiques

**DIRECTEUR DE THESE** : Jacques IZOPET

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE** : Toulouse, le 18 novembre 2010

**RESUME en Français :**

La détermination des corécepteurs d'entrée utilisés par le HIV-1 est nécessaire afin d'étudier l'impact du tropisme viral sur l'évolution de la maladie et la réponse aux traitements par des antagonistes de CCR5. Un test phénotypique sensible fondé sur la construction de virus recombinants ainsi que des approches génotypiques de détermination du tropisme du HIV-1 ont été développés en parallèle et nous avons évalué la concordance entre ces deux approches. Notre travail a montré que la détermination génotypique du tropisme par analyse de la séquence V3 du HIV-1 était une alternative simple et efficace aux tests phénotypiques avant la prescription d'antagonistes de CCR5 chez les patients infectés par des virus de sous-type B, ainsi que par des sous-types C et CRF02-AG. Nous avons également montré que la primo-infection HIV-1 avec un virus utilisant CXCR4 était peu fréquente mais prédictive d'une évolution plus rapide de la maladie que la primo-infection avec un virus utilisant exclusivement CCR5.

*Titre et résumé en Anglais au recto de la dernière page*

**MOTS-CLES :**

HIV-1 ; gp120 ; CCR5 ; CXCR4 ; Génotype ; Phénotype ; Tropisme ; Antagoniste de CCR5 ; Primo-infection

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE** : Immunologie

**INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :**

*Laboratoire de Virologie, Inserm U563, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse*