

Académie d'Orléans –Tours
Université François-Rabelais

FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

Année 2013

N°

Thèse
pour le
DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'Etat

Par

BEZ Stéphanie
Née le 14/12/1984 à Versailles (78)

Présentée et soutenue publiquement le 15 février 2013

Etude de la compartimentation du VIH-1 entre système nerveux central et sang par la méthode d'amplification de génomes uniques («single genome amplification», SGA) suivie de séquençage, appliquée à quatre patients présentant des troubles neurologiques.

Jury

Président de Jury : Monsieur le Professeur GOUDEAU Alain

Membres du jury : Monsieur le Docteur BASTIDES Frédéric
Madame le Docteur GAUDY-GRAFFIN Catherine
Monsieur le Professeur MEREGHETTI Laurent
Monsieur le Professeur BARIN Francis

RESUME

La compartimentation du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est le reflet d'une évolution indépendante du virus dans différents organes ou tissus. Le neurotropisme du VIH a pour conséquence l'apparition de pathologies neurologiques, y compris chez des patients séropositifs apparemment en succès thérapeutique. Sous une pression de sélection immune moindre et du fait d'une moins bonne pénétration de certaines molécules anti-rétrovirales, les variants viraux qui se développent au niveau du système nerveux central peuvent diverger de la population virale plasmatique et notamment présenter des mutations de résistance aux antirétroviraux différentes de celles des variants sanguins.

L'objectif de notre travail était de réaliser une étude exploratoire en utilisant une technique d'isolement de clones viraux appelée « Single Genome Amplification » (SGA) à la problématique de la compartimentation. Le SGA suivi du séquençage nucléotidique a été appliqué à l'étude du liquide céphalorachidien (LCR) et du plasma de quatre patients VIH+ atteints de troubles neurologiques divers. Une analyse phylogénétique a ensuite permis de répondre à la question de la compartimentation entre LCR et plasma. Des profils hétérogènes avec compartimentation entre LCR et plasma ont été constatés chez deux patients sur quatre, suggérant différents mécanismes ou implications du VIH dans les pathologies neurologiques associées à l'infection par ce virus.

Mots clés :

- Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)
- «Single genome amplification» (SGA)
- Amplification de génomes uniques
- Compartimentation
- Système nerveux central

ABSTRACT

The compartmentalization of HIV shows an independent viral evolution in tissues or organs. HIV's neurotropism can be followed by neurologic diseases, even when the HIV-positive patients have been successfully treated. Under a poor selective immune pressure and because of an insufficient penetration of some antiviral drugs, virus variants in the central nervous system (CNS) can diverge from the plasma virus variants. Some variants in the CNS can show drug resistance mutations which are different from the plasma variants.

Our aim was to carry out a study of compartmentalization using the "Single genome amplification" (SGA), a PCR method that isolates viral clones. SGA followed by sequencing was applied to the analysis of the cerebrospinal fluid and the plasma of four HIV-positive patients with diverse neurological diseases. A phylogenetic analysis was then used to research compartmentalization between the two compartments. We obtained heterogeneous phylogenetic trees with two compartmentalized profiles on four, suggesting different mechanisms and implications in the neurological diseases linked to HIV.

Keywords:

- Human immunodeficiency virus (HIV)
- «Single genome amplification» (SGA)
- Compartmentalization
- Central nervous system (CNS)

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Professeur Dominique PERROTIN

VICE-DOYEN

Professeur Daniel ALISON

ASSEESSEURS

Professeur Christian ANDRES, Recherche
Professeur Christian BINET, Formation Médicale Continue
Professeur Laurent BRUNEREAU, Pédagogie
Professeur Patrice DIOT, Recherche clinique

SECRETAIRE GENERALE

Madame Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Professeur Emile ARON (†) – 1962-1966
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Professeur Georges DESBUQUOIS (†)- 1966-1972
Professeur André GOUAZÉ - 1972-1994
Professeur Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004

PROFESSEURS EMERITES

Professeur Alain AUTRET
Professeur Jean-Claude BESNARD
Professeur Patrick CHOUTET
Professeur Guy GINIES
Professeur Olivier LE FLOCH
Professeur Chantal MAURAGE
Professeur Léandre POURCELOT
Professeur Michel ROBERT
Professeur Jean-Claude ROLLAND

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. Ph. ANTHONIOZ - A. AUDURIER – Ph. BAGROS - G. BALLON – P.BARDOS - J. BARSOTTI
A. BENATRE - Ch. BERGER –J. BRIZON - Mme M. BROCHIER - Ph. BURDIN - L. CASTELLANI
J.P. FAUCHIER - B. GRENIER – M. JAN –P. JOBARD - J.-P. LAMAGNERE - F. LAMISSE – J. LANSAC
J. LAUGIER - G. LELORD - G. LEROY - Y. LHUINTRE - M. MAILLET - Mlle C. MERCIER - E/H. METMAN
J. MOLINE - Cl. MORAINÉ - H. MOURAY - J.P. MUH - J. MURAT - Mme T. PLANIOL - Ph. RAYNAUD
Ch. ROSSAZZA - Ph. ROULEAU - A. SAINDELLE - J.J. SANTINI - D. SAUVAGE - M.J. THARANNE
J. THOUVENOT - B. TOUMIEUX - J. WEILL.

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

MM.	ALISON Daniel	Radiologie et Imagerie médicale
	ANDRES Christian	Biochimie et Biologie moléculaire
	ANGOULVANT Denis	Cardiologie
	ARBEILLE Philippe	Biophysique et Médecine nucléaire
	AUPART Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	BABUTY Dominique	Cardiologie
Mme	BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; Radiothérapie
MM.	BARON Christophe	Immunologie
	BAULIEU Jean-Louis	Biophysique et Médecine nucléaire
	BERNARD Louis	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
	BEUTTER Patrice	Oto-Rhino-Laryngologie
	BINET Christian	Hématologie ; Transfusion
	BODY Gilles	Gynécologie et Obstétrique
	BONNARD Christian	Chirurgie infantile
	BONNET Pierre	Physiologie
Mme	BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
MM.	BOUGNOUX Philippe	Cancérologie ; Radiothérapie
	BRILHAULT Jean	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	BRUNEREAU Laurent	Radiologie et Imagerie médicale
	BRUYERE Frank	Urologie
	BUCHLER Matthias	Néphrologie
	CALAIS Gilles	Cancérologie ; Radiothérapie
	CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
	CHANDENIER Jacques	Parasitologie et Mycologie
	CHANTEPIE Alain	Pédiatrie
	COLOMBAT Philippe	Hématologie ; Transfusion
	CONSTANS Thierry	Médecine interne ; Gériatrie et Biologie du vieillissement
	CORCIA Philippe	Neurologie
	COSNAY Pierre	Cardiologie
	COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et Imagerie médicale
	COUET Charles	Nutrition
	DANQUECHIN DORVAL Etienne	Gastroentérologie ; Hépatologie
	DE LA LANDE DE CALAN Loïc	Chirurgie digestive
	DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
	DEQUIN Pierre-François	Thérapeutique ; médecine d'urgence
	DESTRIEUX Christophe	Anatomie
	DIOT Patrice	Pneumologie
	DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & Cytologie pathologiques
	DUMONT Pascal	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	FAUCHIER Laurent	Cardiologie
	FAVARD Luc	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	FOUQUET Bernard	Médecine physique et de Réadaptation
	FRANCOIS Patrick	Neurochirurgie
	FUSCIARDI Jacques	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence
	GAILLARD Philippe	Psychiatrie d'Adultes
	GOGA Dominique	Chirurgie maxillo-faciale et Stomatologie
	GOUDEAU Alain	Bactériologie -Virologie ; Hygiène hospitalière
	GOUPILLE Philippe	Rhumatologie
	GRUEL Yves	Hématologie ; Transfusion
	GUILMOT Jean-Louis	Chirurgie vasculaire ; Médecine vasculaire
	GUYETANT Serge	Anatomie et Cytologie pathologiques
	HAÏLOT Olivier	Urologie
	HALIMI Jean-Michel	Thérapeutique ; médecine d'urgence (Néphrologie et Immunologie clinique)
	HERAULT Olivier	Hématologie ; transfusion
	HERBRETEAU Denis	Radiologie et Imagerie médicale
Mme	HOMMET Caroline	Médecine interne, Gériatrie et Biologie du vieillissement
MM.	HUTEN Noël	Chirurgie générale
	LABARTHE François	Pédiatrie
	LAFFON Marc	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence
	LARDY Hubert	Chirurgie infantile
	LASFARGUES Gérard	Médecine et Santé au Travail
	LEBRANCHU Yvon	Immunologie
	LECOMTE Thierry	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
	LEMARIE Etienne	Pneumologie

MM.	LESCANNE Emmanuel	Oto-Rhino-Laryngologie
	LINASSIER Claude	Cancérologie ; Radiothérapie
	LORETTE Gérard	Dermato-Vénérologie
	MACHET Laurent	Dermato-Vénérologie
	MAILLOT François	Médecine Interne
	MARCHAND Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie
	MARRET Henri	Gynécologie et Obstétrique
	MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
	MORINIERE Sylvain	O.R.L.
	MULLEMAN Denis	Rhumatologie
	PAGES Jean-Christophe	Biochimie et biologie moléculaire
	PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, Pharmacologie clinique
	PATAT Frédéric	Biophysique et Médecine nucléaire
	PERROTIN Dominique	Réanimation médicale ; médecine d'urgence
	PERROTIN Franck	Gynécologie et Obstétrique
	PISELLA Pierre-Jean	Ophthalmologie
	QUENTIN Roland	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
	ROBIER Alain	Oto-Rhino-Laryngologie
	ROINGEARD Philippe	Biologie cellulaire
	ROSSET Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	ROYERE Dominique	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
	RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention
	SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
	SALIBA Elie	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
Mme	SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et Médecine Nucléaire
MM.	SIRINELLI Dominique	Radiologie et Imagerie médicale
	THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
Mme	TOUTAIN Annick	Génétique
MM.	VAILLANT Loïc	Dermato-Vénérologie
	VELUT Stéphane	Anatomie
	WATIER Hervé	Immunologie.

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

Mme	LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie	Médecine Générale
-----	---------------------------	-------------------

PROFESSEURS ASSOCIES

MM.	HUAS Dominique	Médecine Générale
	LEBEAU Jean-Pierre	Médecine Générale
	MALLET Donatien	Soins palliatifs
	POTIER Alain	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mmes	ANGOULVANT Theodora	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique : addictologie
	BAULIEU Françoise	Biophysique et Médecine nucléaire
M.	BERTRAND Philippe	Biostatistiques, Informatique médicale et Technologies de Communication
Mme	BLANCHARD Emmanuelle	Biologie cellulaire
	BLASCO Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
M	BOISSINOT Eric	Physiologie
	CORTESE Samuele	Pédopsychiatrie
	DESOUBEAUX Guillaume	Parasitologie et mycologie
Mmes	DUFOUR Diane	Biophysique et Médecine nucléaire
	EDER Véronique	Biophysique et Médecine nucléaire
M.	EHRMAN Stephan	Réanimation médicale
Mmes	FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie	Anatomie et Cytologie pathologiques
	GAUDY-GRAFFIN Catherine	Bactériologie - Virologie ; Hygiène hospitalière
M.	GIRAudeau Bruno	Biostatistiques, Informatique médicale et Technologies de Communication
Mme	GOUILLEUX Valérie	Immunologie
MM.	GUERIF Fabrice	Biologie et Médecine du développement et de la reproduction
	GYAN Emmanuel	Hématologie, transfusion
M.	HOARAU Cyrille	Immunologie

M.	HOURIOUX Christophe	Biologie cellulaire
Mmes	LARTIGUE Marie-Frédérique	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
	LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale ; Pharmacologie clinique
	MACHET Marie-Christine	Anatomie et Cytologie pathologiques
	MARUANI Annabel	Dermatologie
MM.	PIVER Eric	Biochimie et biologie moléculaire
	ROUMY Jérôme	Biophysique et médecine nucléaire in vitro
Mme	SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et Droit de la santé
M.	TERNANT David	Pharmacologie – toxicologie
Mme	VALENTIN-DOMELIER Anne-Sophie	Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière
M.	VOURC'H Patrick	Biochimie et Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFERENCES

Mmes	BOIRON Michèle	Sciences du Médicament
	ESNARD Annick	Biologie cellulaire
M.	LEMOINE Maël	Philosophie
Mme	MONJAUZE Cécile	Sciences du langage - Orthophonie
M.	PATIENT Romuald	Biologie cellulaire

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

Mmes	HUAS Caroline	Médecine Générale
	RENOUX-JACQUET Cécile	Médecine Générale
M.	ROBERT Jean	Médecine Générale

CHERCHEURS C.N.R.S. – INSERM

MM.	BIGOT Yves	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239
	BOUAKAZ Ayache	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
Mmes	BRUNEAU Nicole	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
	CHALON Sylvie	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
MM.	COURTY Yves	Chargé de Recherche CNRS – U 618
	GAUDRAY Patrick	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239
	GOUILLEUX Fabrice	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239
Mmes	GOMOT Marie	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
	HEUZE-VOURCH Nathalie	Chargée de Recherche INSERM – U 618
MM.	LAUMONNIER Frédéric	Chargé de Recherche INSERM - UMR CNRS-INSERM 930
	LE PAPE Alain	Directeur de Recherche CNRS – U 618
Mmes	MARTINEAU Joëlle	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
	POULIN Ghislaine	Chargée de Recherche CNRS – UMR CNRS-INSERM 930

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

Mme	DELORE Claire	Orthophoniste
MM.	GOUIN Jean-Marie	Praticien Hospitalier
	MONDON Karl	Praticien Hospitalier
Mme	PERRIER Danièle	Orthophoniste

Pour l'Ecole d'Orthoptie

Mme	LALA Emmanuelle	Praticien Hospitalier
M.	MAJZOUB Samuel	Praticien Hospitalier

Pour l'Ethique Médicale

Mme	BIRMELE Béatrice	Praticien Hospitalier
-----	------------------	-----------------------

REMERCIEMENTS

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre
et méprisé de mes confrères

SOMMAIRE

Résumé.....	2
Abstract.....	3
Remerciements.....	8
Sommaire	11
Liste des figures	13
Liste des tableaux	15
Introduction.....	16
Généralités	18
I. Généralités sur le VIH	18
I.1 Structure du VIH	18
I.2 Organisation génomique	19
I.1 Cycle réplicatif du VIH.....	20
I.3 Physiopathologie de l'infection et notion de tropisme	24
II. Rappels sur le traitement antirétroviral	29
II.1 Les inhibiteurs de la transcriptase inverse	29
II.2 Les inhibiteurs de la protéase (IP)	30
II.3 Les inhibiteurs d'intégrase	31
II.4 Les inhibiteurs de fusion	31
II.5 Les inhibiteurs de CCR5	31
III. VIH et atteintes neurologiques	33
III.1 Rappel sur les manifestations opportunistes touchant le système nerveux central	33
III.2 Manifestations neurologiques dues au VIH	38
IV. Données sur la compartimentation.....	42
IV.1 Notions de diversité, divergence, compartiment, réservoir et sanctuaire	42
IV.2 Différents réservoirs et compartiments	45

IV.3	Méthodes d'étude de la compartimentation, importance du SGA.....	54
Travail personnel		58
I.	Objectif	58
II.	Matériels et méthodes	60
II.1	Patients et méthodes	60
II.2	Prélèvements disponibles et conservation des prélèvements :.....	62
II.3	Détermination de la charge virale:.....	62
II.4	Extraction de l'ARN viral et synthèse d'ADNc:	62
II.5	Méthode du SGA appliquée à l'amplification du gène env de l'enveloppe complète	63
II.6	Séquençage de l'ADN amplifié	70
II.7	Détermination du tropisme.....	73
II.8	Analyses de diversité et de divergence	73
II.9	Analyse phylogénétique	74
III.	Résultats.....	75
III.1	Amplification génique et choix de la dilution d'ADNc permettant de réaliser le SGA	75
III.2	Amplification génique par SGA et séquençage du gène env complet.....	76
III.3	Analyse de la diversité génétique et de la divergence entre les variants viraux des deux compartiments	76
III.4	Prédiction du tropisme viral par Geno2Pheno.....	77
III.5	Description des arbres phylogéniques	78
Discussion et conclusion.....		85
Bibliographie		90
Annexe		95

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1: Structure du VIH-1.....</i>	<i>18</i>
<i>Figure 2 : Structure du génome viral.....</i>	<i>20</i>
<i>Figure 3: Cycle de réplication du VIH décomposé en deux phases</i>	<i>21</i>
<i>Figure 4: Structure tridimensionnelle de la gp 120</i>	<i>22</i>
<i>Figure 5: Les étapes de l'entrée du VIH dans les cellules cibles.....</i>	<i>23</i>
<i>Figure 6: Classification des variants viraux en fonction de l'utilisation préférentielle de CCR5 ou de CXCR4 comme co-récepteur d'entrée dans la cellule cible, définissant le tropisme viral</i>	<i>25</i>
<i>Figure 7: Composition en acides aminés et séquence de la boucle V3</i>	<i>26</i>
<i>Figure 8: Les trois stades de l'infection à VIH.....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 9: Cycle de réplication virale et sites d'action des différentes molécules ARV.....</i>	<i>30</i>
<i>Figure 10: Méningite à cryptocoque</i>	<i>34</i>
<i>Figure 11: Toxoplasmose cérébrale</i>	<i>35</i>
<i>Figure 12: Kyste intratissulaire de Toxoplasma gondii rompu à l'état frais.</i>	<i>35</i>
<i>Figure 13: Lymphome cérébral primitif.....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 14: LEMP.....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 15: IRM d'un patient atteint de complexe démentiel associé au SIDA.....</i>	<i>39</i>
<i>Figure 16: Variabilité du VIH-1.....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 17: Critères phylogénétiques définissant le réservoir viral, le compartiment par rapport à un non réservoir d'après Nickel, et al.²⁶</i>	<i>44</i>
<i>Figure 18: Représentation des différents réservoirs du VIH.....</i>	<i>46</i>
<i>Figure 19: Distribution des distances génétiques moyennes obtenues par comparaison par paires selon le modèle de Kimura d'après Avettand-Fenoel, et al</i>	<i>47</i>

<i>Figure 20: Arbre phylogénétique représentant les variants viraux issus du lait maternel et du plasma pour un patient de l'étude de Salazar, et al.</i>	<i>48</i>
<i>Figure 21: Transmission du VIH au niveau de l'épithélium endocervical, immunité innée et activation des cellules cibles, les lymphocytes T CD4+</i>	<i>49</i>
<i>Figure 22: Arbre phylogénétique représentant les variants viraux génitaux, plasmatiques et ceux qui sont issus de PBMCs pour le patient 13 de l'étude de Bull, et al.....</i>	<i>50</i>
<i>Figure 23: Différents modes d'entrée du VIH-1 dans le SNC selon Kramer-Hämmerle.....</i>	<i>51</i>
<i>Figure 24: Diversité en acide aminés de la boucle V3 des populations virales dérivant du LCR et du plasma.....</i>	<i>52</i>
<i>Figure 25: Comparaison de séquences obtenues pour la boucle V3 du gène env entre LCR et plasma.....</i>	<i>53</i>
<i>Figure 26: Les différentes étapes du clonage moléculaire</i>	<i>55</i>
<i>Figure 27 Schéma récapitulatif des différentes étapes du SGA</i>	<i>64</i>
<i>Figure 28: Positions nucléotidiques des amorces pour la PCR nichée SGA sur le génome du VIH et du fragment amplifié attendu.....</i>	<i>66</i>
<i>Figure 29: Analyse électrophorétique des produits d'amplification après PCR nichée d'ADNc dilué à des concentrations différentes.....</i>	<i>68</i>
<i>Figure 30: Analyse électrophorétique des produits d'amplification obtenus après PCR nichée à partir de la dilution d'ADNc choisie. 96 puits sont réalisés.....</i>	<i>69</i>
<i>Figure 31: Position des amorces de séquençage sur le gène env du VIH1</i>	<i>71</i>
<i>Figure 32: Exemple d'électrophorégramme obtenu après séquençage sous Sequencing Analysis® v.5.2 Patch 2 Applied Biosystems®</i>	<i>72</i>
<i>Figure 33: Exemple d'alignement des séquences nucléotidiques sous BIOEDIT et création d'une séquence « contig » enregistrée sous mode fas.</i>	<i>72</i>
<i>Figure 34: Prédiction du tropisme viral en soumettant une séquence « contig » obtenue au logiciel Geno2Pheno.....</i>	<i>73</i>
<i>Figure 35: Représentation de la dilution sélectionnée pour le SGA en fonction de la CV pour chacun des prélèvements testés de plasma et de LCR.....</i>	<i>75</i>
<i>Figure 36: Nombre de séquences obtenues par patient dans chacun des compartiments.....</i>	<i>76</i>
<i>Figure 37: Alignement en AA de la séquence "A11" X4 obtenue sur Geno2Pheno.....</i>	<i>78</i>

<i>Figure 38: Arbre phylogénique représentant les séquences du patient A.....</i>	<i>79</i>
<i>Figure 39: Arbre phylogénique représentant les séquences du patient B.....</i>	<i>81</i>
<i>Figure 40: Arbre phylogénique représentant les séquences du patient C.....</i>	<i>82</i>
<i>Figure 41: Arbre phylogénique représentant les séquences du patient D.....</i>	<i>84</i>

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 Score CHARTER proposé par Letendre, et al et modifié en 2010.</i>	<i>32</i>
<i>Tableau 2: Caractéristiques des patients inclus dans l'étude (données cliniques)..</i>	<i>60</i>
<i>Tableau 3: Caractéristiques des patients inclus dans l'étude. Données sur les prélèvements du plasma et du LCR, la composition du LCR, le diagnostic neurologique et le traitement ARV..</i>	<i>61</i>
<i>Tableau 4: Caractéristiques des amorces de la PCR SGA et de la PCR de séquençage.....</i>	<i>66</i>
<i>Tableau 5: Valeurs estimées des diversités génétiques dans le sang et dans le LCR, de la divergence entre variants des deux compartiments.....</i>	<i>77</i>

INTRODUCTION

Le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) appartient à la famille des *Retroviridae*, agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).

Ce virus est actuellement responsable d'une pandémie. On compte 33,3 millions de personnes infectées par le VIH dans le monde en 2009 (Onusida 2010) avec 2,6 millions de personnes nouvellement infectées et 1,8 millions de décès liés au SIDA.

Deux espèces sont connues à ce jour, le VIH-1 responsable de la pandémie actuelle et le VIH-2 essentiellement retrouvé en Afrique de l'Ouest. Le VIH-1 est divisé en quatre groupes : M, O, N et P. Le groupe M, groupe majeur comprend lui-même neuf sous-types : A-D, F-H, J et K. Les sous-types sont capables de se recombiner, donnant naissance à des formes recombinantes ou Circulating Recombinant Forms (CRF).

En plus de la multiplicité des sous-types du VIH-1 au niveau mondial, on retrouve une variabilité génétique importante à l'échelle de l'individu. Ainsi chez un même sujet infecté, divers variants viraux génétiquement proches sont détectés. On parle de « quasi-espèces » virales.

Le VIH est responsable d'une infection chronique débutant par une phase de primo-infection. C'est à ce stade où sont constitués les réservoirs viraux. La primo-infection est suivie par une phase de latence clinique où l'organisme tente de maintenir un contrôle immunitaire. Malgré l'activation du système immunitaire, la réplication virale se poursuit avec parallèlement une destruction progressive des lymphocytes T CD4+. Lorsque le taux de CD4 a considérablement baissé, et plus fréquemment lorsqu'il est inférieur à 200/mm³, des manifestations opportunistes peuvent survenir. Le patient entre alors dans un stade SIDA.

Des troubles neurologiques peuvent survenir à divers stades de l'infection à VIH. Lors de la primo-infection, le VIH, virus neurotrope, est capable de donner une symptomatologie aspécifique de type méningite aigüe. Au stade SIDA où le système immunitaire est profondément détruit, des manifestations opportunistes peuvent survenir, dont certaines peuvent être révélées par des troubles neurologiques, notamment la cryptococcose cérébrale,

la toxoplasmose cérébrale, le lymphome cérébral primitif, la leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP). C'est à ce stade que peut apparaître l'encéphalite à VIH ou complexe démentiel associé au SIDA.

Le système nerveux central (SNC) est un organe cible du VIH à part entière. Il est envahi par le virus, tôt au moment de la primo-infection et constitue un réservoir viral. Les cellules infectées par le VIH dans le SNC sont les macrophages périvasculaires et les cellules de la microglie qui expriment à leur surface la molécule CD4 ainsi que le co-récepteur CCR5 préférentiellement. La pression immune sélective exercée par les anticorps neutralisants anti-VIH ainsi que les cellules T cytotoxiques est moindre dans le SNC ¹², expliquant la possibilité d'une réplication virale autonome. Des variants viraux aux caractéristiques géno- et phénotypiques différentes sont retrouvés, décrivant parfois une compartimentation du liquide-céphalorachidien (LCR) par rapport au plasma en phylogénie.

Rechercher une compartimentation chez un virus aussi diversifié nécessite un outil moléculaire capable d'isoler finement chacun des variants présents au sein de la population virale. Le clonage viral était la méthode la plus couramment utilisée pour isoler et caractériser des clones dans une population virale. Actuellement, une technique plus récente, le « Single genome amplification » (SGA) ou amplification de génomes uniques est en train de supplanter la précédente. Il s'agit d'une méthode de PCR (Polymerase Chain Reaction) en dilution limite.

L'objectif de notre travail était de mettre au point la technique du SGA au sein du laboratoire de virologie au CHRU Bretonneau de Tours. Nous avons appliqué cette technique suivie d'un séquençage pour l'analyse phylogénétique des variants viraux provenant du LCR et du plasma de quatre patients VIH+ atteints de diverses pathologies neurologiques. Une compartimentation entre LCR et plasma a été recherchée chez chacun de ces patients. Nous nous sommes interrogés s'il existait un lien entre les diverses affections neurologiques observées et la présence d'une compartimentation dans le SNC.

GENERALITES

I. GENERALITES SUR LE VIH

I.1 Structure du VIH

Le VIH est un virus enveloppé de la famille des *Retroviridae*. Comme les autres rétrovirus, il possède une enzyme caractéristique, la rétrotranscriptase (RT ou TI). Celle-ci lui permet de rétrotranscrire son génome en ADN viral et de l'intégrer dans l'ADN chromosomique de la cellule hôte.

On distingue deux types de VIH, le VIH 1 et le VIH 2, génétiquement distincts, dont l'homologie est de l'ordre de 50% au niveau des protéines internes et de l'ordre de 39% au niveau des glycoprotéines d'enveloppe.

Le VIH-1 à l'état de particule virale est un virus de 90 à 120 nm de diamètre.

Il comprend trois structures : l'enveloppe externe, la matrice et la capside (**Figure 1**).

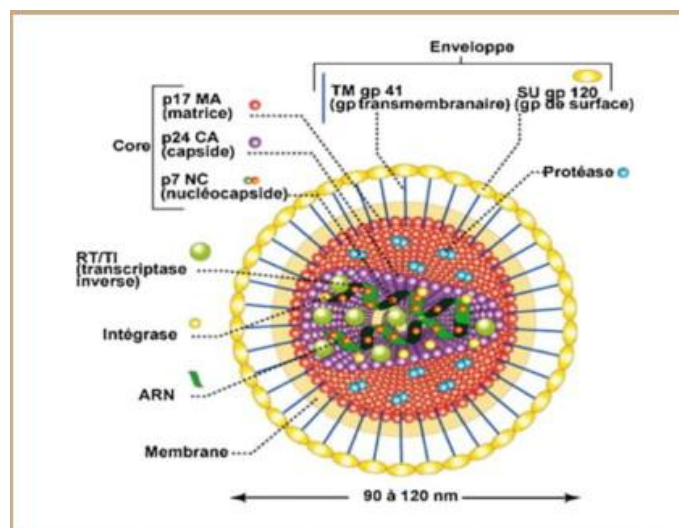


Figure 1: Structure du VIH-1. Le virus est constitué d'une enveloppe externe et d'un core comprenant la matrice, la capside et la nucléocapside. La capside renferme le génome viral.³

- L'enveloppe externe est constituée d'une bicouche lipidique formée à partir de la membrane cellulaire de la cellule hôte infectée, au moment du bourgeonnement du virus, et de deux glycoprotéines virales. La glycoprotéine transmembranaire gp41 enchâssée dans la membrane est liée par des liaisons non covalentes à la sous unité de surface gp120 pour former des trimères d'hétéro-dimères qui correspondent aux spicules visibles à la surface du virus en microscopie électronique.
- Située en regard de la face interne de l'enveloppe, la matrice est formée par la polymérisation de la protéine de matrice p17, elle renferme la protéase virale p11 et entoure la capside virale.
- La capside virale est constituée de la protéine de capside p24. Elle renferme le génome viral constitué de deux brins d'ARN monocaténares de polarité positive, auxquels est associée la protéine de nucléocapside p7.

I.2 Organisation génomique

Le génome du VIH-1 sous forme d'ADN proviral double brin a une longueur d'environ 9,8 Kb.

Comme les autres rétrovirus, il est constitué de trois régions *gag*, *pol*, et *env* codant respectivement pour les protéines de structure interne (matrice, capside, nucléocapside), les enzymes nécessaires à la réplication virale (la protéase, l'intégrase et la transcriptase inverse) et un précurseur gp160 qui après clivage donne naissance aux deux glycoprotéines (gp) d'enveloppe gp120 et gp41 (**Figure 2**).

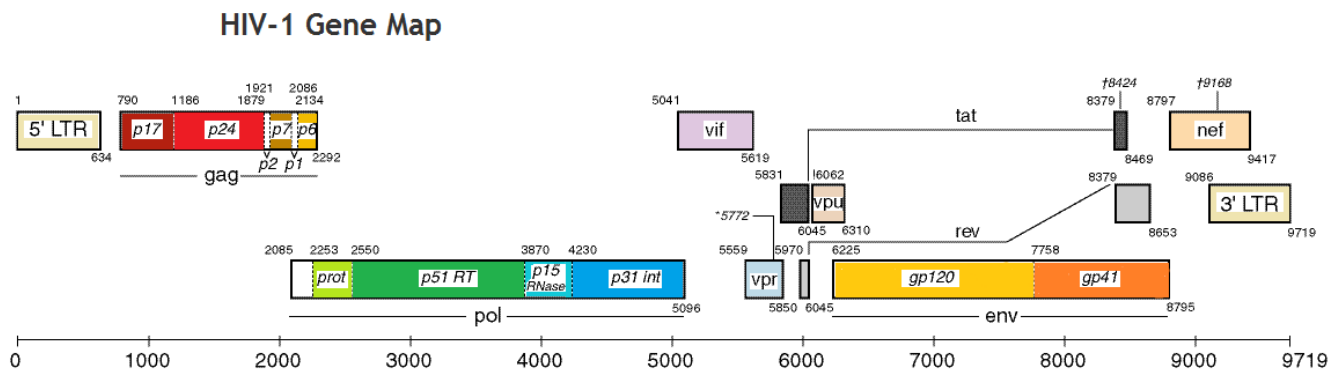


Figure 2 : Structure du génome viral. Le génome est constitué de trois régions *gag*, *pol* et *env*.⁴

Ce génome a la particularité de présenter à chacune de ses extrémités une séquence répétée inversée LTR, pour *long terminal repeat*. Les régions LTR jouent un rôle essentiel dans l'intégration de l'ADN proviral dans le génome de la cellule hôte et dans la transcription du VIH. La région LTR de l'extrémité 5' contient le promoteur ainsi que les signaux de régulation de la transcription, celle de l'extrémité 3' contient les signaux de terminaison de la transcription et de polyadénylation. Il existe 6 gènes viraux supplémentaires (*Tat*, *Rev*, *Vif*, *Vpr*, *Vpu*, *Vpx*, *Nef*). Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans la régulation de la transcription des gènes viraux et dans l'infectivité du virus.

I.1 Cycle réplcatif du VIH

La réplication du VIH a lieu dans plusieurs tissus et liquides biologiques (ganglions lymphatiques, tissu lymphoïde associé au tube digestif, cerveau, sang, sécrétions génitales etc.) dans lesquels on retrouve les cellules cibles du VIH.

Le cycle réplcatif comporte deux grandes étapes (**Figure 3**). La première étape est la pénétration du virus dans la cellule hôte suivie de l'intégration au sein du génome cellulaire de l'ARN viral rétrotranscrit en ADN double brin. La deuxième étape comprend la transcription, l'expression du génome viral, l'assemblage des particules virales et va conduire à la libération de nouveaux virion par la cellule hôte.

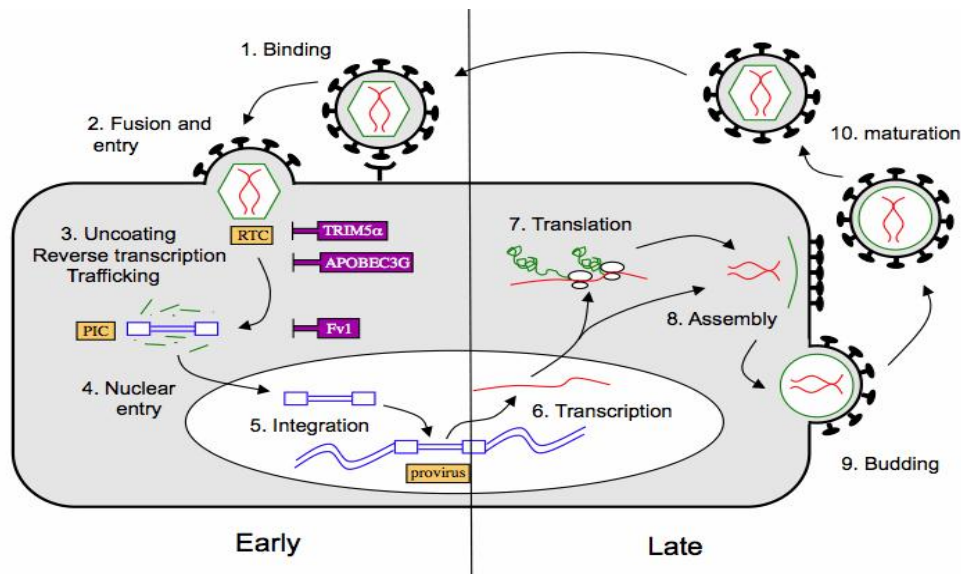


Figure 3: Cycle de réplication du VIH décomposé en deux phases. La phase précoce comprend la liaison aux récepteurs cellulaires, la fusion des membranes, l'entrée du virus, la libération du contenu de la capsid, la rétrotranscription de l'ARN génomique en ADN proviral puis l'intégration. La phase tardive comprend la transcription et la traduction en protéines structurales et enzymatiques, l'assemblage, la formation de nouvelles particules virales. RT= reverse transcription complex; PIC= pre-integration complex. ⁵

▪ Phase précoce

L'entrée du virus nécessite la fixation de la glycoprotéine gp120 au récepteur cellulaire CD4 présent à la surface des cellules cibles du VIH, il s'agit d'une liaison de haute affinité. Cependant cette reconnaissance n'est pas suffisante pour l'entrée du virus dans la cellule. Cette interaction induit un changement conformationnel de la gp120 qui permet l'exposition du site de fixation aux corécepteurs de cette protéine dont les deux corécepteurs majeurs sont les récepteurs aux chimiokines CCR5 et CXCR4. La gp120 possède une structure tridimensionnelle, notamment grâce à l'existence de boucles formées par des ponts disulfures. La séquence nucléotidique de la gp120 est constituée de 5 régions conservées (de C1 à C5) intercalées entre 5 régions hypervariables (de V1 à V5), les régions V1, V2, V3 étant très exposées à la surface. Le site de liaison au co-récepteur est situé principalement au niveau de la boucle V3 et du pont de liaison entre deux domaines de la gp 120, les domaines interne et externe (**Figure 4**).

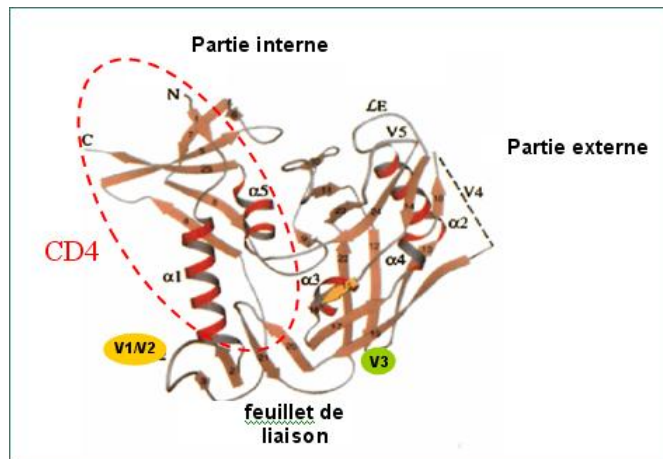


Figure 4: Structure tridimensionnelle de la gp 120. Les domaines hypervariables V1, V2, V3 sont situés au niveau de la face externe de la molécule. La gp 120 comporte deux parties, interne et externe reliée par un feuillet de liaison. La boucle V3 et le feuillet de liaison forment le domaine de liaison au co-récepteur (CCR5 ou CXCR4) ⁶

Les molécules CCR5 et CXCR4 ont pour fonction habituelle de reconnaître des chimiokines. La molécule CXCR4 exprimée à la surface de diverses cellules est reconnue par les variants à tropisme lymphotrope T CD4+, cette reconnaissance permet une réplication dans des lignées de cellules T CD4+. La molécule CCR5 est exprimée essentiellement à la surface des macrophages et des lymphocytes T mémoire. Elle est utilisée comme corécepteur par les VIH-1 T lymphotropes mais aussi par les virus monocytophages. Selon le corécepteur qu'ils utilisent pour pénétrer dans la cellule cible, les virus sont appelés virus R5, X4 voire R5X4 si l'utilisation des deux corécepteurs est requise.

L'interaction du site de fixation aux corécepteurs avec son corécepteur induit un nouveau changement conformationnel impliquant la glycoprotéine transmembranaire gp41 (**Figure 5**). Il induit l'exposition du domaine externe de la gp41 contenant un peptide de fusion qui pourra entrer en contact avec la membrane cellulaire et s'y ancrer. La fusion entre l'enveloppe et la membrane cellulaire de la cellule hôte a alors lieu, aboutissant à la pénétration de la capsid virale dans le cytoplasme de la cellule hôte.

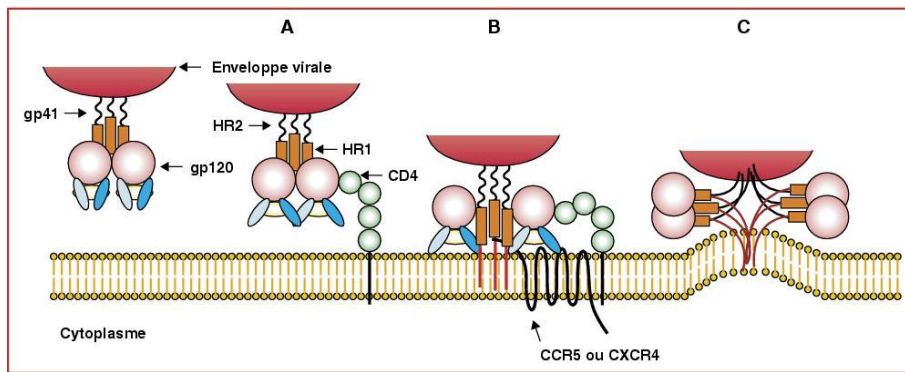


Figure 5: Les étapes de l'entrée du VIH dans les cellules cibles. (A) La liaison de la gp 120 au récepteur CD4 sur la membrane cellulaire induit un changement conformationnel exposant le site de liaison du co-récepteur de la gp120. (B) Liaison de la gp120 au co-récepteur (CCR5 ou CXCR4) et exposition du peptide de fusion gp41 qui s'enchâsse dans la membrane cellulaire. (C) Changement de conformation des régions HR1 et HR2 de gp41, fusion complète des deux membranes⁷.

L'ARN viral libéré dans le cytoplasme, associé à des protéines de capsid, va être rétrotranscrit en un brin d'ADN complémentaire par la transcriptase inverse (TI). L'ARN viral est alors dégradé par la TI et un second brin d'ADN est synthétisé, aboutissant à la synthèse d'un ADN double brin. Celui-ci, associé au complexe de pré-intégration comprenant l'intégrase, la TI et la matrice, est importé dans le noyau puis intégré dans le génome de la cellule hôte grâce à l'intégrase virale. Il est alors appelé ADN proviral.

- Phase tardive

L'étape suivante conduit à la synthèse de nouvelles particules virales et dépend du type et de l'état de la cellule infectée. L'ADN proviral est transcrit en ARN par l'ARN polymérase II de l'hôte. Le taux de synthèse des ARN viraux et le niveau de synthèse des protéines virales au cours de l'infection sont sous le contrôle de la protéine de régulation virale *Tat*. La protéine *Rev* régule le transfert des ARN messagers viraux du noyau vers le cytoplasme ainsi que l'épissage de ces ARN en différents ARN messagers codant pour les protéines constitutives du virus et les protéines de régulation. Les ARN messagers multi-épissés codant pour les protéines de régulation *Tat*, *Rev* ainsi que pour la protéine accessoire *Nef* sont ainsi les premiers à être synthétisés.

La protéine *Rev* va ensuite restreindre le transfert du noyau vers le cytoplasme des ARNm multi-épissés au profit des ARNm peu et non épissés traduits en protéines virales de structure.

Le gène *Env* est traduit en un précurseur Env gp160. Celui-ci est clivé par une protéase cellulaire en deux protéines d'enveloppe gp120 et gp41 qui sont ensuite assemblées en complexes trimériques d'hétérodimères. La traduction des gènes *gag* et *pol* conduit à la synthèse d'un précurseur polyprotéique Gag-Pol qui après clivage par la protéase virale donne naissance aux protéines constitutives internes du virus (protéines de matrice, capsid et nucléocapside) ainsi qu'aux trois enzymes virales (TI, intégrase et protéase). Cette étape importante, indispensable à la production de nouveaux virions est appelée maturation.

Les protéines régulatrices, l'ARN génomique lié à la TI ainsi que l'intégrase sont encapsidés. De nouvelles particules virales peuvent alors bourgeonner à la surface de la cellule en empruntant une partie de la membrane plasmique où sont enchâssées les trimères gp120/gp41. Ainsi libérées dans le milieu extérieur, elles pourront infecter de nouvelles cellules hôtes.

I.3 Physiopathologie de l'infection et notion de tropisme

Le VIH se transmet par échanges de fluides biologiques (sang, fluides sexuels) par voie sexuelle (80% des infections), par voie sanguine (20% des infections). La transmission mère-enfant est prédominante dans les pays à forte prévalence de l'infection chez les femmes (continent africain).

A l'échelle mondiale, l'infection VIH-1 s'acquiert majoritairement par voie sexuelle au niveau des muqueuses génitale ou anale, site d'entrée principal du virus. Le virus présent dans les sécrétions va franchir la barrière épithéliale et infecter les cellules cibles des muqueuses. Les cellules infectées sont des cellules du système immunitaire muqueux telles que les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaire, dont la sous population de lymphocytes T CD4⁺ mémoires, les cellules présentatrices d'antigène (CPA) comprenant macrophages, cellules dendritiques (CD) et cellules de Langherans. Secondairement, après diffusion systémique du virus, les cellules microgliales du cerveau pourront également être infectées.

I.3.1 Tropisme viral et importance de la boucle V3

Le tropisme viral correspond à la capacité du VIH à infecter différentes populations de cellules, selon que ces cellules expriment le ou les corécepteurs CCR5 ou CXCR4 (**Figure 6**). On distingue ainsi les souches virales en fonction de leur capacité à utiliser l'un ou l'autre des corécepteurs, voire les deux. Les virus R5 utilisent le corécepteur CCR5 et sont non inducteurs de syncytia *in vitro* (Non Syncytium Inducing ou NSI). Les virus utilisant le corécepteur CXCR4, très cytopathogènes, nommés virus X4 sont capables d'induire la formation de syncytia *in vitro* (Syncytium Inducing ou SI). Il existe des virus R5X4 utilisant les deux corécepteurs.

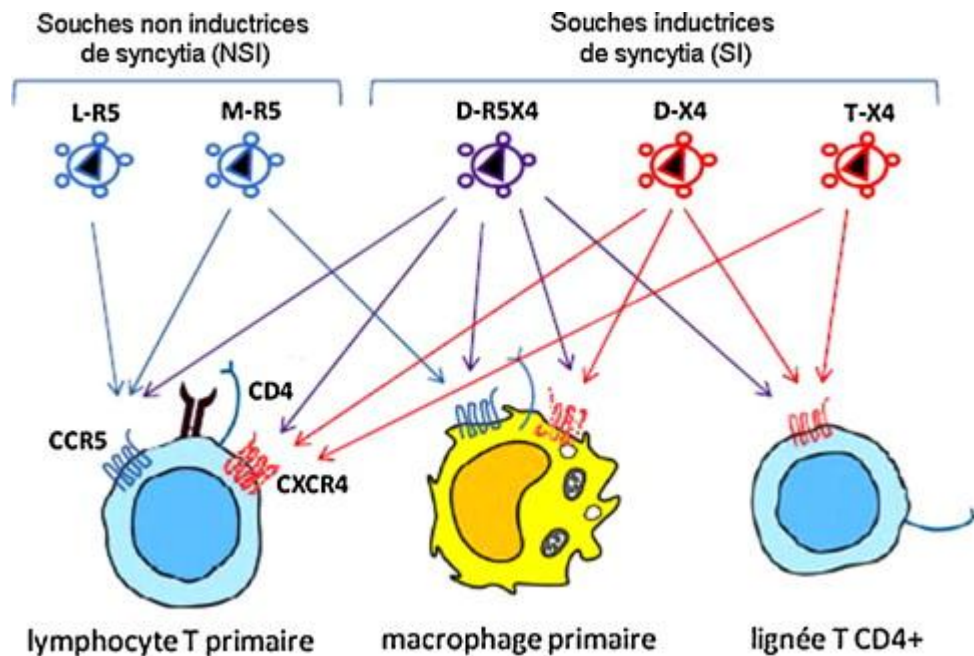


Figure 6: Classification des variants viraux en fonction de l'utilisation préférentielle de CCR5 ou de CXCR4 comme co-récepteur d'entrée dans la cellule cible, définissant le tropisme viral⁸.

Les virus R5 sont préférentiellement transmis par voie sexuelle et sont retrouvés lors de la phase aiguë de l'infection. Des conversions phénotypiques R5-X4 vont progressivement apparaître au cours de l'évolution de la maladie. Les virus X4 sont isolés essentiellement chez des patients au stade clinique de SIDA. La boucle variable V3 de la gp120 joue un rôle essentiel dans le tropisme viral, des modifications dans sa séquence protéique vont

permettre au virus de passer d'un tropisme R5 vers un tropisme X4. Sa structure tertiaire a pu être étudiée par cristallographie⁹. A sa base, elle est constituée d'un pont disulfure créé par deux résidus cystéine conservés en position 296 et 331¹⁰ (**Figure 7**). Elle comporte 35 acides aminés (AA) où se succèdent un site de glycosylation, un segment intermédiaire en épingle à cheveux où se situent les résidus 11 et 25, et un segment C-terminal. La proximité spatiale des résidus 11 et 25 joue un rôle dans l'interaction avec le co-récepteur. La boucle V3 de la gp120 est un déterminant majeur du tropisme viral. Par exemple, la présence d'un acide aminé basique en position 306 et 320 de la boucle V3, correspondant aux résidus 11 et 25, est fortement corrélée à une utilisation préférentielle du co-récepteur CXCR4^{11 12}.

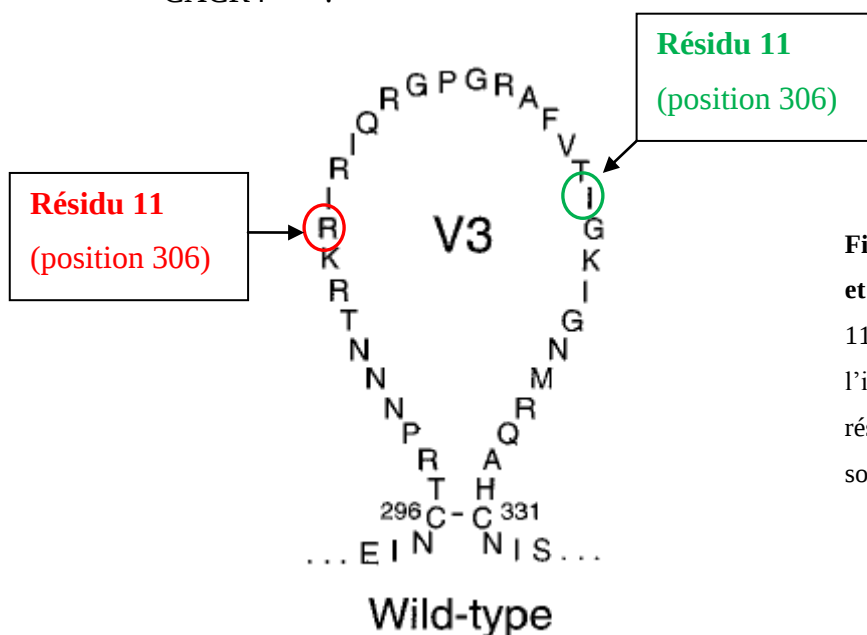


Figure 7: Composition en acides aminés et séquence de la boucle V3. Les résidus 11 et 25 jouent un rôle important dans l'interaction avec le corécepteur. Les résidus cystéines en position 296 et 331 sont conservés¹⁰.

I.3.2 Physiopathologie de l'infection

Après pénétration du virus à travers les muqueuses génitale ou digestive, le VIH gagne les cellules cibles et s'y réplique. Il sera ensuite transporté via les cellules dendritiques et lymphocytes T CD4+ mémoires jusqu'aux organes lymphoïdes. Les virions transportés par les CD sont présentés aux cellules lymphoïdes ganglionnaires. Une réplication intense a alors lieu au sein du tissu lymphoïde, libérant dans le plasma de nouveaux virions, suivie d'une forte déplétion des cellules T CD4+, en particulier au niveau du tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale. L'infection par le VIH est une infection chronique résultant d'une

infection rapide des tissus lymphoïdes où a lieu une réplication constante du virus, constituant des réservoirs viraux.

On distingue trois phases lors de l'infection par le VIH (**Figure 8**):

- La primo-infection

Après contamination, la primo-infection s'accompagne d'une réplication intense du virus dans les organes lymphoïdes avec des titres élevés de virus plasmatique s'accompagnant d'une diminution plus ou moins importante du nombre de lymphocytes CD4⁺ circulants ainsi qu'une déplétion des lymphocytes T CD4⁺ de la muqueuse intestinale. Une réponse cellulaire T CD8⁺ suit le pic de virémie. Cette phase clinique peut être asymptomatique ou être accompagnée de signes cliniques aspécifiques de type syndrome pseudo-grippal ou syndrome mononucléosique.

La réponse immune cellulaire est mise en jeu pour contrôler cette réplication virale, la charge virale plasmatique sera en partie contrôlée mais le nombre de lymphocytes T CD4⁺ remonte sans jamais atteindre son taux de départ.

- La phase de latence clinique

Pendant la phase de latence clinique, la réplication virale semble rester stable ainsi que le nombre de lymphocytes CD4⁺ qui tend cependant à diminuer progressivement. La durée de cette phase est variable selon les individus. On distingue les progressseurs rapides à l'opposé des sujets asymptomatiques à long terme chez qui cette phase peut durer plus de dix ans. En réalité durant cette phase, la réplication virale est active au sein des organes lymphoïdes où survient une détérioration anatomique et fonctionnelle progressive. Il y a équilibre entre taux de réplication virale, élimination des lymphocytes T CD4⁺ infectés et renouvellement des lymphocytes T CD4⁺ dans les organes lymphoïdes durant cette phase.

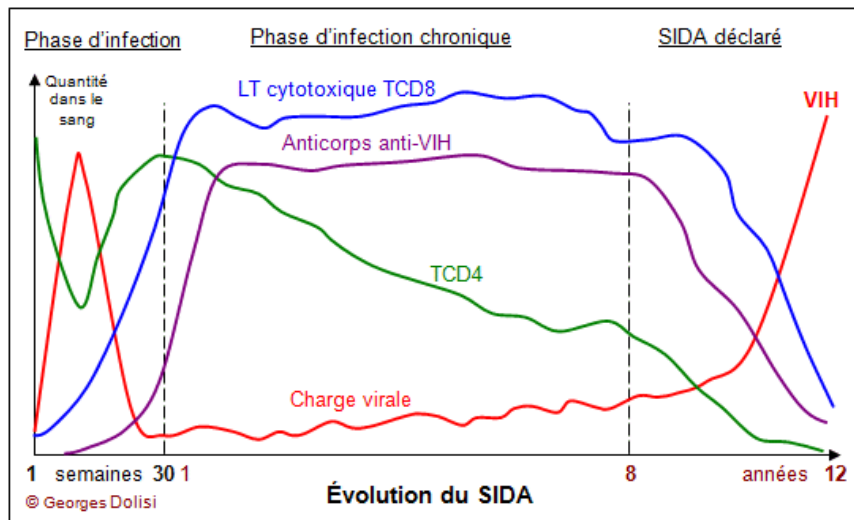


Figure 8: Les trois stades de l'infection à VIH. Lors de la primo-infection, le virus se réplique intensément. Parallèlement, le nombre de lymphocytes T CD4+ diminue dans le sang. La réponse immunitaire de l'organisme va permettre de réduire la charge virale, le nombre de CD4+ remonte sans toutefois revenir au niveau de départ. Le patient est au stade de latence clinique. Lorsque cet équilibre est rompu, la charge virale augmente avec une baisse importante du nombre des lymphocytes T CD4+, la patient atteint alors le stade SIDA.¹³

- Phase SIDA

A une phase tardive de l'infection, la réponse immune ne contrôle plus l'infection. On observe une augmentation de la charge virale suivie par une chute rapide du nombre de lymphocytes T CD4+. Lors de cette phase peuvent survenir des maladies opportunistes infectieuses ou des complications tumorales pouvant entraîner le décès rapide du patient en l'absence de traitement antirétroviral.

II. RAPPELS SUR LE TRAITEMENT ANTIRETROVIRAL

Les avancées en matière de thérapeutique de l'infection à VIH sont, depuis sa découverte, considérables. L'infection chronique peut aujourd'hui être contrôlée grâce à des antirétroviraux (ARV) efficaces et relativement bien tolérés. La stratégie thérapeutique actuelle est basée sur l'association de trois ARV pour limiter l'émergence de variants viraux résistants. D'après des données récentes sur le rôle délétère de la réplication virale qui induit une activation immunitaire chronique, le traitement ARV est introduit de plus en plus précocément ($< 500 \text{ CD4/mm}^3$, Rapport Yeni 2010) et ce, même en l'absence de manifestation clinique d'immunodépression. Le suivi thérapeutique repose sur la quantification de la charge virale plasmatique et la valeur absolue du nombre de lymphocytes T CD4+. L'objectif thérapeutique est de réduire au plus tôt et au maximum la charge virale plasmatique, afin d'obtenir une charge indétectable, témoin d'un contrôle de la réplication virale. Les comprimés combinant deux voire trois ARV en une prise quotidienne sont utilisés préférentiellement.

On compte aujourd'hui plus d'une vingtaine d'ARV appartenant à cinq classes thérapeutiques (**Figure 9**).

II.1 Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

II.1.1 Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI)

Ce sont des prodrogues qui nécessitent une triphosphorylation intracellulaire pour être actifs. Ils agissent comme inhibiteurs compétitifs des nucléotides naturels et sont incorporés dans le brin d'ADN proviral synthétisé par la TI. L'absence de groupement OH en 3' dans leur structure empêche la TI d'ajouter un nouveau nucléotide à l'ADN proviral synthétisé, ce qui entraîne un arrêt prématuré de l'élongation. Ces analogues nucléos(t)idiques sont également des inhibiteurs de l'ADN polymérase mitochondriale d'où une toxicité mitochondriale possible se manifestant par des myopathies, lipoatrophies, neuropathies périphériques, pancréatites, acidose lactique.

II.1.2 Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI)

Ils inhibent la TI de manière non compétitive en se fixant dans une poche hydrophobe proche du site actif de la TI. Ce sont des inhibiteurs puissants et sélectifs de la TI, inactifs sur le VIH-2, ne nécessitant pas de phosphorylation préalable pour être actifs. Ils ont un métabolisme quasi-exclusivement hépatique.

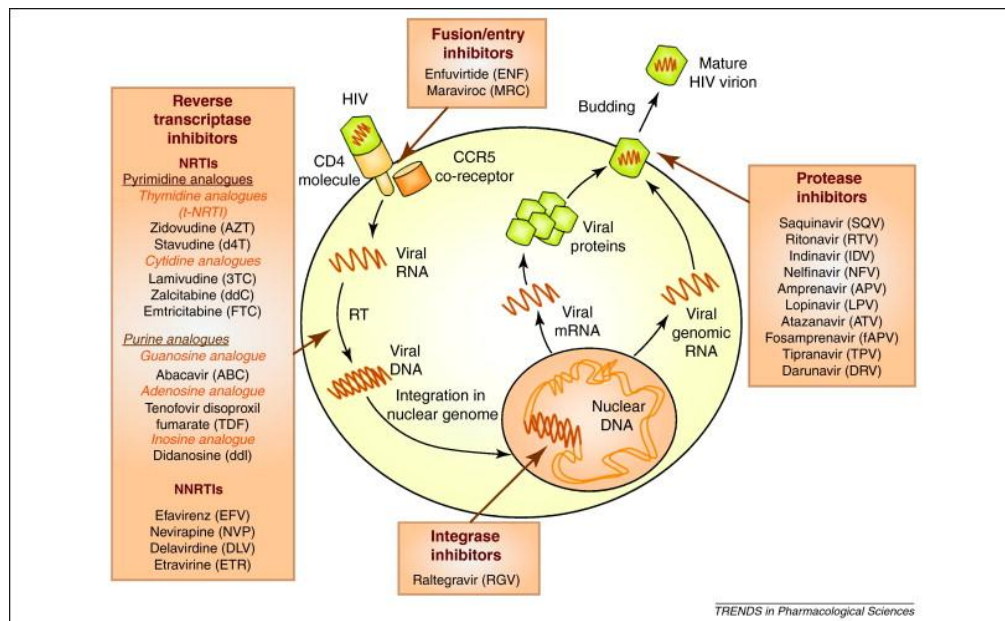


Figure 9: Cycle de réplication virale et sites d'action des différentes molécules ARV.¹⁴

II.2 Les inhibiteurs de la protéase (IP)

Ils interviennent pendant la phase tardive de la maturation, au moment de l'assemblage des protéines virales. Ils vont inhiber la protéase en se liant de façon compétitive au site actif. La protéase devient alors incapable de cliver les polypeptides précurseurs produits des gènes *gag* et *pol*, le clivage de ces précurseurs étant nécessaire à la maturation des protéines de structure et des enzymes virales. L'inhibition de la protéase conduit à la production de virions immatures et incapables d'infecter de nouvelles cellules.

Métabolisés par le cytochrome P450, les inhibiteurs de la protéase sont à l'origine de nombreuses interactions médicamenteuses.

Plus récemment, il a été développé des inhibiteurs de protéase boosté par le ritonavir. Une faible dose de ritonavir inhibe le cytochrome P450, permettant d'augmenter la concentration plasmatique et le temps de demi-vie de l'IP.

II.3 Les inhibiteurs d'intégrase

L'intégration du VIH dans le génome de la cellule hôte comprend 3 étapes. Une première étape de « 3'-processing », puis la formation du complexe de préintégration et enfin une étape de transfert de brins. Les inhibiteurs de l'intégrase bloquent cette dernière étape, l'ADN viral non intégré est alors dégradé.

II.4 Les inhibiteurs de fusion

Les inhibiteurs de fusion se lient à la gp41 et bloquent la fusion virus/cellule par inhibition compétitive.

II.5 Les inhibiteurs de CCR5

Petites molécules hydrophobes, ils agissent sur le corécepteur CCR5 de la cellule cible du virus en se liant aux poches hydrophobes à l'intérieur des hélices transmembranaires ¹⁵. Il y a alors modification de conformation du co-récepteur qui n'est plus reconnu par la gp120, empêchant ainsi la pénétration du virus dans la cellule CD4+. L'utilisation de cette classe thérapeutique requière la détermination du tropisme du VIH du patient. En effet, chez les patients présentant un virus à tropisme X4 majoritaire ou à tropisme mixte X4/R5, leur action est atténuée voire nulle. Les effets secondaires de cette molécule sont pour l'instant mal connus mais la tolérance semble bonne. L'absorption est bonne, le volume de distribution important. Les inhibiteurs de CCR5 sont indiqués dans le traitement de l'infection par le VIH-1 à tropisme uniquement CCR5 chez l'adulte prétraité par ARV. Ce traitement nécessite donc une analyse de tropisme viral préalable.

Le choix du traitement antirétroviral se fait en prenant en compte les paramètres d'efficacité, de tolérance, d'acceptabilité et de coût. En première ligne on associe deux INTI et un INNTI ou un IP « boosté ». Un échec virologique évalué sur la quantification de la charge virale plasmatique doit amener à rechercher une mauvaise observance en premier lieu. En cas d'échec virologique avéré, il faut se baser sur les tests génotypiques de résistance aux ARV, le traitement ARV antérieur, la tolérance et l'évolution clinique pour proposer une nouvelle thérapeutique.

Pour un patient présentant une encéphalopathie à VIH, on va utiliser préférentiellement des ARV à bonne diffusion dans le LCR. La pénétration des ARV dans le système nerveux central est évaluée par le score CHARTER (Central Nervous System HIV Antiretroviral Therapy Effects Research) proposé par l'équipe de Letendre, *et al.*¹⁶, modifié en 2010 à la CROI¹⁷. Chaque molécule reçoit un score entre 1 et 4 (**Tableau 1**).¹⁷ Les chiffres obtenus sont additionnés pour calculer le score de pénétration de la combinaison des molécules. Un score CHARTER bas est associé à une charge virale détectable dans le LCR et à une baisse de la réponse antirétrovirale. La zidovudine (INTI), la nevirapine (INNTI) et l'indinavir (IP) sont des ARV à très bonne diffusion dans le LCR. Le maraviroc présente également des propriétés intéressantes dans cette indication puisque les cellules cibles du VIH dans l'atteinte du SNC, les cellules microgliales et les macrophages, expriment majoritairement le co-récepteur CCR5.

Table 1.	4	3	2	1
INTI	Zidovudine	Abacavir	Didanosine	Tenofovir
		Emtricitabine	Lamivudine	Zalcitabine
			Stavudine	
INNTI	Nevirapine	Delavirdine	Etravirine	
		Efavirenz		
IP	Indinavir-r	Darunavir-r	Atazanavir-r	Nelfinavir
		Fosamprenavir-r	Atazanavir	Ritonavir
		Indinavir	Fosamprenavir	Saquinavir-r
		Lopinavir-r		Saquinavir
				Tipranavir-r
Inhibiteur fusion/entrée		Maraviroc		Enfuvirtide
Inhibiteurs intégrase		Raltegravir		

Tableau 1 Score CHARTER proposé par Letendre, *et al* et modifié en 2010.¹⁵

III. VIH ET ATTEINTES NEUROLOGIQUES

Les complications neurologiques survenant au cours de l'infection par le VIH sont fréquentes et peuvent toucher le patient à tout stade de la maladie. Le SNC, le système nerveux périphérique (SNP) ou le muscle peuvent être atteints¹⁸. Une infection opportuniste à l'origine des troubles neurologiques doit être recherchée systématiquement avant d'attribuer les signes cliniques au VIH directement. Une toxicité médicamenteuse aux antirétroviraux doit également être évoquée.

III.1 Rappel sur les manifestations opportunistes touchant le système nerveux central

III.1.1 Tableau de céphalées

- Méningite à cryptocoque

Elle est due à *Cryptococcus neoformans*. Elle réalise un tableau de céphalées accompagnées de signes cliniques aspécifiques, à type de fièvre, nausées chez un sujet sévèrement immunodéprimé (taux de lymphocytes T CD4+ <200/mm³). L'IRM est souvent normale. La ponction lombaire rapporte une protéinorachie modérément élevée, une hypoglycorachie, une lymphocytose à la formule. Le diagnostic de cryptococcose repose sur l'examen direct avec une coloration à l'encre de Chine (**Figure 10**), la culture et la recherche de l'antigène cryptococcique dans le sang et le LCR. Le traitement comprend de l'Amphotéricine B IV éventuellement associée au 5-Fluoro-Uracile puis un relais par Fluconazole.

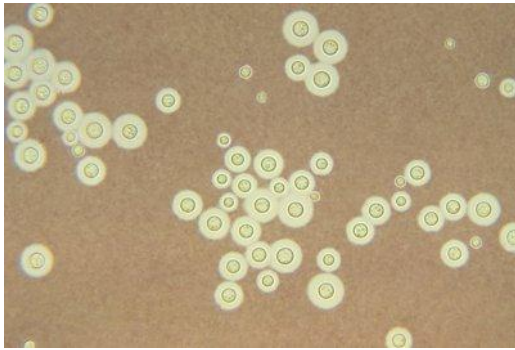


Figure 10: Méningite à cryptocoque. Multiples levures encapsulées à l'examen direct avec coloration à l'encre de Chine¹⁷

- Autres méningites : listériose, tuberculose, syphilis.

Les autres causes de méningites retrouvées sur terrain d'immunodépression doivent également être évoquées.

III.1.2 Syndrome neurologique focal

- Toxoplasmose cérébrale

Il s'agit de la plus fréquente des infections du SNC au cours de l'infection à VIH causée par un parasite *Toxoplasma gondii*, dont les kystes présents dans l'organisme sont réactivés lors de l'effondrement immunitaire dû au VIH (**Figure 12**). La toxoplasmose cérébrale survient lorsque le taux de lymphocytes T CD4⁺ est inférieur à 100/mm³ et peut être un mode de révélation de l'infection à VIH. Classiquement, elle réalise un tableau fébrile d'installation rapidement progressive associé à des céphalées, des signes neurologiques focaux en fonction de la localisation de l'abcès, des crises convulsives. Un syndrome confusionnel, des signes d'hypertension intracrânienne peuvent également être observés. D'autres formes cliniques telles que l'encéphalite toxoplasmique ou l'abcès médullaire sont parfois rencontrées. L'IRM révèle une image en cocarde prenant le contraste, localisée au niveau des noyaux gris centraux ou des lobes frontaux correspondant à l'abcès cérébral (**Figure 11**). La PCR dans le LCR a une très bonne spécificité mais une sensibilité faible (50 à 62.5%). Le diagnostic de certitude repose sur la PCR sur biopsie cérébrale, rarement effectuée. Le traitement repose sur l'association pyriméthamine-sulfadiazine.

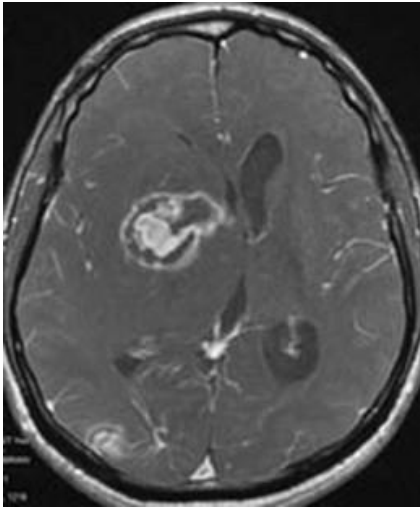


Figure 11: Toxoplasmose cérébrale. Sur l'IRM, coupe axiale T1 après injection. Processus expansif nécrotique hétérogène profond prenant le contraste. Important effet de masse. Lésion sous-corticale occipitale droite associée¹⁸

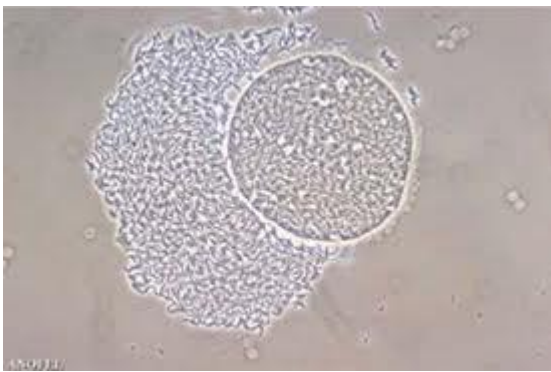


Figure 12: Kyste intratissulaire de Toxoplasma gondii rompu à l'état frais. Le kyste contient plusieurs milliers de bradyzoïtes et peut libérer les toxoplasmes par rupture¹⁷

- Le lymphome primitif du SNC

Le développement de la tumeur se traduit par des signes neurologiques insidieux et peu spécifiques. Les manifestations cliniques sont diverses telles que syndrome confusionnel, céphalées, troubles mnésiques, crises d'épilepsies. L'IRM montre des lésions multiples mal limitées prenant le contraste, localisées au niveau du lobe frontal, du noyau caudé ou du cervelet (**Figure 13**).

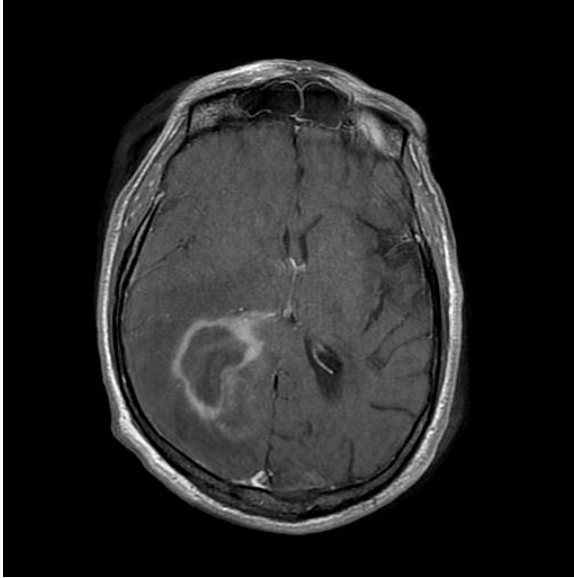


Figure 13: Lymphome cérébral primitif. Sur l'IRM, coupe axiale T1 avec injection de gadolinium. Lésion hypoT1 avec prise de contraste en périphérie¹⁹

- La leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP)

Cette affection démyélinisante du SNC est causée par un polyomavirus, le virus JC. Les signes d'apparition progressive à type de déficit moteur, troubles visuels, crises convulsives voire troubles cognitifs et troubles psychiatriques évoluent vers l'aggravation sans rémission. L'IRM révèle des lésions hypo-intenses T1, hyper-intenses T2 ne prenant pas le contraste, situées au niveau de la substance blanche pariéto-occipitale sous-corticale²² (**Figure 14**). L'étude du LCR par PCR permet de rechercher l'ADN du virus JC, examen qui peut manquer de sensibilité comme pour la toxoplasmose cérébrale. Le diagnostic de certitude reste l'examen histologique d'une biopsie cérébrale du tissu nerveux infecté.

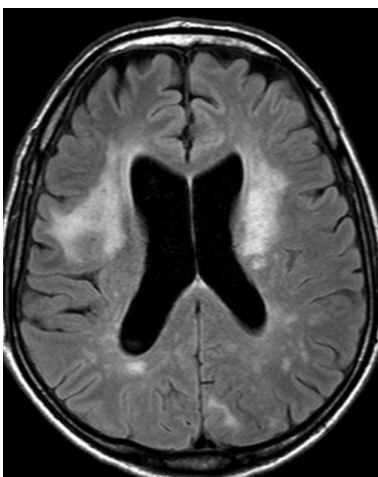


Figure 14: LEMP.Coupe axiale séquence FLAIR à l'IRM. Hypersignaux périventriculaires asymétriques et multifocales, correspondant aux lésions de LEMP²⁰

III.1.3 Tableau d'encéphalite

- Encéphalite à cytomégalo virus (CMV)

L'encéphalite à CMV est généralement due à une réactivation de ce virus et survient lorsque le taux de lymphocytes T CD4⁺ est inférieur à 50/mm³. Elle présente des manifestations diverses, isolées ou associées, diffuses à l'ensemble de l'encéphale ou focales, d'apparition brutale ou subaigue. On peut retrouver des céphalées, un syndrome confusionnel, une atteinte des paires crâniennes, un syndrome de la queue de cheval, un tableau de méningo-radiculo-myélite. La présence d'un tableau multiviscéral avec atteinte rétinienne, pulmonaire ou digestive peut orienter vers le diagnostic. L'IRM révèle une prise de contraste méningée périventriculaire. Le diagnostic repose sur la recherche de l'ADN du CMV par méthode PCR dans le LCR. Le traitement nécessite l'introduction d'un traitement antiviral tel que ganciclovir, foscarnet ou cidofovir.

- Encéphalite à Herpes simplex virus (HSV), à virus varicelle-zona (VZV)

Devant un tableau d'encéphalite brutal, quel que soit le terrain du patient, il faut penser à rechercher une encéphalite causée par ces herpes virus, en particulier par HSV du fait de la gravité du tableau clinique. Le diagnostic étiologique repose sur la détection de l'ADN viral par PCR dans le LCR et le traitement implique l'utilisation de l'aciclovir.

III.1.4 Troubles de la marche

On pourra évoquer une neuropathie débutante, une polymyosite ou une myélopathie vacuolaire. Il faudra éliminer les atteintes médullaires zostériennes, herpétiques, à CMV mais parfois également une toxoplasmose ou un lymphome.

III.2 Manifestations neurologiques dues au VIH

Elles sont diagnostiquées après avoir éliminé les autres causes responsables d'atteinte neurologique au cours de l'infection à VIH, telles que les causes métabolique, infectieuse opportuniste ou tumorale. On distingue les atteintes neurologiques touchant le système nerveux central et celles touchant le système nerveux périphérique.

III.2.1 Atteintes du SCN:

- Les manifestations neurologiques de la primo-infection à VIH

Elles apparaissent 1 à 6 semaines après la contamination et représentent 10 à 15% des primo-infections symptomatiques. On retrouve un syndrome infectieux aspécifique avec fièvre, adénopathies, arthralgies, rash cutané, diarrhées. Les manifestations neurologiques sont variées telles que syndrome méningé, encéphalite, paralysie faciale, syndrome de Guillain-Barré, neuropathie périphérique, myélopathie. Elles peuvent s'accompagner d'un syndrome mononucléosique et disparaissent en quelques semaines.

- L'encéphalopathie à VIH ou complexe démentiel associé au SIDA ou « HIV-Associated Dementia » (HAD)

L'incidence de cette complication diminue depuis l'introduction du traitement antirétroviral hautement actif ou « Highly active antiretroviral therapy » (HAART). Malgré ce progrès thérapeutique, la population infectée vieillit et la durée d'infection par rapport à la date du diagnostic s'allonge. Ainsi, la prévalence des patients infectés par le VIH présentant une encéphalopathie à VIH est en augmentation. Les données autopsiques rapportent une prévalence de 25% au stade tardif de l'infection²³. Le risque de démence est multiplié par 3,26 % pour un âge supérieur à 50 ans²⁴.

Cette atteinte du SNC apparaît tardivement. Les premiers symptômes sont des troubles de l'attention et de la concentration associés à des troubles mnésiques. Un ralentissement psychomoteur s'installe voire un syndrome dépressif. A un stade plus avancé apparaît un syndrome démentiel de type sous-cortical. Les troubles cognitifs s'associent à des troubles

du comportement (apathie, indifférence affective, isolement), des troubles de l'équilibre, des myoclonies ou crises convulsives. Les diagnostics de complexe cognitif et moteur associé au VIH (HAD) et de trouble cognitivo-moteur mineur du VIH, atteinte légère, reposent sur un ensemble de critères cliniques répertoriés dans les critères opérationnels de l'American Academy of Neurology (AAN) 1991, revus en 1996²⁵ après élimination des autres causes possibles d'atteintes cognitives. L'IRM révèle une atteinte diffuse multifocale sous-corticale de la substance blanche décrivant des hypersignaux en T2 (**Figure 15**). Secondairement, on peut observer une atrophie cortico-sous-corticale. Contrairement à la LEMP, les hyposignaux en T1 sont peu francs. La PL est souvent normale. Une charge virale VIH élevée dans le LCR n'est ni nécessaire ni suffisante pour poser le diagnostic d'encéphalopathie à VIH. Il existe des cas de dissociation de la charge virale dans le sang et le LCR. L'objectif du traitement est de négativer la réplication virale dans le système nerveux central en privilégiant les associations comprenant des molécules passant bien la BHE selon le score CHARTER.

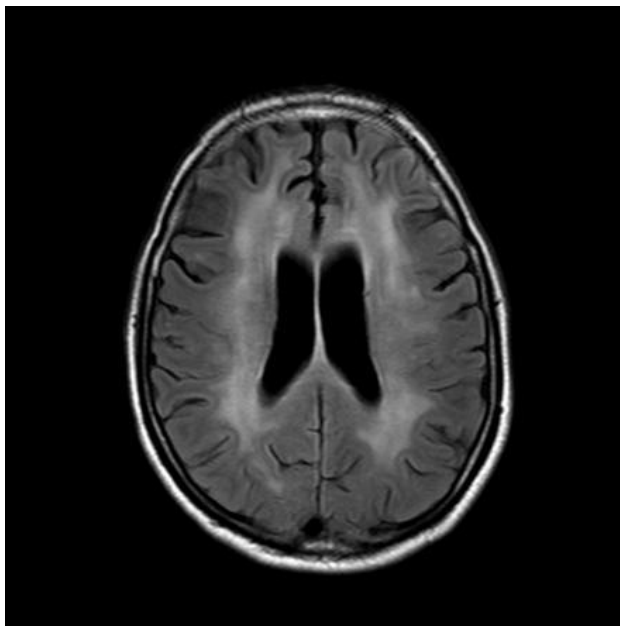


Figure 15: IRM d'un patient atteint de complexe démentiel associé au SIDA.Coupe axiale FLAIR. Hypersignaux T2 diffus et symétriques de la substance blanche, entourant les ventricules latéraux avec atrophie corticale²⁴

- La myélopathie vacuolaire associée au VIH

La myélopathie vacuolaire comprend des manifestations cliniques variées, elle peut être associée à une encéphalopathie à VIH dans le cadre d'un complexe cognitivomoteur associé au VIH. Parfois asymptomatique, elle peut se manifester par un syndrome médullaire frustré, des paresthésies des membres inférieurs. A un stade sévère de la maladie, le sujet peut présenter un déficit moteur des membres inférieurs, un tableau de paraparésie spastique, des troubles sensitifs et des troubles sphinctériens. L'IRM médullaire ainsi que la PL sont souvent normales. Le diagnostic est le plus souvent porté rétrospectivement après étude histologique sur autopsie.

III.2.2 Atteintes du SNP:

Les neuropathies périphériques sont les complications les plus fréquentes lors de l'infection à VIH et peuvent atteindre un taux de 95% au stade SIDA. Leur diagnostic étiologique est difficile, les causes étant nombreuses et parfois intriquées. La iatrogénie est la principale cause retrouvée suivie de l'infection à VIH directement. Il faudra également rechercher une infection à VHC, une infection opportuniste, une hyperlymphocytose à CD8 pouvant être responsables de ces troubles.

Concernant les neuropathies directement liées au VIH, diverses présentations cliniques sont retrouvées :

- La polyneuropathie VIH

La prévalence de la neuropathie à VIH augmente avec le degré d'immunodépression, elle est de 30 à 35% au stade SIDA.

Elle se présente sous forme de neuropathie axonale sensitive touchant les membres inférieurs de façon distale et symétrique. Au stade tardif, le patient peut se plaindre de dyesthésies voire d'allodynie. Une origine médicamenteuse et une carence en vitamine B12 doivent avant tout être éliminées. Le LCR est normal ou montre une discrète hyperprotéinorachie. L'électromyogramme (EMG) est en faveur d'une neuropathie

axonale sensitive avec une dissociation électroclinique. La biopsie neuromusculaire montre une atteinte axonale et un infiltrat inflammatoire.

- Les multineuropathies

Plus rares, les multinévrites s'observent à un stade précoce de l'infection avec une évolution favorable touchant les nerfs périphériques et les nerfs crâniens de manière asymétrique avec systématisation tronculaire. Elles se présentent sous forme de déficit sensitif d'installation brutale et s'accompagnent d'une hyperprotéinorachie et d'une réaction cellulaire dans le LCR. La biopsie neuromusculaire montre un aspect de neuropathie inflammatoire. A un stade tardif, les atteintes sont plus sévères touchant plusieurs nerfs. De façon systématique, il convient de rechercher l'infection à CMV.

- Les polyradiculoneuropathies

Elles surviennent à un stade précoce de l'infection VIH et se présentent comme un syndrome de Guillain-Barré. Le LCR montre une hypercellularité avec hyperlymphocytose (10 à 50 cellules/mm³). Le traitement nécessite plasmaphérèse voire immunoglobulines. On pensera à rechercher avant tout une infection à CMV.

III.2.3 Atteinte musculaire

La myopathie lors de l'infection à VIH peut survenir à tous les stades de la maladie. Le tableau clinique se traduit par un amaigrissement, une polymyosite proximale associant faiblesse musculaire, myalgies. Les enzymes musculaires sont élevées, le tracé EMG est myogène, le diagnostic repose sur la biopsie musculaire. Il faudra avant tout rechercher les autres causes nécessitant une prise en charge spécifique telles que la myopathie d'origine iatrogène (zidovudine notamment) ou secondaire à une infection opportuniste, un lymphome non hodgkinien ou une vascularite.

IV. DONNEES SUR LA COMPARTIMENTATION

IV.1 Notions de diversité, divergence, compartiment, réservoir et sanctuaire

Selon le CNRS, la diversité génétique est la variété qui existe au niveau des gènes de tous les organismes vivants. Elle comprend les caractéristiques des gènes et leur répartition au sein d'une espèce (diversité intra-spécifique) mais aussi entre différentes espèces (diversité inter-spécifique). Elle joue un rôle dans l'évolution car plus une population ou une espèce est diversifiée génétiquement, plus elle a de chances que certains de ses membres arrivent à s'adapter aux modifications survenant dans l'environnement. A contrario, moins la diversité est grande, plus la population ou l'espèce tend à s'uniformiser et moins elle aura de capacité à s'adapter à des conditions d'environnement différentes.

La divergence ou dérive génétique correspond à une évolution génétique différente entre deux populations d'une même espèce par rapport à un ancêtre commun.

La diversité génétique est une caractéristique majeure du VIH dont on connaît 2 types, les VIH-1 et 2 ainsi que de nombreux sous-types et formes recombinantes. La grande capacité d'accumulation de mutations du VIH conduit à la production de multiples variants viraux génétiquement proches au sein d'un même individu, dénommés « quasi-espèces ».

Plusieurs phénomènes concourent à cette variabilité génétique importante (**Figure 16**). La transcriptase inverse qui sert à la rétrotranscription de l'ARN viral en ADNc est une enzyme peu fidèle, à l'origine de nombreuses erreurs d'appariement lors d'une réplication virale intense (10 milliards de virions produits/jour). Lorsqu'une cellule est coinfected par deux virions génétiquement distincts, la transcriptase inverse est capable de « switch », de passer d'un brin d'ARN à l'autre, générant un ADNc recombinant. Il s'agit du phénomène de recombinaison génétique.

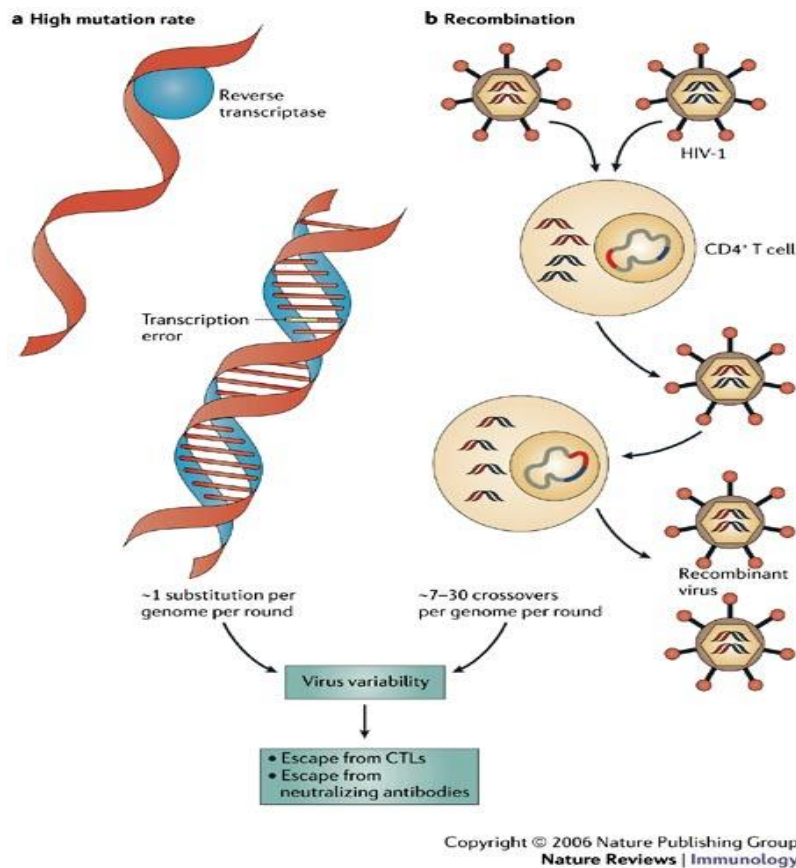


Figure 16: Variabilité du VIH-1. Les causes de la variabilité sont la réplication virale intense, erreurs de la transcriptase inverse, recombinaison génétique²⁷

Un réservoir est un type cellulaire ou tissulaire où la réplication virale est réduite, le virus conserve sa capacité de réplication mais est à l'état de latence pendant une longue durée²⁸. En étudiant la phylogénie des séquences virales issues d'un réservoir, Nickel, *et al.*^{28 29} ont montré que celles-ci présentaient des caractéristiques phylogénétiques distinctes par rapport aux séquences provenant d'un non-réservoir, représenté par le sang périphérique (**Figure 17**). Elles avaient une structure temporelle réduite voire absente, évaluée sur des prélèvements séquentiels réalisés à des temps différents. Les séquences d'un réservoir étaient donc dispersées au sein de l'arbre phylogénétique, partageant des ancêtres communs avec les séquences de plusieurs points de prélèvement, parfois même antérieurs au point de prélèvement du réservoir lui-même. Elles étaient également caractérisées par un haut niveau de diversité puisqu'elles étaient composées de séquences contemporaines et de séquences plus

anciennes. Le niveau de divergence par rapport à l'ancêtre commun était bas du fait de l'absence de réplication.

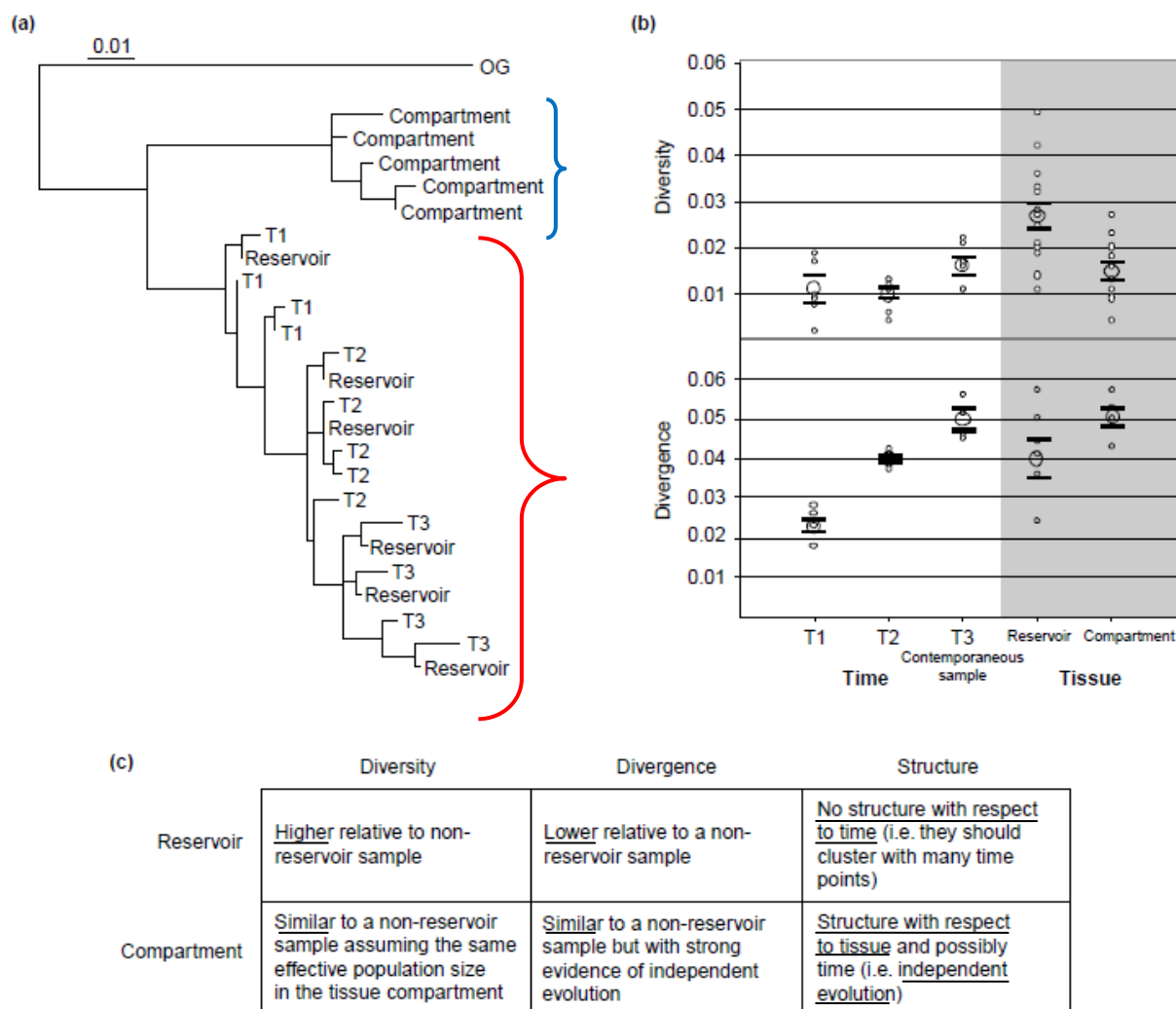


Figure 17: Critères phylogénétiques définissant le réservoir viral, le compartiment par rapport à un non réservoir d'après Nickel, *et al.*²⁸

(a) Arbre phylogénétique constitué à partir de prélèvements plasmatiques réalisés à 3 temps différents. Des séquences d'un compartiment et d'un réservoir hypothétiques obtenues à un temps T3 ont été ajoutées. Les séquences du compartiment (crochet bleu), partagent un seul ancêtre commun avec les séquences du plasma et celles du réservoir. Les séquences du réservoir (crochet rouge) quant à elles partagent plusieurs ancêtres communs avec les séquences plasmatiques, à des temps antérieurs à T3. (b) Représentation graphique statistique de la diversité et de la divergence estimées pour un réservoir, un compartiment et un non-réservoir. (c) Résumé des caractéristiques phylogénétiques d'un réservoir et d'un compartiment.

Un compartiment virologique est un type cellulaire ou tissulaire où il y a restriction de flux génétique viral ²⁹, il constitue un site de réplication virale autonome ³⁰. D'après Nickel, *et al.*, la diversité d'un compartiment était similaire à celle d'un non-réservoir, tout comme la divergence. Il possédait une structure temporelle mais avec une évolution clairement indépendante (**Figure 17**).

Un sanctuaire est une structure anatomique au sein de laquelle la diffusion du médicament est réduite. Il est caractérisé par une diversification qui se poursuit malgré le traitement antirétroviral ²⁸.

Compartiment et réservoir sont deux notions pouvant expliquer la réplication résiduelle du VIH-1 dans certains tissus ou cellules alors même que le taux de charge virale dans le sang est inférieur au seuil de détection sous traitement ARV. Ils participent à l'incroyable diversité du VIH en permettant au virus de se répliquer de manière indépendante à l'abri des thérapies ou de constituer des réserves de cellules infectées à longue durée de vie.

Lors d'une interruption du traitement, il existe un risque de rebond de la réplication virale qui atteint les mêmes taux plasmatiques qu'en pré-thérapeutique. Il est donc important de s'intéresser aux compartiments et réservoirs pour une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'infection à VIH et pour le développement d'une thérapeutique plus efficace contre le virus.

IV.2 Différents réservoirs et compartiments

Au sein d'un réservoir le génome du VIH est gardé en mémoire sous forme d'ADN proviral dans des cellules vivantes des années sans être activées. La production du virus et son relargage sous forme d'ARN par les cellules du réservoir sont faibles mais persistent malgré le traitement ARV qui n'atteint pas le virus. Les compartiments permettent au virus de se répliquer de manière autonome et d'échapper au traitement. Plusieurs réservoirs sont décrits pour le VIH dont le principal est le tissu lymphoïde associé au tube digestif (**Figure 18**). On distingue les réservoirs cellulaires (cellules T4, monocytes, macrophages, cellules

dendritiques) des réservoirs anatomiques (tissu lymphoïde associé au tube digestif, lait maternel, organes génitaux, système nerveux central).

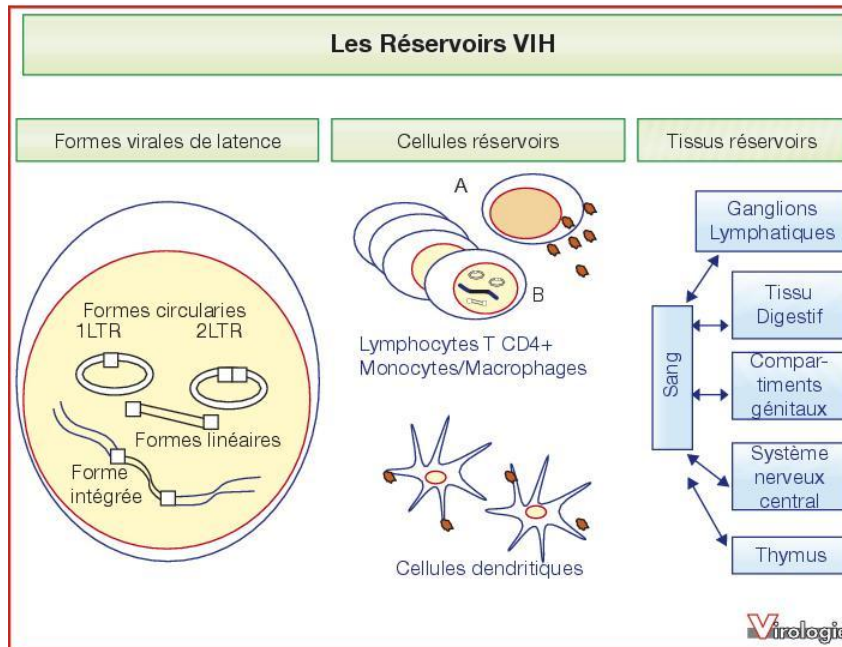


Figure 18: Représentation des différents réservoirs du VIH²⁹

IV.2.1 Tissu lymphoïde associé au tube digestif

Le tissu lymphoïde associé à la muqueuse du tube digestif représente le plus grand réservoir tissulaire du VIH dans l'organisme. Il contient 40 à 60% des lymphocytes de l'organisme et joue un rôle essentiel dans la persistance du VIH malgré un traitement HAART efficace^{32 33}. Le VIH gagne rapidement ce réservoir dès le début de l'infection. Il s'y produit une réplication virale intense à l'origine de lésions de la muqueuse intestinale qui devient plus fragile et susceptible aux infections bactériennes. Il s'en suit une activation du système immunitaire avec un recrutement de lymphocytes T CD4+ favorisant encore plus la multiplication virale.

Chez les patients sans HAART, Avettand- Fenoel, *et al.*³⁴ ont montré que les variants viraux du rectum étaient plus hétérogènes que ceux des cellules mononuclées du sang périphérique ou « peripheral blood mononuclear cells » (PBMC). La diversité était plus élevée chez les

premiers (**Figure 19**). Ce résultat suggérait un échange de populations virales entre le sang et le tube digestif, au niveau du rectum. Le tissu lymphoïde associé au tube digestif semblait produire un environnement favorable à la réplication virale expliquant la différence de diversité observée.

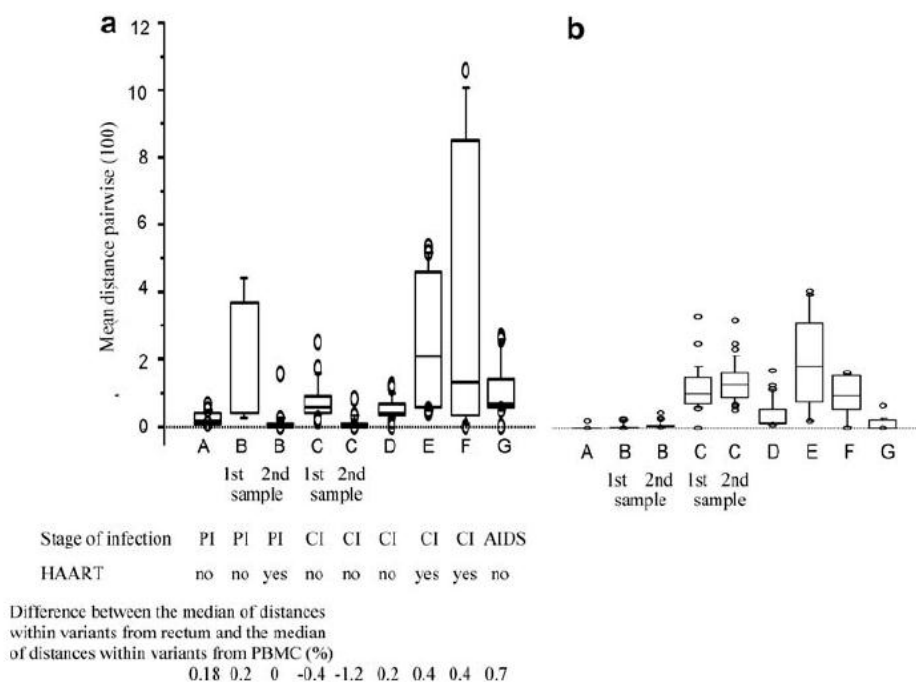


Figure 19: Distribution des distances génétiques moyennes obtenues par comparaison par paires selon le modèle de Kimura d'après Avettand-Fenoel, et al ³⁴. Les variants du rectum (a) et ceux du plasma (b) de 7 patients. A, B, C, D, E, F, G représentent les clones viraux retrouvés chez chacun des 7 patients. Le niveau de diversité est plus hétérogène entre les 7 patients pour les variants du rectum que pour les variants du plasma.

IV.2.2 Sein et lait maternel

La transmission mère-enfant reste le mode de contamination le plus fréquent de l'enfant par le VIH. Cette contamination peut survenir au moment de l'allaitement, par transmission des variants viraux présents dans le lait. La compartimentation a également été recherchée dans le lait maternel par différentes équipes.

Salazar, *et al.* se sont intéressés à la compartimentation du VIH dans le lait maternel par rapport au sang en étudiant le gène *env*, amplifié par SGA et séquencé ³⁵. Des variants

monotypiques étaient plus fréquemment retrouvés dans le lait que dans le sang. Ils présentaient tous un tropisme CCR5. L'entremêlement des séquences de lait maternel avec celles du plasma sur l'arbre phylogénétique ne permettait toutefois pas de conclure à une compartimentation (**Figure 20**). Les variants viraux du lait maternel provenaient probablement d'un apport continuel sanguin suivi d'une répllication locale transitoire dans le compartiment du sein, sans qu'il y eût de compartimentation avérée.

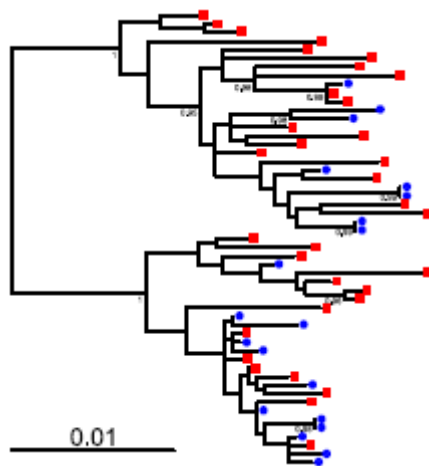


Figure 20: Arbre phylogénétique représentant les variants viraux issus du lait maternel et du plasma pour un patient de l'étude de Salazar, et al. Les séquences de lait (ronds bleus) et de plasma (carrés rouges) sont entremêlées sur le profil, il n'apparaît pas de compartimentation³³

Quant à eux, Gantt, *et al.* ont décrit, par analyse statistique, une compartimentation entre lait maternel et plasma dans 6 cas sur 17 ainsi qu'une plus grande présence de variants monotypiques dans le lait maternel³⁶. Cette compartimentation n'était pourtant pas retrouvée sur l'arbre phylogénétique et n'était pas associée à la présence d'une mastoïdite. La répllication du VIH dans le sein semblait augmenter avec l'inflammation, notamment avec la présence de mastoïdite expliquant la présence de ces variants monotypiques dans le lait maternel.

IV.2.3 Organes génitaux

Plusieurs travaux ont décrit l'existence d'une population virale distincte dans le tractus génital féminin et dans le sperme, capable d'une réplication autonome voire de compartimentation. On comprend bien que l'étude de ces variants viraux est importante pour la bonne compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'infection à VIH puisque la voie de transmission majoritaire à ce jour est une transmission par voie sexuelle (**Figure 21**).

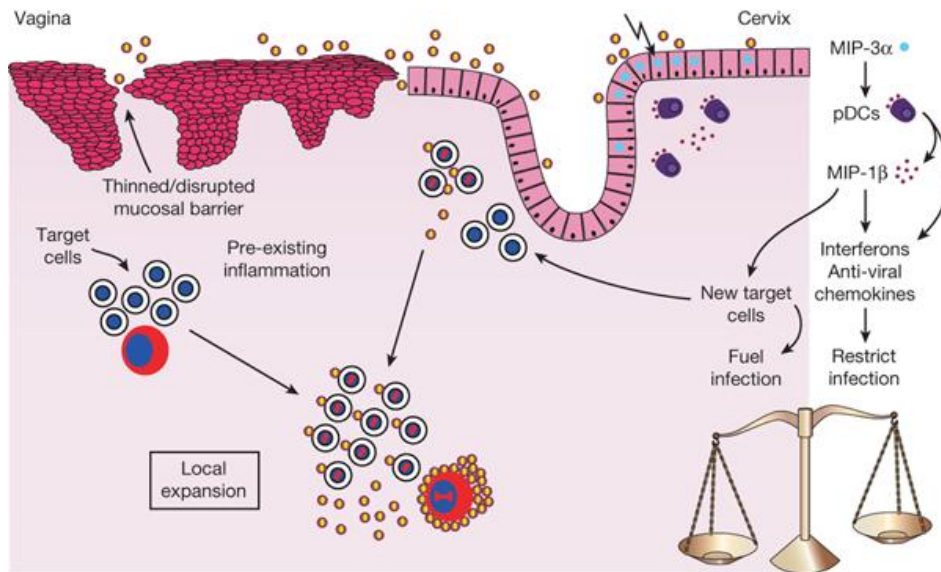


Figure 21: Transmission du VIH au niveau de l'épithélium endocervical, immunité innée et activation des cellules cibles, les lymphocytes T CD4+.³⁷

D'après les travaux de Bull, *et al.*, les variants viraux génitaux obtenus après amplification par SGA et séquençage, présentaient un bas niveau de diversité en faveur d'une compartimentation.³⁸ Malgré une analyse statistique en faveur d'une compartimentation, les séquences provenant du tractus génital féminin étaient dispersées parmi celles plasma sur l'arbre phylogénétique (**Figure 22**). Il semblait qu'une réplication virale accompagnant une prolifération de cellules infectées par le virus était à l'origine de la compartimentation observée.

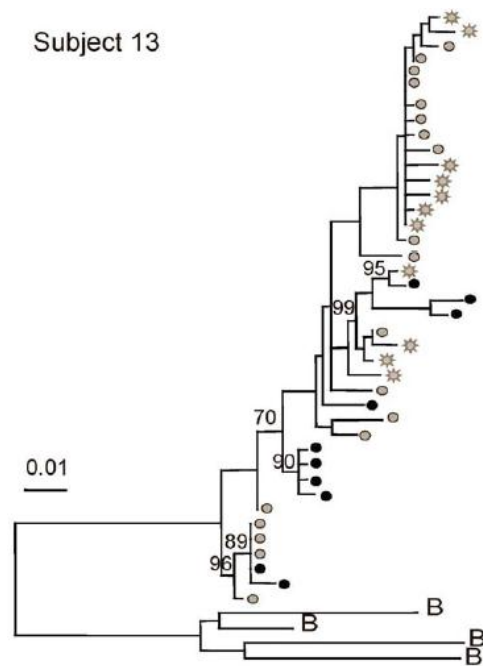


Figure 22: Arbre phylogénétique représentant les variants viraux génitaux, plasmatiques et ceux qui sont issus de PBMCs pour le patient 13 de l'étude de Bull, *et al.*³⁶ Les variants génitaux, plasmatiques et ceux des PBMCs correspondent respectivement aux ronds noirs, ronds gris, étoiles grises. De petits clusters dispersés de variants génitaux monotypiques sont visibles. Cependant ils sont portés par des clades contenant à la fois des variants du plasma et du tractus génital féminin. Il n'apparaît pas de compartimentation.

Sullivan, *et al.* ont montré que la diversité, la divergence et l'évolution du VIH sous forme libre dans les sécrétions cervico-vaginales étaient différentes de celles du VIH dans le plasma³⁹.

Le VIH est donc retrouvé dans plusieurs compartiments. Il suit une évolution propre dans chacun des compartiments. D'un point de vue phylogénétique, cette répliation propre se manifeste par une diversité, une divergence et une répartition au sein de l'arbre phylogénétique, différentes suivant le compartiment étudié. Le SNC, autre réservoir du VIH, comporte des singularités, notamment concernant l'environnement immunologique et les cellules cibles pour le VIH.

IV.2.4 Système nerveux central

Le VIH est un virus neurotrope. Il envahit le cerveau en quelques jours ou semaines après la contamination. Les cellules cibles du VIH-1 lors de l'infection du SNC sont les macrophages ainsi que les cellules microgliales exprimant le récepteur CD4 et le corécepteur CCR5⁴⁰. Les

variants viraux responsables de l'infection du SNC sont donc R5 majoritaires. Ils présentent une réplication virale indépendante et sont capables de s'adapter à ce compartiment. Trois hypothèses ont été proposées pour tenter d'expliquer les mécanismes d'entrée du virus à travers la BHE selon Kramer-Hämmerle, *et al.*⁴¹ (**Figure 23**):

- Le passage à travers la barrière hémato-encéphalique de cellules immunitaires infectées et activées provenant du sang périphérique
- Le franchissement direct de la BHE
- L'infection du plexus choroïde et le relargage du virus par les cellules endothéliales

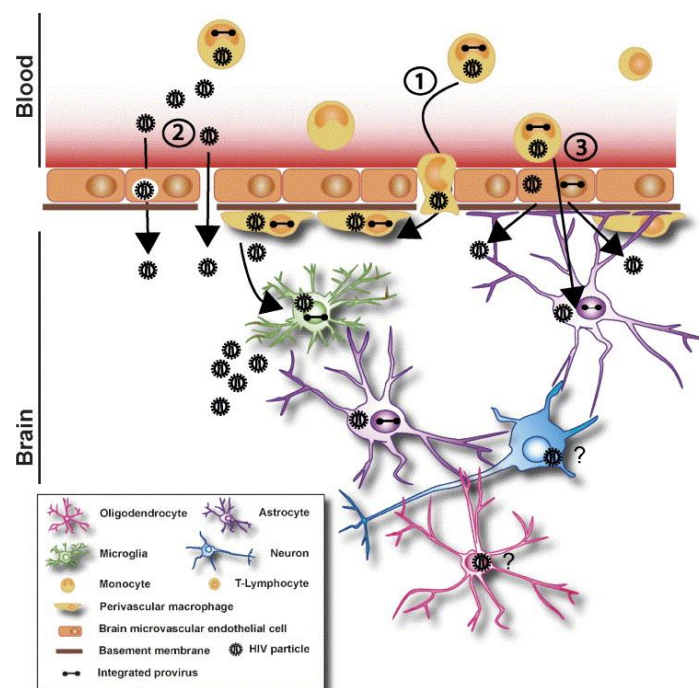


Figure 23: Différents modes d'entrée du VIH-1 dans le SNC selon Kramer-Hämmerle⁴¹. (1) Passage à travers la BHE de cellules infectées, (2) franchissement direct de la BHE par le virus, (3) infection du plexus choroïde et relargage secondaire du virus par les cellules endothéliales.

La présence du virus dans le SNC est à l'origine d'une cascade d'évènements délétères. La réplication du virus dans les macrophages périvasculaires est à l'origine de lésions neuronales survenant par neurotoxicité directe des protéines virales (notamment gp120, Tat et Vpr) mais

également par l'intermédiaire de la réponse inflammatoire locale qui est considérée comme le principal déterminant à l'origine de l'atteinte clinique de l'encéphalopathie liée au VIH.

Les variants du sang périphérique et ceux du LCR présenteraient des caractères phénotypiques différents d'après Pillai, *et al.* Dans cette étude, en s'intéressant uniquement à la boucle V3 du gène *env*, la diversité des séquences du LCR était significativement réduite par comparaison aux séquences sanguines (**Figure 24**).

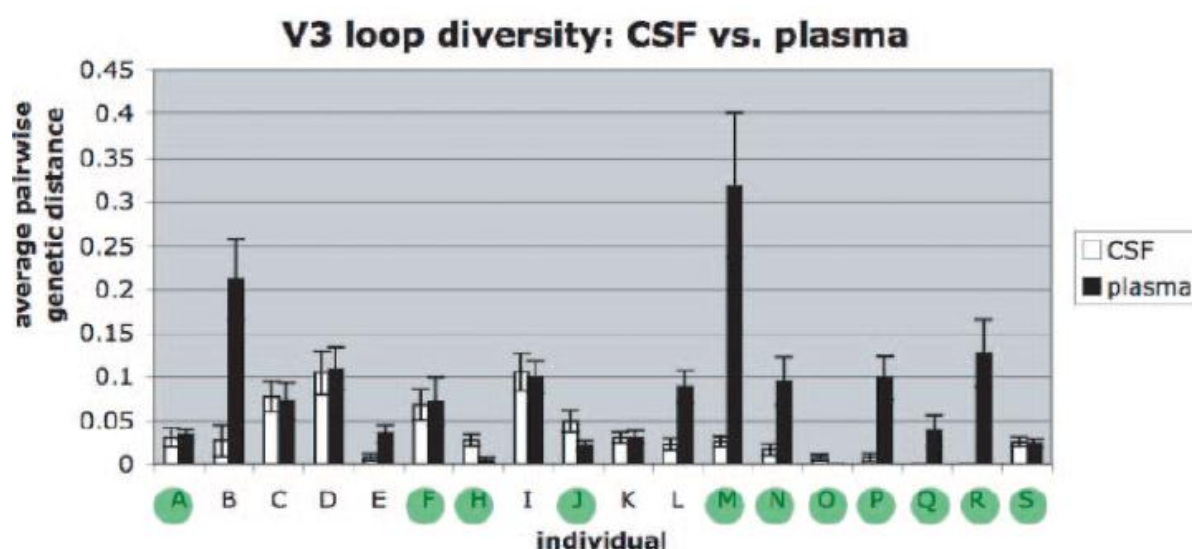


Figure 24: Diversité en acide aminés de la boucle V3 des populations virales dérivant du LCR et du plasma.² La diversité était significativement moins importante que dans le LCR. Les ronds verts correspondent aux patients ayant une compartimentation dans le LCR.

En comparant les séquences de plasma et de LCR de patients présentant une compartimentation du LCR, les auteurs ont montré l'existence d'une signature génétique comprenant les positions 5, 9, 13 et 19 de la boucle V3, ce qui n'était pas vérifié pour les patients sans compartimentation (**Figure 25**). La présence d'une histidine ou d'une proline en position 13 de la boucle V3 était fortement corrélée avec une compartimentation. De plus, le résidu à la position 5 était prédictif d'un déficit neurocognitif (forte corrélation), d'autant plus s'il s'agissait d'une sérine.

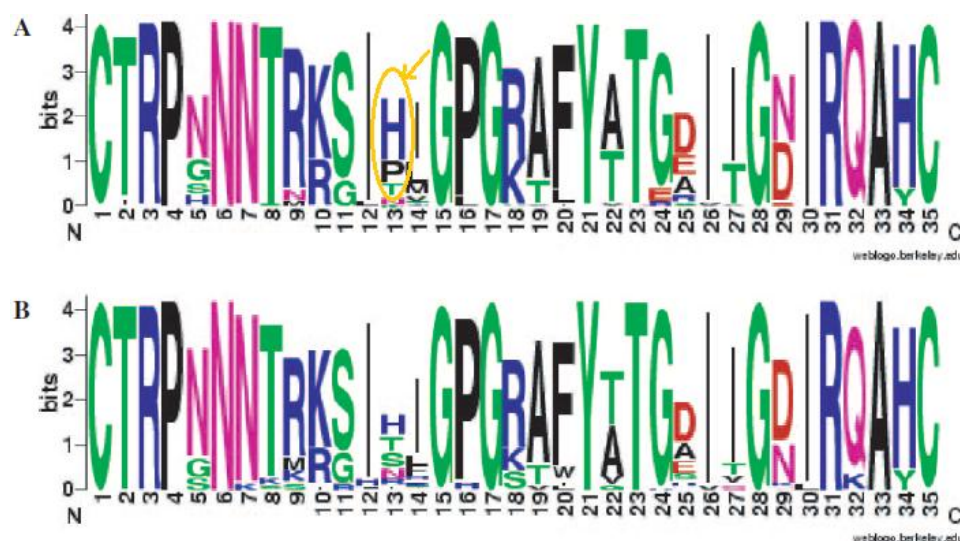


Figure 25: Comparaison de séquences obtenues pour la boucle V3 du gène env entre LCR et plasma.² La partie A correspond aux séquences du LCR, la partie B aux séquences plasmatiques. La taille relative de chacun des acides aminés à une position donnée est le reflet de sa prévalence à cette position. Ainsi en position 13 (entourée par un cercle jaune), la prévalence de la proline et de l’histidine est significativement plus élevée dans le LCR que dans le sang.

Chez ces variants, moins de sites de glycosylation étaient observés dont on sait qu’ils varient en fonction de la pression de sélection exercée par la réponse des anticorps neutralisants. L’activité neutralisante des anticorps était d’ailleurs nettement inférieure dans le LCR que dans le sang.

Ainsi, du fait d’une pression de sélection moins importante dans le SNC, il y a possibilité de réplication autonome dans ce compartiment et de voir l’émergence de variants non sélectionnés par les anticorps neutralisants. De plus, certaines molécules antirétrovirales ne passent pas la BHE et ne permettent pas un contrôle optimal de la réplication virale dans le SNC ⁴²⁴³. Une pression thérapeutique différente explique les différences de mutations de résistance aux antirétroviraux observées entre sang et LCR.

Ainsi, de nombreux réservoirs viraux ont été décrits au cours de l'infection au VIH. Les variants viraux les constituant présentent des caractères phénotypiques et génotypiques distincts, une diversité génétique propre à chacun des réservoirs. Ils peuvent constituer un compartiment comme il est clairement décrit dans le SNC. La connaissance de ces réservoirs et compartiments non éradiqués par les traitements actuels est un enjeu majeur dans la compréhension des mécanismes d'échappement et dans la lutte contre la maladie.

IV.3 Méthodes d'étude de la compartimentation, importance du SGA

L'étude de compartimentation requière l'amplification et le séquençage de matériel génétique en grande quantité. Pour le VIH, elle repose sur le séquençage d'un gène d'intérêt. Le séquençage est suivi par une analyse phylogénétique appréciant la complexité des populations du VIH et proposant une analyse de diversité.

Pour amplifier le gène d'intérêt en vue d'une étude de compartimentation, il est important d'employer une technique permettant d'isoler très finement les clones viraux d'une population. Deux méthodes sont actuellement utilisées : le clonage et le SGA.

IV.3.1 Clonage

Le clonage moléculaire a pour première étape la rétrotranscription de l'ARN viral en ADNc. Le gène d'intérêt est ensuite amplifié par une PCR simple ou nichée. Le clonage nécessite la préparation d'un vecteur de clonage qui est un élément génétique capable de réplication autonome. Il s'agit d'un plasmide sélectionné pour porter des gènes de résistance à certains antibiotiques permettant leur reconnaissance. La séquence d'ADNc à amplifier et le vecteur sont digérés par la même enzyme de restriction de façon à générer des extrémités complémentaires (**Figure 26**). Les deux molécules d'ADN sont liées en une seule molécule d'ADN recombinant par une ligase. L'ADN recombinant est ensuite introduit dans une cellule hôte bactérienne (étape de transformation) grâce à un choc thermique ou électrique. La cellule

contenant le plasmide recombinant est mise en culture et va se multiplier, aboutissant à la production de plasmides en grande quantité. Les clones contenant le plasmide recombinant sont sélectionnés par les antibiotiques car porteurs de gènes de résistance. Les plasmides issus du clonage sont digérés par une enzyme de restriction, les produits d'amplification obtenus sont séquencés.

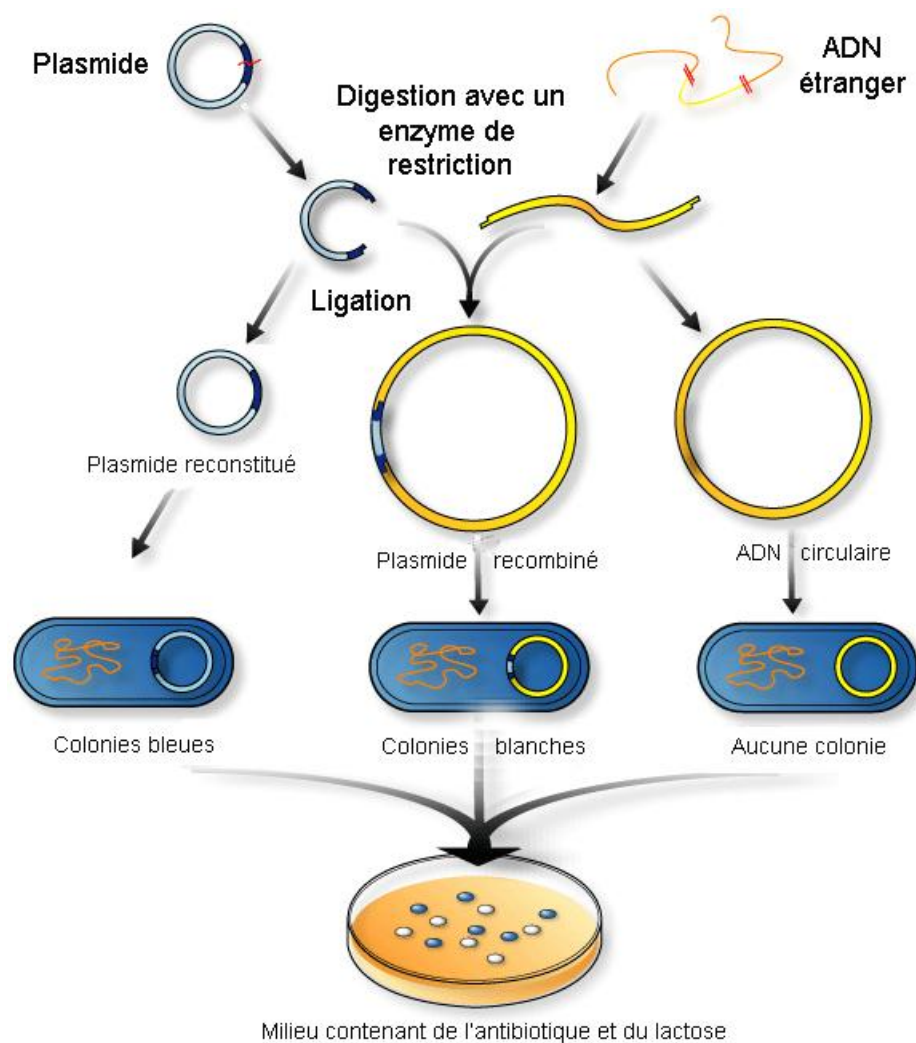


Figure 26: Les différentes étapes du clonage moléculaire. Digestion enzymatique, ligation, construction d'un plasmide recombinant, transformation, mise en culture de la cellule hôte bactérienne et sélection à l'aide d'antibiotiques.⁴⁴

Le clonage présente certains avantages⁴⁵. Il s'agit d'une méthode peu coûteuse qui permet de séquencer des fragments de génome importants, apportant un intérêt aux analyses phylogénétiques. La traduction du gène d'intérêt amplifié aboutit à la production d'une protéine en grande quantité, permettant l'étude de la fonction et de la structure de la protéine. Cependant, l'étape d'amplification par PCR précédant le clonage peut être la source de plusieurs erreurs : les erreurs d'incorporation nucléotidique (« nucleotide misincorporation ») par la *Taq* polymérase, le phénomène de recombinaison entre brins *in vitro* (« intertemplate recombinaison »), les erreurs de rééchantillonnage (« template resampling »).^{46 47} Les erreurs d'incorporation nucléotidique apparaissent au fur et à mesure des nombreux cycles d'amplification lors de la PCR et peuvent générer une fausse augmentation de la diversité. La recombinaison entre brins d'ADN est observée lors des derniers cycles de PCR et peut masquer un éventuel lien de polymorphisme entre deux séquences. La PCR peut être à l'origine d'une amplification significativement importante de quelques variants représentant un petit nombre dans l'échantillon de départ (erreurs de rééchantillonnage). L'amplification et le séquençage obtenus à partir de ces séquences risquent ainsi de ne pas être représentatifs de la population de départ.

IV.3.2 Méthode du Single Genome Amplification (SGA)

Le SGA appliqué au VIH est une méthode de PCR qui permet d'isoler et d'amplifier l'ADNc viral issu d'un seul clone viral à travers plusieurs séries de dilution. Des dilutions en série de l'ADNc produit à partir de l'ARN viral par rétrotranscription permettent la réalisation de plusieurs concentrations. L'ADNc est amplifié par PCR nichée pour chacune des concentrations. La dilution présentant moins de 20% des produits d'amplification est supposée résulter de l'amplification d'un seul clone viral d'après la loi de distribution de Poisson. Les produits d'amplification issus de cette dilution sont ensuite séquencés et analysés.

Le SGA a notamment permis l'identification de populations minoritaires résistant au traitement antirétroviral, de façon plus sensible que le génotypage standard⁴⁶. Il détecte les mutations associées conférant un haut niveau de résistance aux antirétroviraux non détectées par le génotypage après séquençage populationnel. La recherche de ces mutations était

reproductible. En se basant sur le principe d'isolement d'un seul clone viral, l'analyse de multiples génomes isolés produisait un meilleur niveau de sensibilité pour comprendre l'évolution des populations virales et la réponse aux antirétroviraux.

Tout comme le clonage, le SGA permet d'amplifier de grandes séquences, notamment le gène *env* complet d'après Salazar, *et al* ⁴⁷. L'un des avantages du SGA est que cette technique limite le risque de recombinaison génétique *in vitro* puisque l'ADNc issu d'un seul clone sert de matrice pour chacune des PCR. Le risque de rééchantillonnage est également très réduit car la population virale obtenue après dilution est constituée d'un seul clone. En théorie, il n'y a donc pas de possibilité d'amplifier artificiellement un variant minoritaire au sein d'une population hétérogène comme c'est le cas dans une PCR « classique ». ^{46 48 49} B.F.Keele a noté que les erreurs d'incorporation nucléotidique pouvaient être réduites avec le SGA. En effet, si une erreur de la *Taq* polymérase survenait au début des cycles de la PCR, il apparaissait alors un polymorphisme sur le chromatogramme final obtenu après séquençage. Cette séquence était alors exclue. Si une erreur d'incorporation survenait en fin de cycle, elle était indétectable sur la séquence finale car moins abondante.

Ainsi, bien que le SGA représente un investissement en termes de temps et de coût, cette méthode est devenue la référence pour l'isolement de clones viraux au sein d'une population et pour l'analyse de la diversité au sein d'une population virale infectant un individu donné à un instant donné.

TRAVAIL PERSONNEL

I. OBJECTIF

Le VIH-1 est un virus capable d'une extraordinaire diversité inter- et intra-individuelle. La population virale examinée au début de l'infection d'un patient par le VIH-1 présente des caractéristiques génétiques très différentes de la population virale observable plus tard à d'autres stades de l'infection. Ceci est également vrai pour les quasi-espèces présentes à un temps « t » au sein de l'organisme hôte. Elles ont des caractéristiques génotypiques et phénotypiques différentes d'un compartiment à l'autre. Elles sont parfois capables de réplication autonome dans certains organes cibles décrivant un phénomène de compartimentation.

Au sein de l'organe où a lieu la compartimentation, les quasi-espèces virales se répliquent de manière indépendante, différente. Elles ne sont pas toujours sensibles au traitement antirétroviral mis en œuvre malgré une charge virale indétectable ou bien contrôlée dans le sang.

L'existence de réservoirs viraux caractérisés par une restriction du flux viral et une réplication virale plus faible est un élément qu'il faut aussi prendre en compte dans l'étude de la diversité du VIH.

Une meilleure connaissance du phénomène de compartimentation nous aiderait à la compréhension des mécanismes d'échappement au traitement anti-rétroviral, la compartimentation en est une des explications.

Une analyse de compartimentation repose sur l'étude phylogénique d'une variété de clones viraux au sein d'une population virale, de leurs relations ainsi que des relations avec les populations virales des autres compartiments. Pour ce faire, un isolement fin de clones viraux issus d'une population est nécessaire, un gène d'intérêt du génome sera amplifié puis séquencé.

Deux techniques sont actuellement utilisées pour l'étude de compartimentation, le clonage viral et plus récemment développée « l'amplification de génomes uniques » ou SGA.

L'objectif de cette étude était d'analyser les relations entre séquences virales issues de prélèvements de sang et de LCR chez quatre patients infectés par le VIH-1 présentant des troubles neurologiques et de rechercher la présence d'une éventuelle compartimentation.

Dans la première partie de ce travail nous avons mis au point la méthode du SGA appliquée à l'étude du gène *env* complet du VIH au laboratoire de Virologie du CHRU de Tours. Le SGA repose sur une amplification par PCR nichée de l'ADNc obtenu par rétrotranscription inverse après une étape de dilution préalable, le but étant d'amplifier un seul clone de virus.

A partir des séquences obtenues, des analyses de diversités dans le sang et le LCR ainsi que de divergence entre les deux compartiments ont pu être réalisées grâce au logiciel Mega4®.

Le tropisme viral a également été recherché en soumettant les séquences virales à l'algorithme informatique accessible sur Geno2Pheno.com.

Enfin, des arbres phylogéniques ont été construits en utilisant la méthode du « plus proche voisin » ou Neighbour Joining Method, permettant l'analyse des relations entre les différents clones viraux et la recherche de compartimentation.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1 Patients et méthodes

Quatre patients ont été inclus. (**Tableaux 2 et 3**). Les prélèvements de LCR étaient prescrits chez les patients A, B, C, D pour les motifs suivants respectivement : céphalées associées à syndrome neurogène, céphalées intenses associées à des troubles visuels et une dénutrition importante, céphalées fébriles, céphalées fébriles et vomissements depuis 3 semaines. Les diagnostics neurologiques retenus étaient respectivement chez les patients A, B, C, D, une méningite lymphocytaire à VIH, une toxoplasmose cérébrale, une méningite lymphocytaire aigue non documentée et une leucoencéphalopathie à VIH.

Patients	Sexe	Age (ans)	Age découverte sérologie VIH+ (ans)	Origine géographique	Sous-type	Stade VIH	Nadir CD4 sang (mm3)	Maladies associées
A	F	46	18	France métropolitaine	B	Stade B	260	Candidose abdominale
B	F	44	25	Côte d'Ivoire	A1, Coinfection VIH 1 et 2	Stade C	125	BK pulm, Kaposi, Toxo cérébrale, Zona MS, AntiHBc+
C	F	37	30	Congo	H	Stade A	250	Zona abdo, AntiHBc+
D	M	51	44	Cameroun	CRF-02AG	Stade C	20	Kaposi, Syphilis, BK pulm, AntiHBc+, VHC+, VHD+, candidose oropharyngée

Tableau 2: Caractéristiques des patients inclus dans l'étude (données cliniques). (BK pulm= tuberculose pulmonaire, Toxo= toxoplasmose, MS= membre supérieur).

La cytologie dans le LCR était en faveur d'une méningite lymphocytaire dans les quatre cas avec un nombre de leucocytes supérieur à 10/ mm3 pour les 4 patients.

Du fait d'expériences préliminaires, le taux minimal de charge virale (CV) dans le LCR requis, permettant une amplification par SGA, était de 4 logs. Le prélèvement sanguin concomitant ne devait pas être prélevé à plus d'un mois du prélèvement de LCR.

Le patient A était infecté par un virus de sous-type B. Il était à un stade B de l'infection à VIH pour une candidose généralisée avec atteinte abdominale. Il avait interrompu son traitement par Truvada®, Reyataz® et Norvir® qu'il prenait régulièrement depuis 2008 pour des

problèmes d'intolérance, 3 mois avant l'épisode neurologique. Il s'agissait de sa 5^{ème} ligne de traitement.

Patients	Date de pvl (mois-année)	Délai pvlts sg/LCR (jours)	Prélèvement plasmatique		Prélèvement LCR				Diagnostic neurologique	Ttt ARV antérieur et actuel
			CV sang (log UI/mL)	CD4 sang (nb/mm ³)	CV LCR (log UI/mL)	glyR (mM)/proR (g/l)	LeucoR	Formule leuco. (%)		
A	04-11	+/-1	4,39	549	5,72	1,9/3,9	269	100 ly	méningite lymphocytaire à VIH	AZT, RTV, Hivid®, IDV, 3TC, d4T, NFV, NPV, CBV, LPV/r, Reyataz®, TVD, maraviroc
B	05-11	+/-2	6,62	161	6,67	2,6/1,65	190	80 ly 20 autres cellules	toxoplasmose cérébrale	AZT, Hivid®, 3TC, d4T, ddi, ABC, EFV, TDF, LPV/r, TVD, RAL, Prezista®
C	04-11	0	5,05	337	6,52	2,38/1,01	38	100 ly	méningite lymphocytaire aigue non documentée	LPV/r, CBV
D	04-11	+/-3	4,02	128	5,27	2,5/1,68	550	95 ly 5 mono	leucoencéphalopathie à VIH	Kivexa®, LPV/r, TVD, Reyataz®, RTV

Tableau 3: Caractéristiques des patients inclus dans l'étude. Données sur les prélèvements du plasma et du LCR, la composition du LCR, le diagnostic neurologique et le traitement ARV. (pvl= prélèvement, sg= sang, glyR= glycorachie, proR= protéinorachie, LeucoR= leucorachie, formule leuco= formule leucocytaire, ly= lymphocytes, mono= monocytes, ttt= traitement).

Le patient B était infecté par un virus de sous-type A1. Il était à un stade C de l'infection pour une toxoplasmose cérébrale. Il présentait une coinfection VIH 1 et 2. Il avait un nadir CD4 inférieur à 250/mm³. Concernant le traitement ARV, le patient était sous Zerit®, Videx®, Ziagen®, 2 mois avant sa toxoplasmose cérébrale, traitement qu'il avait vraisemblablement interrompu. Son histoire médicale était marquée par de nombreuses lignes de traitement et des difficultés à maintenir une bonne observance.

Le patient C était infecté par un virus de sous-type H. Il présentait un stade A de l'infection. Le patient C avait reçu un traitement de première ligne en 2007. Par la suite il était resté de nombreuses années sans recevoir de traitement antirétroviral. Le traitement a été repris à la suite de son épisode neurologique.

Le patient D était infecté par un virus de sous-type CRF-02AG. Il présentait une tuberculose pulmonaire et un sarcome de Kaposi et avait un nadir CD4 inférieur à 250/mm³ ; ce qui

classait son infection à VIH dans un stade C. Le patient D était sous Truvada®, Reyataz®, Novir®. Le traitement avait été interrompu 1 mois avant l'épisode neurologique.

En conclusion, aucun des patients n'était sous traitement ARV au moment du prélèvement de LCR. Les patients A et D prenaient certes leur traitement depuis plusieurs années avec une bonne observance, leur traitement ayant été interrompu quelques semaines avant le prélèvement de LCR.

II.2 Prélèvements disponibles et conservation des prélèvements :

Les paires de plasma et de LCR étaient constituées à partir de prélèvements conservés à -80°C après réalisation des examens prescrits dans le cadre de la prise en charge des patients.

II.3 Détermination de la charge virale:

La charge virale HIV était déterminée grâce au kit Abbott Real Time™ adapté aux automates Abbott *m2000sp* et *m2000rt* selon le protocole du fournisseur.

II.4 Extraction de l'ARN viral et synthèse d'ADNc:

L'extraction de l'ARN viral a été réalisée grâce au kit EZ1 virus Mini Kit v2.0 (Qiagen®) avec l'extracteur EZ1 Advanced XL (Qiagen®) selon les instructions du fabricant. Pour recueillir 90 µL d'extrait, 400 µL de sang étaient requis tandis que 200 µL de LCR étaient nécessaires. Les extraits ont été par la suite conservés à -80°C.

La transcription inverse de l'ARN en un brin d'ADNc a été réalisée en utilisant le protocole Superscript III First strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen®) selon les instructions du fabricant. Le mélange réactionnel était composé de 16 µL d'ARN génomique

précédemment extrait, de 2 µL de desoxynucleosides triphosphate à 10 mM et de 4 µL d'amorce EXT M3 à 2 µM. L'ensemble a été incubé pendant 5 minutes à 65°C pour permettre la dénaturation de l'ARN. Les tubes ont ensuite été mis 1 minute dans la glace. La synthèse de l'ADNc a été effectuée en complétant le mélange par 20µL d'un mix contenant 8 µL de MgCl₂ à 25 mM, 4 µL de tampon 10X fourni avec le kit, 4 µL de dithiothreitol à 100 mM, de 2 µl d'inhibiteur de la RNase (RNaseOUT) à 40u/µL et de 2 µl SuperScript III (SSIII) à 200u/µL, ces deux derniers étant conservés dans la glace et ajoutés en fin de manipulation. L'enzyme utilisée est une transcriptase inverse qui permet de réduire l'activité RNase H, d'améliorer la spécificité et le rendement du fait d'une meilleure thermostabilité. La synthèse d'ADNc avait lieu à 50°C pendant 60 minutes. Un µL de SSIII a été ensuite ajouté dans chacun des tubes pour permettre un meilleur rendement. La synthèse a été poursuivie par une heure additionnelle à 55°C, suivie par une élongation finale à 70°C pendant 15 min. Les tubes ont par la suite été mis dans la glace pour stopper la réaction. L'ADNc obtenu pouvait être utilisé de suite pour la recherche de dilution et PCR nichée ou être conservé à -20°C jusqu'à la manipulation suivante.

II.5 Méthode du SGA appliquée à l'amplification du gène env de l'enveloppe complète

II.5.1 Recherche de la bonne dilution et PCR nichée

Pour chacun des produits de RT-PCR obtenus, une série de quatre dilutions différentes était réalisée avec de l'eau RNase-free (**Figure 27**). Le choix des dilutions reposait sur le niveau de charge virale retrouvé dans le prélèvement initial. Pour une charge virale forte de 6 logs par exemple, les dilutions suivantes ont été effectuées : 1/50^{ème}, 1/100^{ème}, 1/150^{ème} et 1/200^{ème}. Pour une charge virale plus faible, de 4 logs par exemple, les dilutions suivantes ont été choisies 1/5^{ème}, 1/10^{ème}, 1/20^{ème}, 1/50^{ème}. Les différentes dilutions d'ADNc ont été conservées et stockées à -20°C. La PCR nichée était ensuite réalisée à partir des ADNc dilués, distribués à raison d'un µL par puits contenant du mix de PCR. Pour chacune des dilutions, 10 puits étaient préparés. Seule la dilution donnant 20% de puits positifs, soit 2 puits sur 10 était sélectionnée pour réaliser par la suite l'amplification d'une plaque de 96 puits contenant

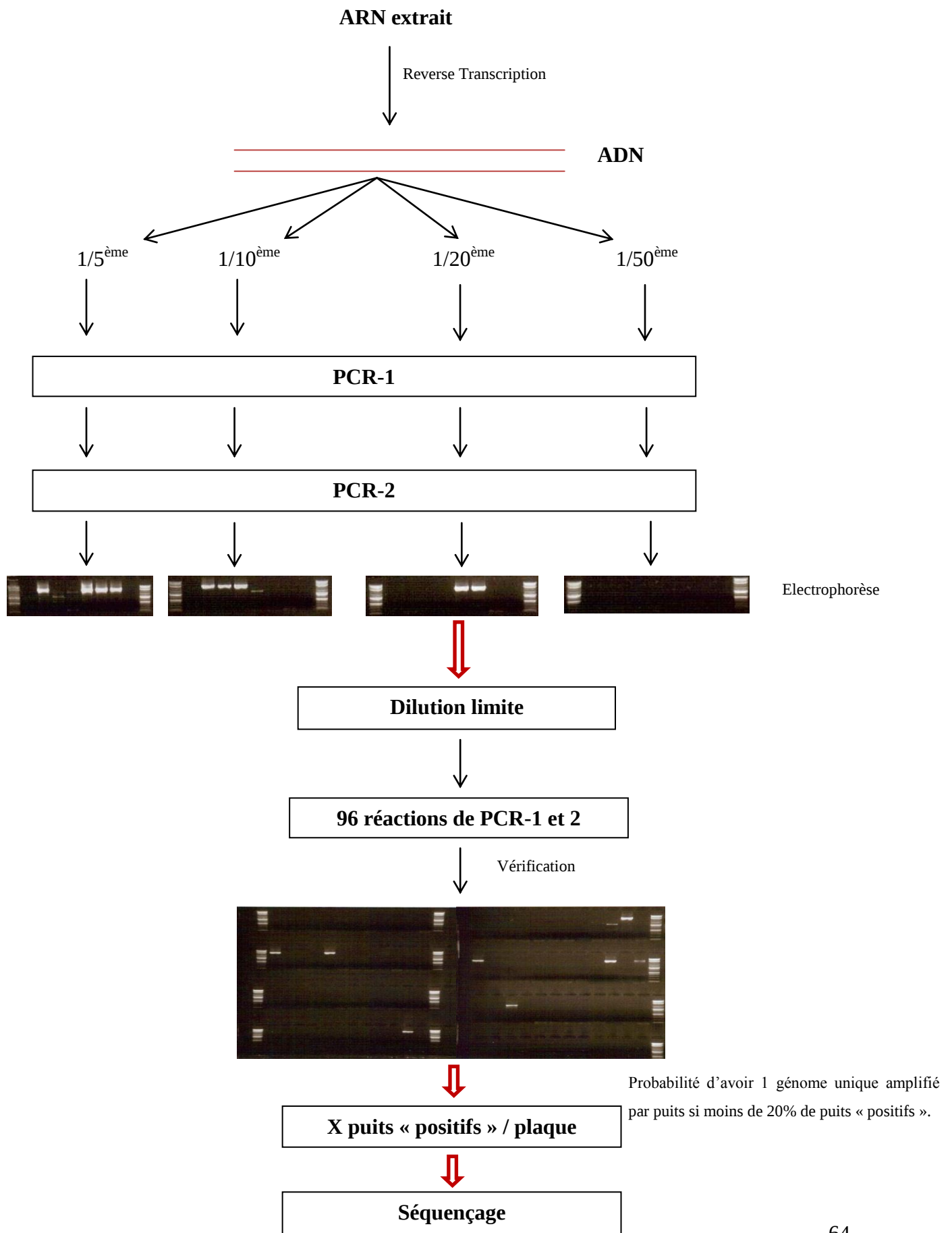


Figure 27 Schéma répicatitatif des différentes étapes du SGA

chacun 1 μ L de l'ADNc dilué, selon le même protocole et avec les mix. En effet, la dilution donnant 20% de puits était supposée produire un seul clone viral dans chacun des puits selon la loi de Poisson. Les dilutions étaient parfois modifiées en fonction des résultats obtenus à la suite des 10 puits réalisés. Si les quatre dilutions produisaient plus de 20% de produits d'amplification, les ADNc étaient à nouveau dilués à de plus fortes dilutions puis ré-amplifiés par PCR nichée. Si au contraire, les dilutions produisaient trop peu ou aucun produit d'amplification, de nouvelles dilutions moins importantes étaient effectuées suivies par une nouvelle PCR nichée.

▪ PCR 1

Le mix était composé de 0.5 μ L de chaque amorce externe EXT M5 et EXT M3 (**Tableau 4 et figure 28**) à une concentration de 10 μ M et de 18 μ L de Platinum® PCR Supermix High Fidelity (Invitrogen®). L'enzyme utilisée était une Taq polymérase avec activité correctrice qui permet d'augmenter la spécificité de la PCR. Dix-neuf μ L de mix et 1 μ L d'ADNc étaient ajoutés dans chacun des puits, à raison de 10 puits par dilution d'ADNc. Deux tubes correspondant aux témoins positif et négatif étaient préparés en parallèle, en ajoutant à 19 μ L de mix, respectivement, 1 μ L d'ADNc obtenu à partir de l'ARN viral d'un patient dont l'amplification avait déjà été effectuée avec succès et 1 μ L d'eau. Les conditions d'amplification étaient les suivantes: une étape de dénaturation de l'ADNc à 94°C pendant 2 minutes suivie de 35 cycles comprenant chacun une dénaturation à 94°C pendant 15 secondes, une hybridation à 55°C pendant 30 secondes puis une élongation à 68°C pendant 3 minutes. L'élongation finale était de 10 minutes à 68°C. Les produits d'amplification étaient ensuite conservés à 4°C.

- PCR 2

Pour réaliser la PCR 2, 1 μL de produit de PCR1 était prélevé et ajouté à 19 μL de mix contenant 0.5 μL de chaque amorce interne INT M5 et INT M3 Eurogentec® (**Tableau 4 et Figure 28**) et 18 μL de Platinum® PCR Supermix High Fidelity. Dix puits par dilution d'ADNc étaient réalisés. Le programme d'amplification par PCR utilisé était le même que celui de la PCR 1.

II.5.2 Analyse des produits issus de l'amplification

Deux microlitres de tampon de charge (10X Blue Juice®, Gel Loading Buffer Invitrogen®) étaient ajoutés à 3 μL de chaque produit d'amplification pour être déposés dans chacun des puits du gel. Le gel servant à la migration électrophorétique des produits de PCR était réalisé à partir d'un gramme et demi d'agarose (UltraPure™ Invitrogen®), de 10 mL de tampon TBE 1X (Tris Borate EDTA 10X Eurobio® dilué au $1/10^{\text{ème}}$). Pour évaluer la taille des fragments d'ADN, nous avons utilisé un marqueur de taille moléculaire (BioLabs® inc 2-log DNA Ladder). La migration des échantillons déposés s'effectuait à 100 V pendant 30 minutes. L'ADN amplifié était visualisé après migration sous lampe à UV (**Figure 29**). Le point de dilution donnant 20% de puits positifs était choisi. Quand cet objectif n'était pas atteint, des dilutions supplémentaires ou intermédiaires étaient réalisées et les ADNc à nouveau amplifiés, comme expliqué précédemment.

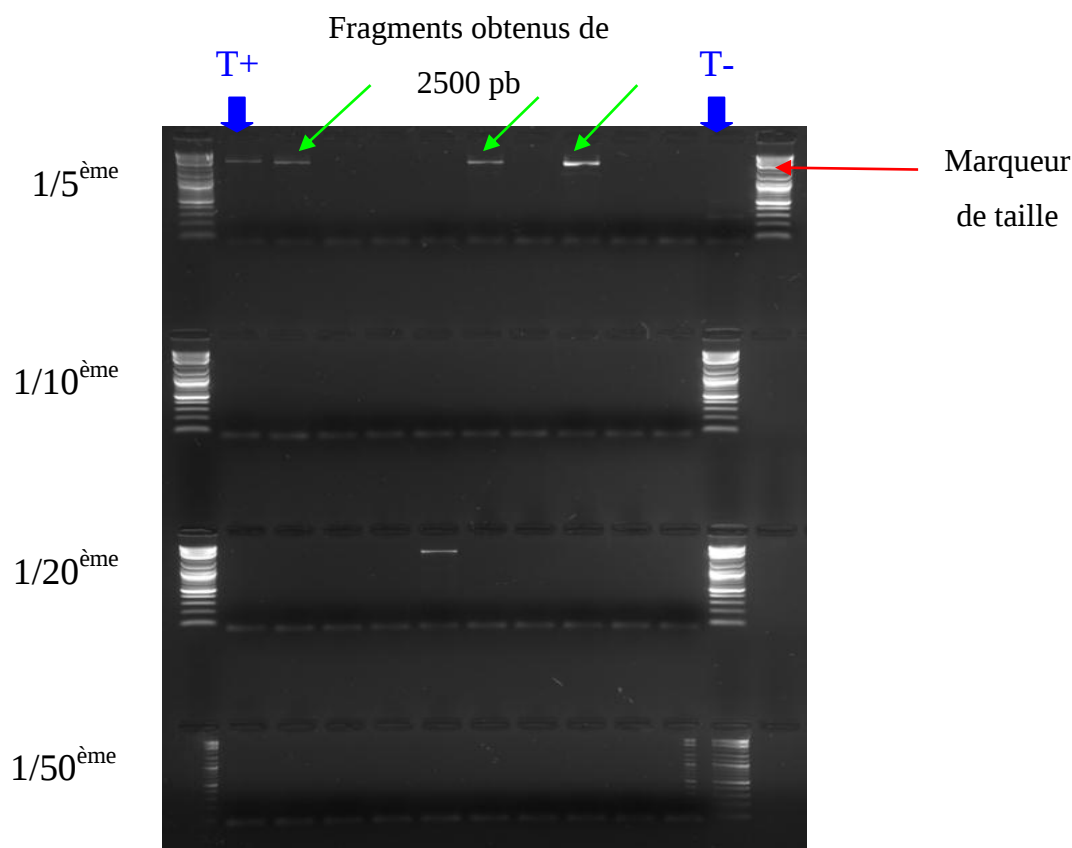


Figure 29: Analyse électrophorétique des produits d'amplification après PCR nichée d'ADNc dilué à des concentrations différentes. Les témoins positif (T+) et négatif (T-) ainsi que le marqueur de taille sont indiqués sur la photo. Les fragments générés avaient une taille qui correspondait environ à 2500 pb (flèches vertes). Les dilutions réalisées sont indiquées en face de la rangée de puits leur correspondant. Pour la dilution au 1/20^{ème}, 1 seul puits est positif. Pour la dilution au 1/5^{ème}, 3 puits sur 9 sont positifs, dont un faiblement. La dilution au 1/5^{ème} se rapprochant le plus de l'objectif de 20% de positivité a été retenue pour l'amplification de l'ADNc sur une plaque de 96 puits.

II.5.3 PCR nichée pour une plaque de 96 puits

Une fois la dilution sélectionnée, une amplification de l'ADNc était réalisée dans 96 puits selon la même procédure que précédemment. Les produits d'amplifications étaient visualisés après révélation sous à ultraviolets (UV) et il était vérifié que seuls 20% des puits présentaient une amplification, comme attendu (**Figure 30**).

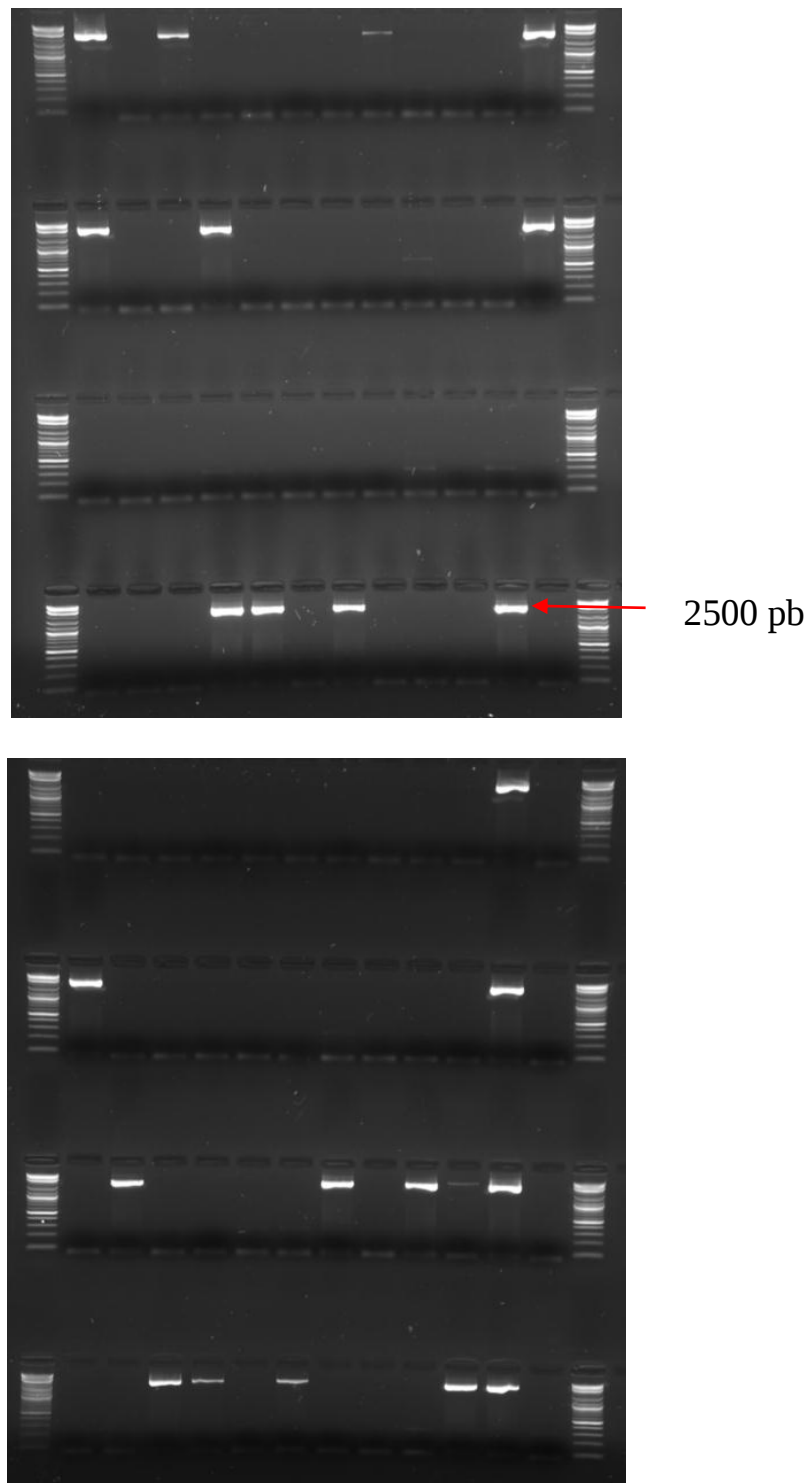


Figure 30: Analyse électrophorétique des produits d'amplification obtenus après PCR nichée à partir de la dilution d'ADNc choisie. 96 puits sont réalisés. 23 puits sur 96 contenaient des produits d'amplification, soit 24% de puits positifs, ce qui était cohérent avec la loi de Poisson. En se référant au marqueur de taille, les fragments générés avaient une taille d'environ 2500 pb

II.6 Séquençage de l'ADN amplifié

Chacun des produits amplifiés correspondant à un clone viral, a été séquencé à l'aide de 5 paires d'amorces. La réaction de séquençage a été réalisée à l'aide du kit BigDye® Terminator v1.1 Cycle (Applied Biosystem®), en utilisant 10 amorces (1F 2F 3F 4F 5F 1R 2R 3R 4R 5R, Eurogentec®) (**Tableau 4 et figure 31**). Pour chacune des amorces un mix est préparé contenant 24 µl de Big Die® Terminator, 24 µl d'eau RNase free, 12 µl de tampon et 60 µl d'amorce. Huit µl du mélange étaient distribués dans chacun des puits à raison de 12 puits par amorce. Deux µl des produits d'amplification obtenus après dilution et amplification par PCR nichée, dilués une seconde fois ou non, au 1/10^{ème}, ou au 1/20^{ème} suivant l'intensité de la bande obtenue lors de la visualisation sous UV étaient ajoutés dans chacun des puits. La PCR de séquençage débutait par une première étape de dénaturation d'1 minute à 96°C. Elle nécessitait 30 cycles comprenant chacun une dénaturation à 96°C pendant 10 secondes, une hybridation des amorces à 50°C pendant 10 secondes et une élongation à 60°C pendant 4 minutes puis un maintien à 4°C.

Les produits de séquençage ainsi obtenus étaient purifiés à l'aide du kit Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup (Millipore®) sur la plaque fournie (SEQ₉₆ plate), en réalisant deux lavages successifs avec 20µl de tampon d'injection par puits pendant 4 minutes sous vide. Après une étape d'agitation de 15 minutes où 20 µl de tampon d'injection étaient à nouveau ajoutés à chacun des puits, les produits de séquençage étaient transférés sur plaque Applied Biosystems® MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, destinée à la lecture par le séquenceur Applied Biosystems® 3130xl Genetic Analyser.

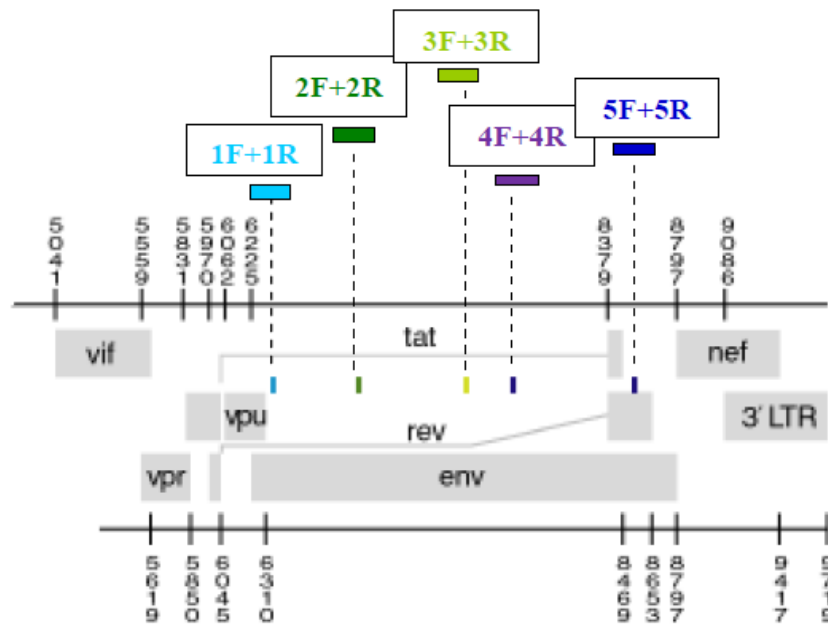


Figure 31: Position des amorces de séquençage sur le gène env du VIH1

Le logiciel Sequencing Analysis® v.5.2 Patch 2 (Applied Biosystems®) a été utilisé pour l'analyse des séquences nucléotidiques obtenues et la lecture des électrophorégrammes (**Figure 32**). Une première lecture permettait de corriger d'éventuelles erreurs de lecture des nucléotides avant l'alignement des séquences.

Le logiciel d'alignement BIOEDIT (Biological Sequence Alignment Editor) a été ensuite utilisé avec les options CAP contig assembly program et Clustal W pour l'analyse et l'alignement des séquences (**Figure 33**). Une séquence « contig » a été créée pour chaque clone viral, séquence contiguë résultant du réassemblage de différents fragments générés par le séquençage d'un même amplicon avec différentes amorces de séquençage. Les « contigs » étaient enregistrées sous format « fas » pour la construction des arbres phylogénétiques.

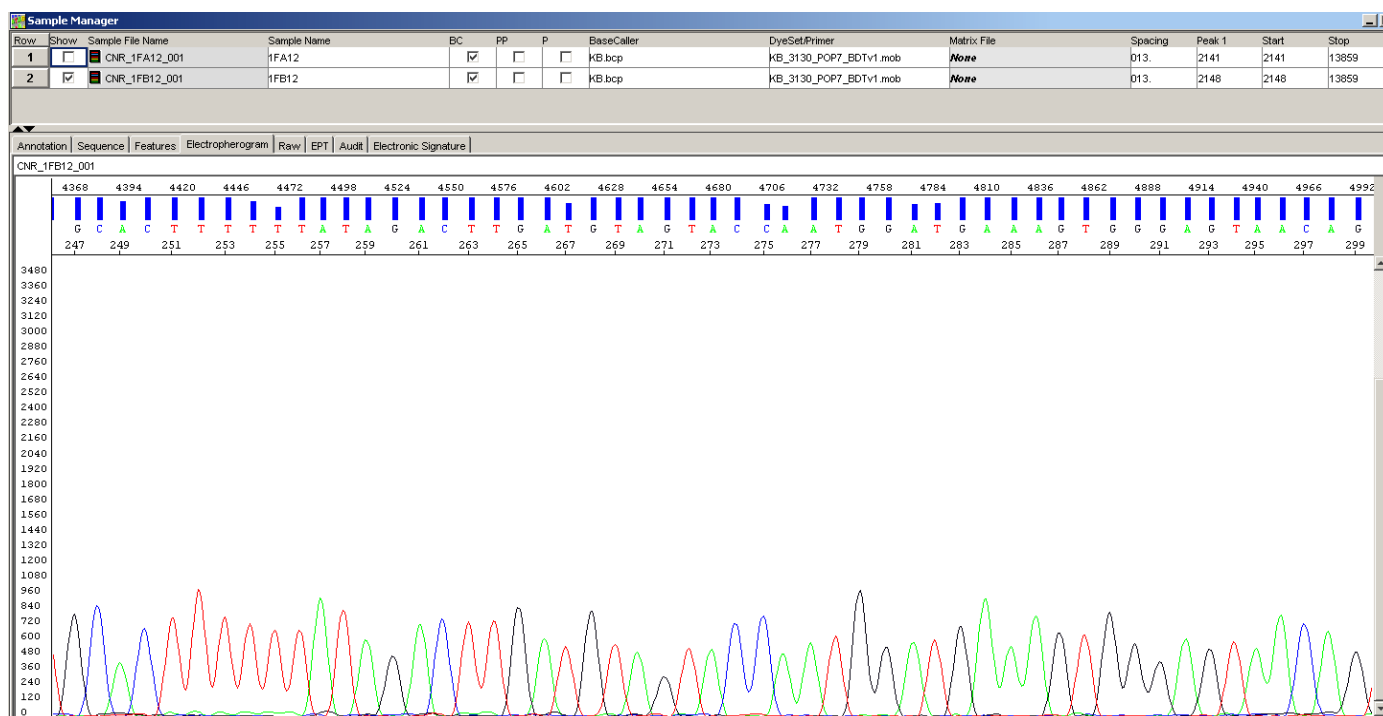


Figure 32: Exemple d'électrophorégramme obtenu après séquençage sous Sequencing Analysis® v.5.2 Patch 2 Applied Biosystems®

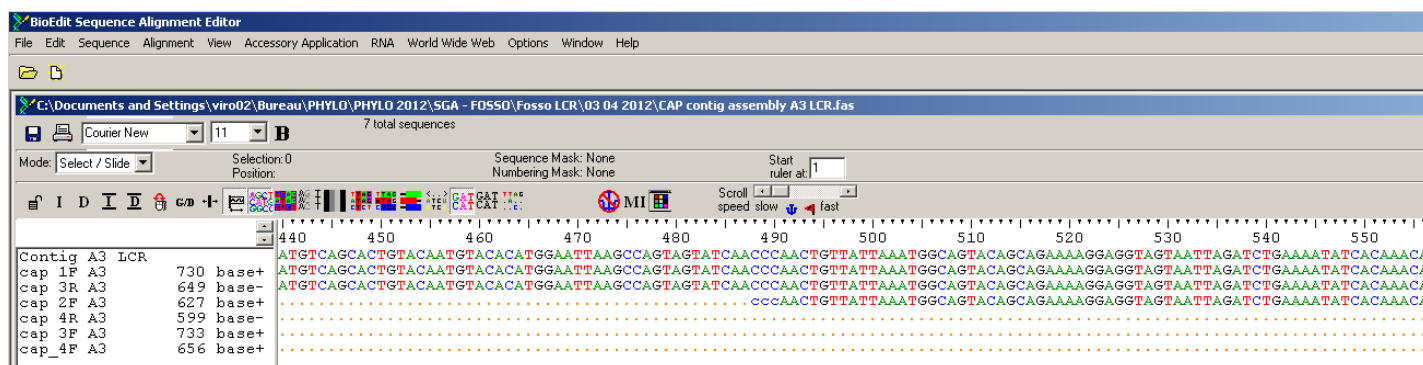


Figure 33: Exemple d'alignement des séquences nucléotidiques sous BIOEDIT et création d'une séquence « contig » enregistrée sous mode fas.

II.7 Détermination du tropisme

Le tropisme a été déterminé pour chacune des séquences selon l'algorithme « geno2pheno coreceptor » (site internet geno2Pheno.org) (**Figure 34**). L'analyse informatique permet de prédire la probabilité d'utilisation du corécepteur CCR5 ou CXCR4 du clone viral en fonction de la séquence nucléotidique analysée, en ciblant en particulier la boucle V3 du gène *env*. Le taux de faux positif, ou FRP cut-off (False positive rate) est fixé à 10%. Ce seuil de 10% correspond à la probabilité de considérer à tort un virus X4 comme un virus utilisant préférentiellement le corécepteur CCR5. Un tropisme viral était ainsi déterminé pour chaque clone viral de chaque patient.

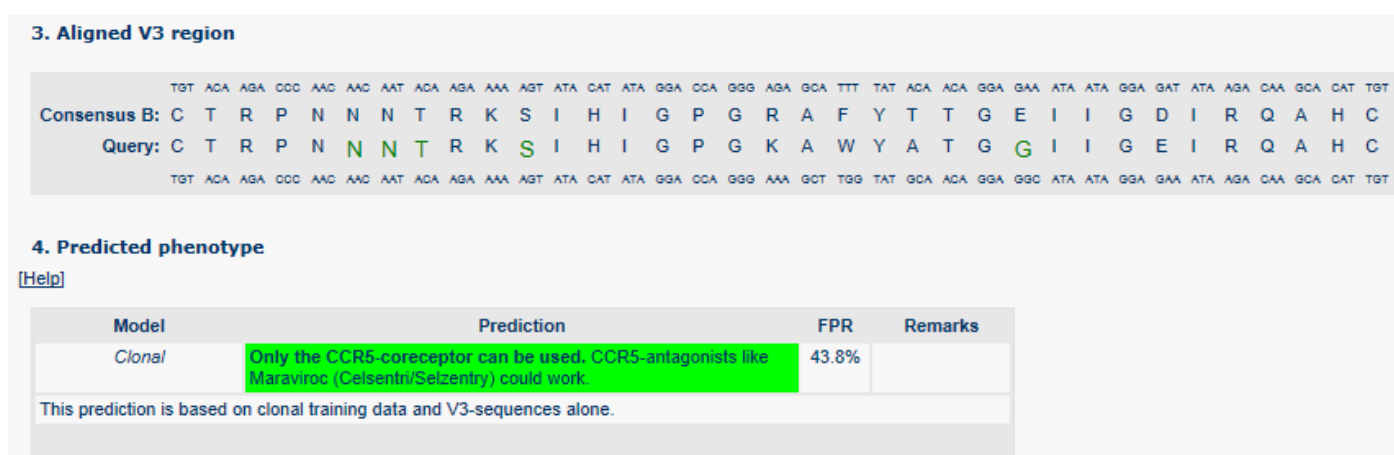


Figure 34: Prédiction du tropisme viral en soumettant une séquence « contig » obtenue au logiciel Geno2Pheno.

II.8 Analyses de diversité et de divergence

Les diversités intra-compartimentales sang et LCR ainsi que la divergence d'évolution entre groupes ont été déterminées en utilisant le logiciel MEGA4® selon la méthode statistique du maximum de vraisemblance composite ou « Maximum Composite Likelihood ».^{50 51}

II.9 Analyse phylogénétique

L'analyse phylogénétique a été réalisée pour chacun des patients en comparant les séquences virales issues du sang et du LCR obtenues pour chacun d'entre eux. Pour cela, le logiciel MEGA4® (megasoftware.net) a été choisi en utilisant la méthode « Neighbor Joining » ou méthode du plus proche voisin qui permet d'étudier les liens phylogénétiques existant entre les différentes séquences de sang et de LCR obtenues, en évaluant la robustesse des branches ou « bootstrap » sur 500 répétitions.

Après obtention des arbres phylogénétiques, la divergence et la diversité des séquences obtenues étaient appréciées visuellement en analysant la répartition des variants viraux dans l'arbre en comparaison des résultats de diversité et de divergence entre compartiments obtenus avec MEGA4®. Grâce à l'échelle de distance génétique, la divergence entre compartiments du sang et du LCR était évaluée sur la longueur séparant les variants viraux des deux compartiments de l'ancêtre commun. Les variants viraux étaient très divergents quand ils étaient éloignés de l'ancêtre commun et par conséquent la branche qui les portait, était longue. La diversité intragroupe était évaluée sur l'alignement des variants viraux d'un même compartiment. Lorsque les variants viraux étaient alignées sur une même branche, cela signifiait qu'ils étaient peu différents donc peu diversifiés. Si au contraire ils avaient tendance à dessiner des ramifications au bout de la branche sans s'aligner, ils étaient plutôt diversifiés.

III. RESULTATS

III.1 Amplification génique et choix de la dilution d'ADNc permettant de réaliser le SGA

Nous avons obtenu une amplification du gène *env* pour les prélèvements de plasma et de LCR, provenant de chacun des quatre patients. Quatre dilutions initiales ont été réalisées pour chacun des ADNc produits par RT-PCR ($1/5^{\text{ème}}$, $1/10^{\text{ème}}$, $1/20^{\text{ème}}$, $1/50^{\text{ème}}$ pour les charges virales faibles et $1/50^{\text{ème}}$, $1/100^{\text{ème}}$, $1/150^{\text{ème}}$ et $1/200^{\text{ème}}$ pour les charges virales élevées). Des dilutions supplémentaires ont parfois été effectuées quand il était nécessaire. Comme attendu, les dilutions nécessaires étaient d'autant plus importantes que la charge virale était élevée (**Figure 35**). Les dilutions retenues donnant 20% de puits positifs étaient faibles pour les charges virales inférieures à 5 logs, atteignant la dilution au $1/10^{\text{ème}}$ tout au plus. A partir de 5 logs, des dilutions plus importantes étaient requises, allant jusqu'au $1/400^{\text{ème}}$ pour le patient B. Des images représentatives des résultats obtenus ont été présentées dans la section matériels et méthodes (**Figure 30**).

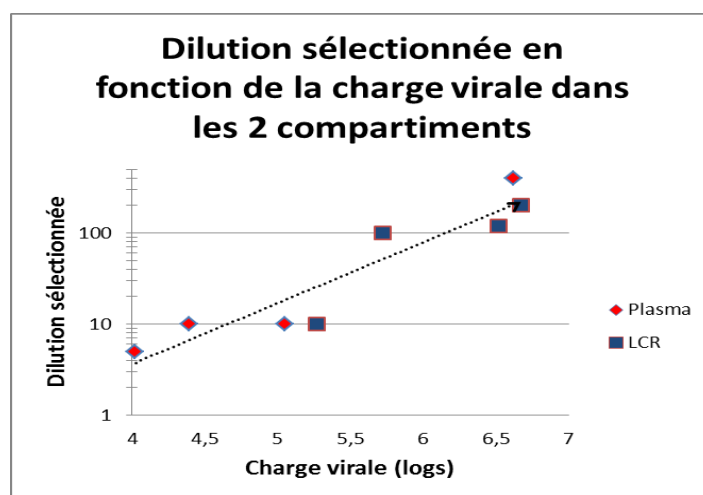


Figure 35: Représentation de la dilution sélectionnée pour le SGA en fonction de la CV pour chacun des prélèvements testés de plasma et de LCR. L'axe des ordonnées représente la dilution sélectionnée sous une échelle logarithmique (1/n). Le point de dilution le plus fort ($n=400$) correspond à la dilution au $1/400^{\text{ème}}$ du plasma du patient B. Une droite de régression linéaire montre la corrélation entre l'augmentation de la dilution et celle de la CV.

III.2 Amplification génique par SGA et séquençage du gène *env* complet

Après sélection de la bonne dilution, l'ADNc dilué contenu dans une plaque de 96 puits a été amplifié puis séquencé. Un total de 155 séquences a été obtenu. Le nombre de séquences disponibles était compris entre 35 et 44 par patient, avec une répartition homogène entre les deux compartiments, plasma et LCR (**Figure 36**). Ces séquences sont accessibles sur demande, elles seront ultérieurement déposées à GenBank.

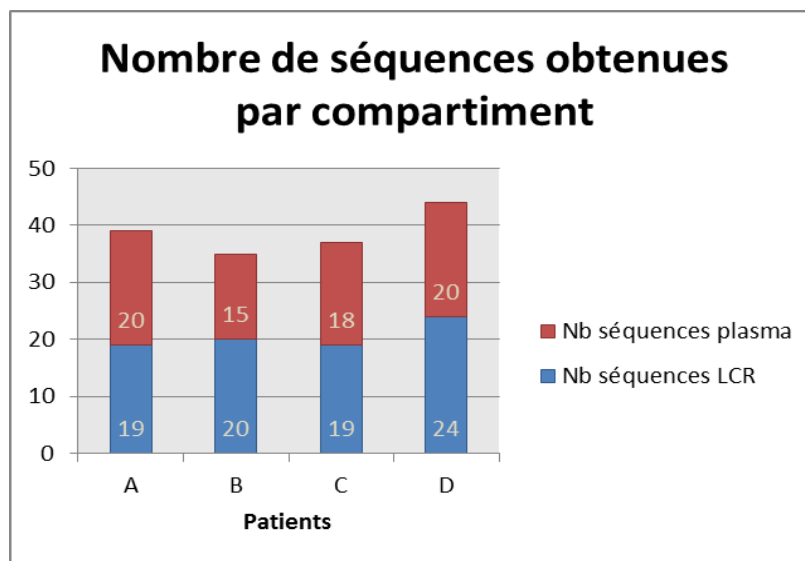


Figure 36: Nombre de séquences obtenues par patient dans chacun des compartiments.

III.3 Analyse de la diversité génétique et de la divergence entre les variants viraux des deux compartiments

III.3.1 Analyse de la diversité au sein de chaque compartiment

Pour chacun des patients, la diversité génétique des variants présents a été estimée indépendamment dans chaque compartiment en utilisant le logiciel MEGA4®. La diversité variait de 0,002 à 0,063 dans le plasma et de 0,002 à 0,032 dans le LCR (**Tableau 5**). Pour les

patients A, B et C la diversité était plus importante dans le plasma que dans le LCR. La diversité dans le plasma et dans le LCR était équivalente, très faible pour le patient D.

Patients	Diversité dans le plasma		Diversité dans le LCR		Divergence entre plasma et LCR	
	%	SD	%	SD	%	SD
A	0,035	0,011	0,016	0,002	0,076	0,013
B	0,042	0,006	0,032	0,004	0,039	0,005
C	0,063	0,009	0,028	0,002	0,056	0,005
D	0,002	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000

Tableau 5: Valeurs estimées des diversités génétiques dans le sang et dans le LCR, de la divergence entre variants des deux compartiments. SD= Standard deviation

III.3.2 Analyse de la divergence entre les deux compartiments

La divergence entre LCR et sang a été estimée avec MEGA4®. Elle variait de 0,002 à 0,076 (**Tableau 5**). Elle était plus faible pour le patient D que pour les autres patients.

III.4 Prédiction du tropisme viral par Geno2Pheno

La prédiction du tropisme a été réalisée grâce à Geno2pheno pour chacune des séquences obtenues. Nous avons obtenu 100% de séquences R5 dans le plasma pour chacun des patients. Parmi les séquences du LCR, seule une séquence X4 a été retrouvée chez le patient C, dénommée « A11 » (**Figure 38**). Sur cette séquence X4, au niveau de la boucle V3 du gène *env*, une lysine en position 6, AA basique a été retrouvée ainsi qu'une histidine en position 11 (**Figure 37**). Pour les patients A, B, D toutes les séquences de LCR étaient de tropisme R5.

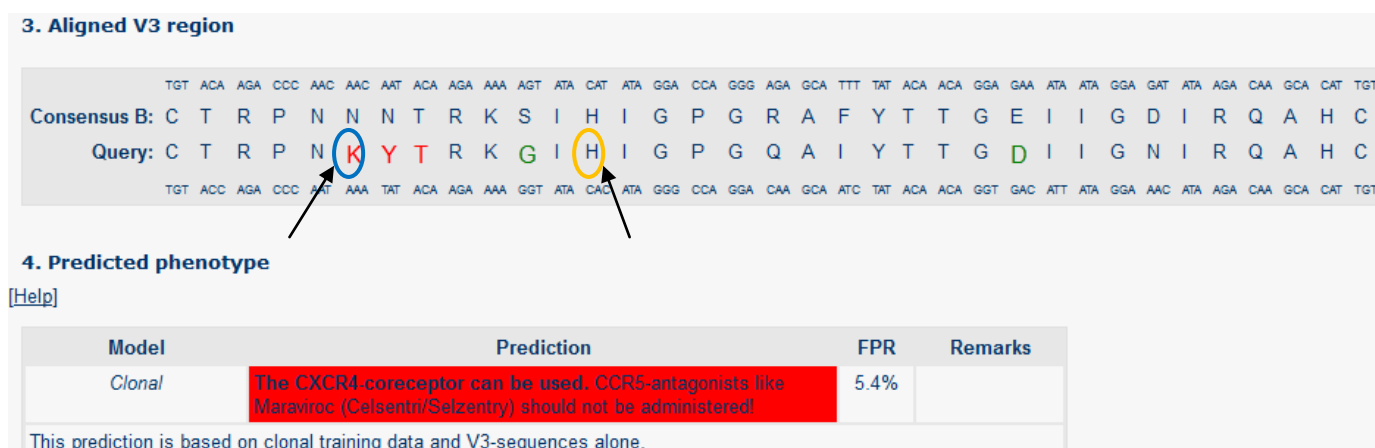


Figure 37: Alignement en AA de la séquence "A11" X4 obtenue sur Geno2Pheno. Le résidu en position 6, une asparagine (N), AA polaire est changé pour une lysine (K), AA basique (cercle bleu). Le résidu en position 11 est une histidine, AA basique (cercle jaune).

III.5 Description des arbres phylogéniques

L'analyse phylogénétique a été réalisée pour l'ensemble des séquences avec le logiciel MEGA4® en s'appuyant sur la méthode du « Neighbor Joining ». Un arbre phylogénétique par patient a été construit, illustrant les liens entre séquences obtenues à partir du sang et du LCR (**Figures 38, 39, 40, 41**). Une échelle évaluant la distance génétique est indiquée en bas des arbres et les valeurs des bootstraps sont reportées au-dessus de chacun des nœuds illustrant la robustesse de chacun des embranchements.

▪ Patient A :

Dans la partie haute de l'arbre phylogénétique obtenu (**Figure 38**), 14 séquences de LCR ségrégeaient dans un embranchement A1 incluant 2 séquences du plasma. Cet embranchement incluait des séquences présentant une faible diversité. A l'opposé, dans la partie basse de l'arbre, l'embranchement A2 montrait une grande diversité de variants plasmatiques et incluait un variant unique provenant du LCR (flèche noire). Ce variant du LCR formait un cluster A3 avec des variants plasmatiques très peu diversifiés. Ces deux

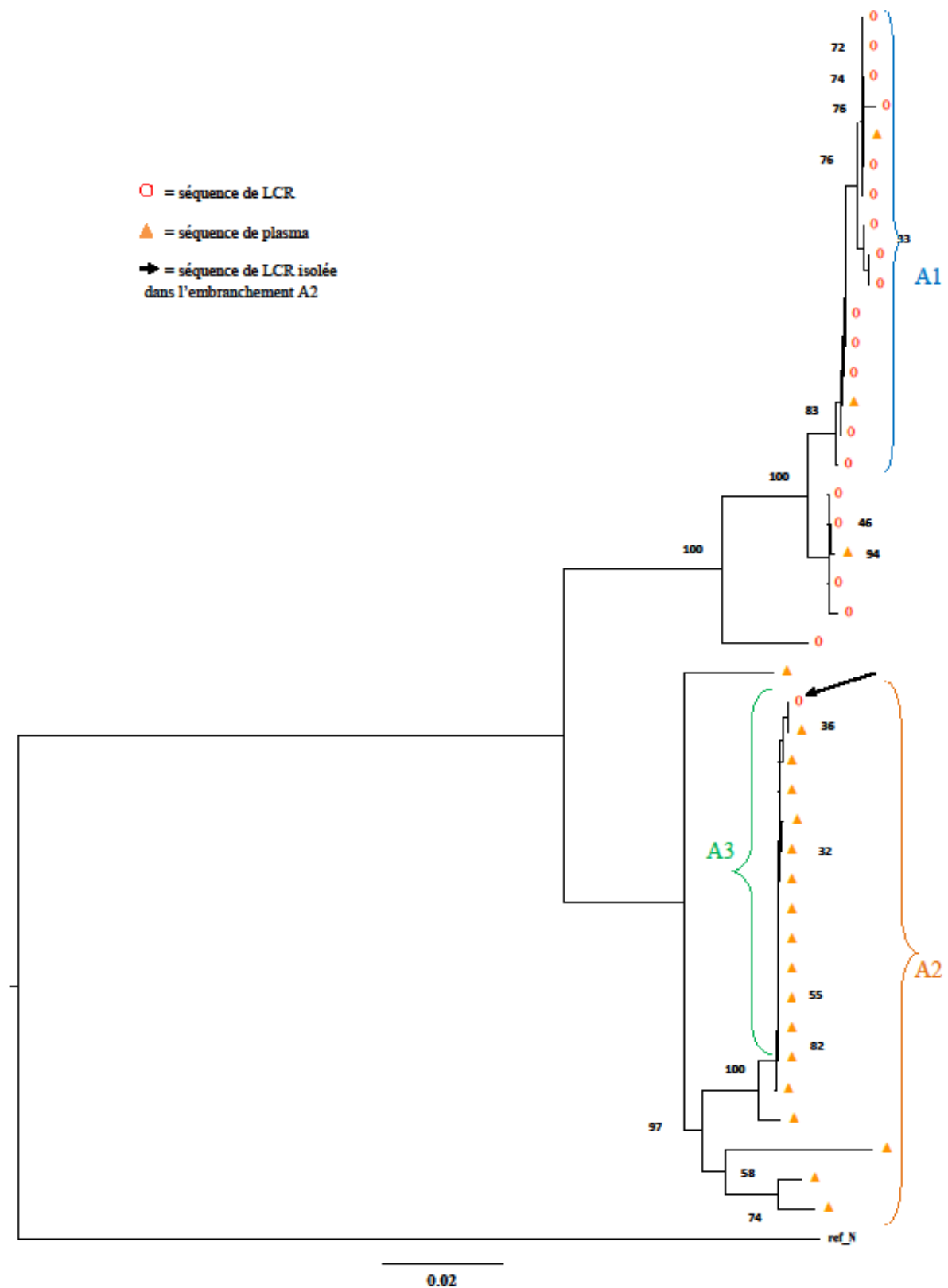


Figure 38: Arbre phylogénique représentant les séquences du patient A L'embranchement A1 comporte la majorité des séquences du LCR. Une séquence isolée de LCR dans l'embranchement A2 est indiquée par une flèche. Le cluster A3 comporte des variants plasmatiques très peu différenciés.

embranchements A1 et A2 étaient nettement distincts et divergents. La distance génétique qui les séparait, évaluée grâce à l'échelle, était importante. Les nœuds à ces embranchements étaient supportés par des valeurs de bootstraps élevées, respectivement de 100% et 97% pour A1 et A2. L'ensemble de ces résultats était en faveur d'une compartimentation dans le LCR, la quasi-totalité des variants y étant dérivée d'un variant

L'ensemble de ces résultats était en faveur d'une compartimentation dans le LCR, la quasi-totalité des variants y étant dérivée d'un variant plasmatique minoritaire. Ces résultats étaient concordants avec la forte divergence entre variants plasmatique et du LCR ainsi que la faible diversité des variants du LCR par rapport à ceux du sang, retrouvées avec Mega4® (**Tableau 5**).

- Patient B :

Chez le patient B, les séquences de LCR et de plasma étaient entremêlées et peu divergentes (**Figure 39**). De plus, on pouvait observer une très grande diversité des variants présents dans les deux compartiments. Ces résultats, vérifiés statistiquement (**Tableau 5**), suggéraient une absence de compartimentation.

- Patient C :

Dans la partie haute de l'arbre, tous les variants identifiés dans le LCR, sauf un, étaient localisés dans le même embranchement C1 (**Figure 40**). Dix variants plasmatiques étaient situés sur le même embranchement que la population de variants du LCR. Les huit autres variants plasmatiques, plus éloignés génétiquement et plus diversifiés, étaient situées sur un autre embranchement C2. La population virale majoritaire plasmatique semblait être ainsi apparentée aux variants du LCR, formant un cluster de réplication. L'embranchement C1 montrait une très bonne valeur de bootstrap de 100%. Comparativement au patient A pour lequel une compartimentation pouvait être clairement évoquée, il semblait exister de plus grands échanges entre les deux compartiments chez le patient B, suggérés par la présence d'une population plasmatique majoritaire au sein de l'embranchement C1. Allant vers cette hypothèse, la divergence entre variants du LCR et du plasma était plus faible que celle du

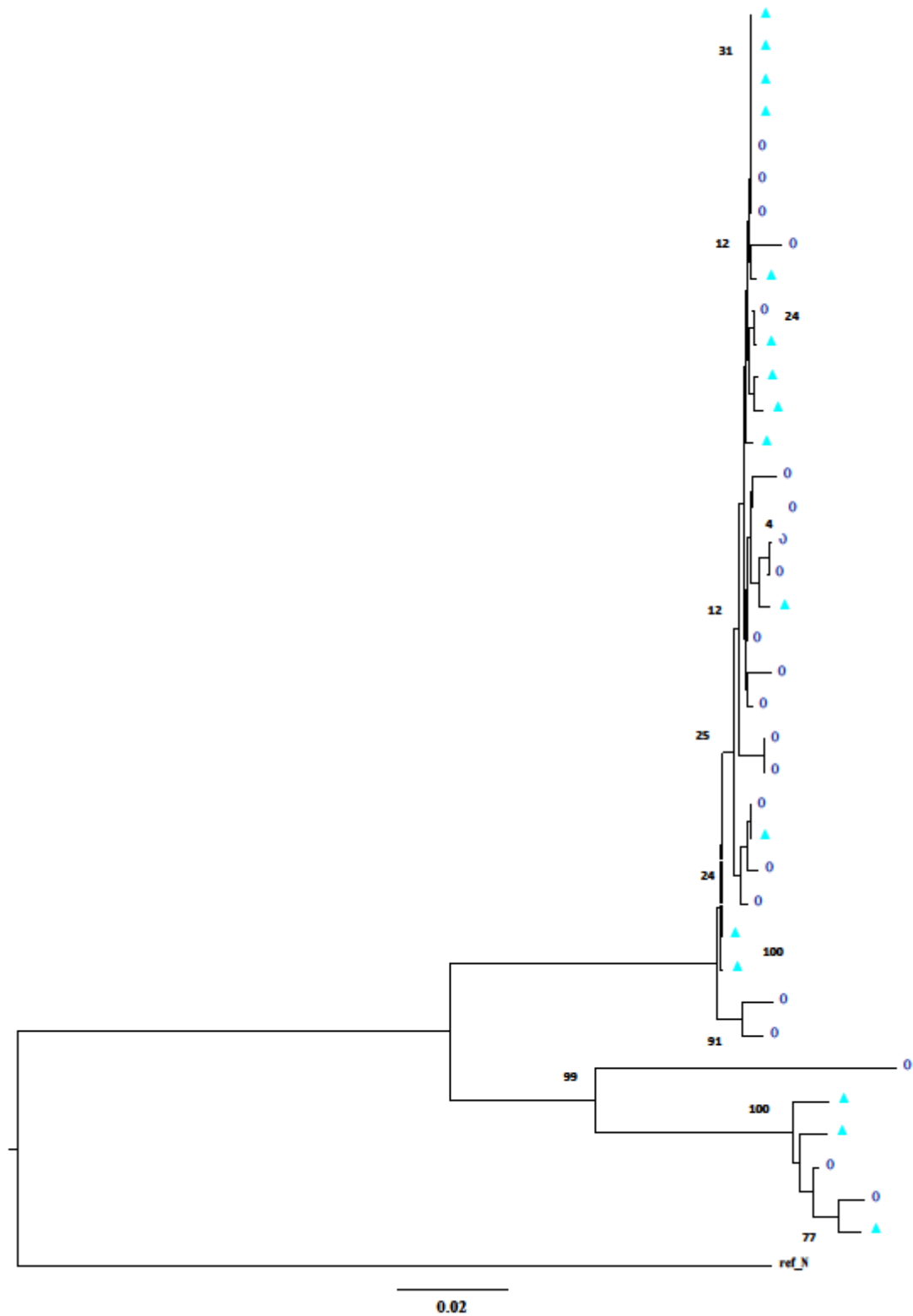


Figure 39: Arbre phylogénique représentant les séquences du patient B. Une grande diversité dans chacun des embranchement et une faible divergence sont observées. On ne peut conclure à une compartimentation.

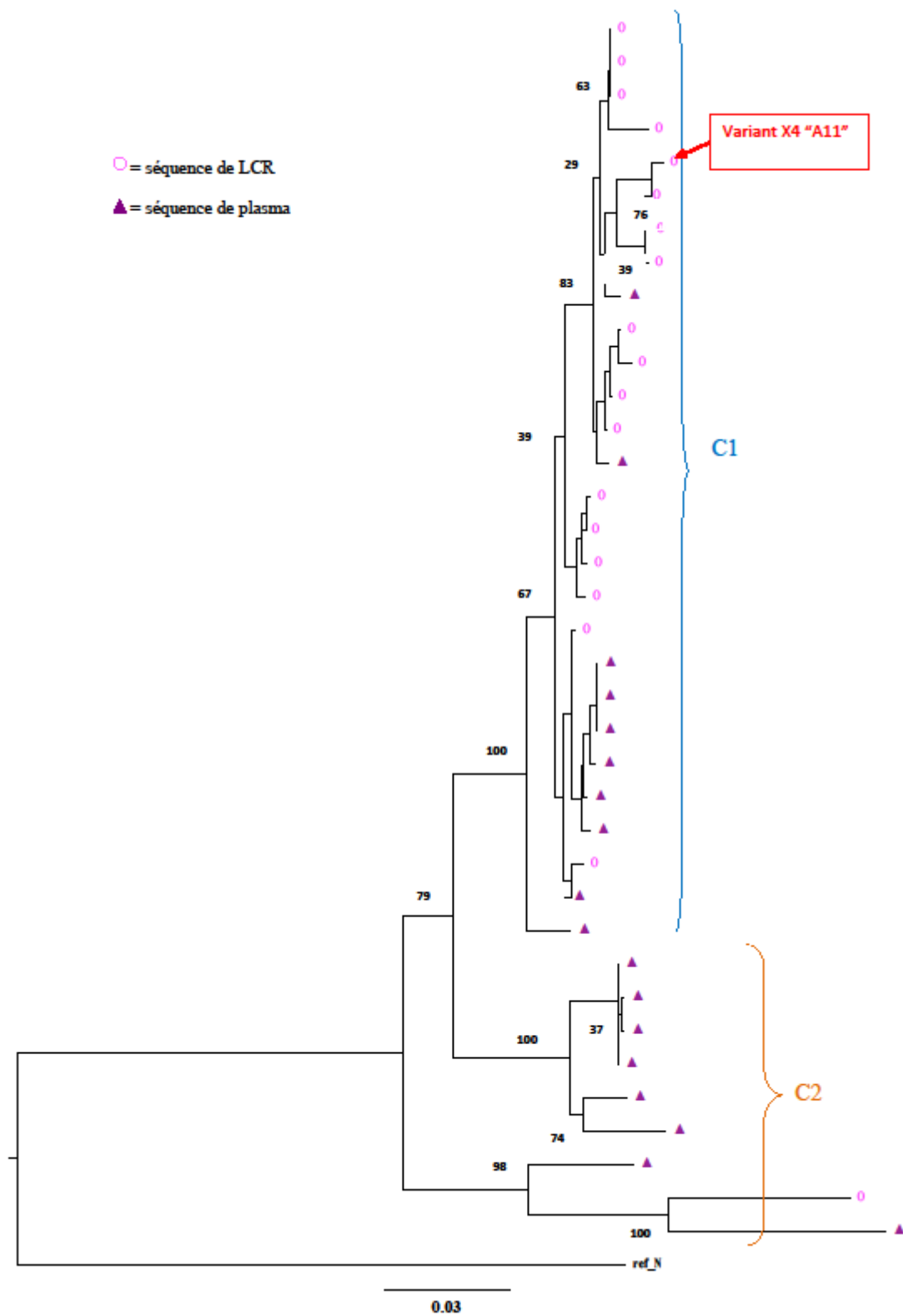


Figure 40: Arbre phylogénique représentant les séquences du patient C. L'embranchement C1 comporte la quasi-totalité des variants du LCR et une population virale plasmatique majoritaire. L'embranchement A2 contient les 8 autres variants viraux plasmatiques plus diversifiés et un variant du LCR. Le variant X4 « A11» est indiqué par une flèche rouge.

patient A (**Tableau 5**). On pouvait observer une plus grande diversité des variants viraux de l'embranchement C1, comparativement à l'embranchement A1 du patient A correspondant clairement à une compartimentation, résultat vérifié par les valeurs de diversité du LCR. On pouvait cependant noter que la diversité du LCR était significativement inférieure à celle du plasma (0,028 vs 0,063). Ces résultats pouvaient suggérer une compartimentation dans le SNC avec une plus longue durée d'évolution, où une population virale aurait commencé à évoluer. Chez ce patient, il a été retrouvé un variant prédit X4 dans le LCR « A11 » (flèche rouge sur la figure 40).

▪ Patient D:

Chez le patient D, une population virale très homogène pouvait être observée, s'alignant sur la même branche, incluant la totalité des variants plasmatiques et du LCR (**Figure 41**). Ces résultats étaient concordants avec les données de l'analyse statistique par MEGA4®. Les diversités des populations virales du plasma et du LCR ainsi que la divergence entre les deux compartiments étaient de 0,002 pour toutes les trois, taux le plus faible observé parmi les 4 patients. On ne pouvait évoquer de compartimentation.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les atteintes neurologiques sont fréquemment retrouvées lors de l'infection à VIH. Il peut s'agir de symptômes aspécifiques révélant une primo-infection, de maladies opportunistes avec troubles neurologiques, d'atteintes neurologiques dont l'agent causal est le VIH lui-même, tel que dans l'encéphalite à VIH.

Le VIH est un virus qui est capable d'une grande diversité génétique à différents stades de la maladie. De plus, au sein d'un même organisme on retrouve dans divers organes cibles, des variants viraux génétiquement distincts. Ces quasi-espèces virales peuvent décrire une compartimentation, phénomène déjà bien connu pour le SNC.^{49 52}

La méthode du SGA suivie d'un séquençage permet d'isoler des génomes uniques de virus. Il s'agit d'une méthode de choix pour analyser finement les relations entre quasi-espèces virales d'un virus capable d'une grande diversité et de rechercher une compartimentation. Cette méthode a été utilisée pour l'étude de la compartimentation dans divers organes, voies génitales féminines, sperme, lait maternel, plasma.^{35 36 38 47} Cependant, cette technique a très peu été appliquée pour analyser la compartimentation du VIH dans le SNC. Dans la littérature, on retrouve une étude récemment menée par Schnell, *et al.*⁵³, portant sur la compartimentation dans le SNC au stade de primo-infection VIH et reposant sur deux techniques l'« heteroduplex tracking assay » (HTA) ou test de mobilité des hétéro-duplex et le SGA. Il s'agit à ce jour de la seule analyse de compartimentation dans le SNC mettant en avant le SGA. Ainsi, notre travail se singularise par le choix de la mise en place d'une technique désormais considérée comme le « gold standard » pour l'analyse des relations entre quasi-espèces virales.

Nous avons amplifié par SGA et séquencé le gène *env* complet chez quatre patients présentant des troubles neurologiques. Les résultats, certes préliminaires, montrent une hétérogénéité de profils phylogénétiques obtenus. En effet, chez les patients A et C on peut évoquer une compartimentation devant la structure de l'arbre obtenu et une faible diversité dans le LCR

par rapport au plasma. A contrario, chez les deux autres patients, B et D, cette hypothèse de compartimentation est rejetée.

L'équipe de Schnell, *et al*⁵³ s'est intéressée à la compartimentation du VIH dans le SNC en utilisant également le SGA. Il ne s'agit pas de la même population d'étude puisque les sujets inclus étaient en phase de primo-infection alors que dans notre travail, deux patients ont atteint le stade C, un patient était au stade B de l'infection, le dernier au stade A après au moins 30 ans d'évolution de la maladie. Dans l'étude de Schnell, *et al.*, seul un patient sur 11 présentait des troubles neurologiques imputés à une méningite à VIH. Pour la plupart des patients, une inflammation modérée du LCR et une interruption de la BHE étaient présentes, recherchées par la présence d'une leucorachie supérieure à 10 /mm³ et un rapport albumine LCR/plasma augmenté. Une compartimentation avait été retrouvée chez deux patients neurologiquement asymptomatiques et de façon notable chez le seul patient atteint de troubles neurologiques. Devant ce faible effectif, il est difficile de conclure à un lien ou à l'absence de lien entre compartimentation et troubles neurologiques, tout comme dans notre travail. D'après les travaux de Schnell, *et al*, on pouvait uniquement conclure que l'inflammation dans le LCR et la présence d'une interruption de la BHE n'est pas suffisante pour induire une compartimentation et qu'une compartimentation dans le SNC peut survenir lors de la primo-infection en l'absence de symptomatologie neurologique.

En plus de l'analyse phylogénétique des variants viraux isolés par SGA, les auteurs avaient utilisé une méthode statistique d'évaluation des distances génétiques, le Slatkin-Maddison test.⁵⁴ Il s'agit d'un test statistique qui détermine le nombre minimal d'évènements migratoires entre des populations virales distinctes rendant compte de la structure phylogénétique retrouvée.⁵⁵ La combinaison de méthodes explorant la compartimentation est préconisée par Zarate, *et al.*⁵⁶ Avoir un test statistique complémentaire évaluant la distance génétique entre séquences est un bon outil lorsqu'il s'agit d'analyser une structure phylogénétique où la présence d'une compartimentation est douteuse. Il serait intéressant de l'appliquer aux patients de notre étude pour qui nous n'avons pas pu conclure à une compartimentation.

En réalisant une recherche du tropisme viral par Geno2Pheno, nous avons identifié un variant prédit X4 dans le LCR du patient C. Les autres variants étaient tous de tropisme R5. Il semble logique que la majorité des variants soient de tropisme prédit R5 puisque les cibles principales

du VIH dans le système nerveux central sont les macrophages dérivés des cellules neuronales et les cellules de la microglie qui expriment préférentiellement le co-récepteur CCR5 à leur surface.

Concernant l'unique séquence X4 retrouvée dans le LCR, notre résultat n'est pas une exception. L'équipe de Harrington, *et al.*⁵⁷ a réalisé des travaux sur la compartimentation entre sang et SNC chez des patients à différents stades de l'infection à VIH et a recherché un lien entre une éventuelle compartimentation et la présence de troubles neurologiques. La prédiction du tropisme a été réalisée pour 27 patients. On retrouvait 24 patients pour qui tous les variants étaient de tropisme prédit CCR5, 2 patients de tropisme indéterminé. Le dernier patient souffrant de trouble mineur cognitivo-moteur présentait des variants X4 prédits. On sait qu'il existe un lien entre utilisation préférentielle du co-récepteur CCR5 et tropisme macrophagique. Même si ce lien est généralement vérifié, il existe des variants X4 capables d'infecter les macrophages^{58 59}, ce qui pourrait être le cas pour le patient de notre étude. En s'intéressant à la séquence en acides aminés de cette séquence X4 obtenue par Geno2Pheno, on peut remarquer une histidine en position 13 de la boucle V3 du gène codant pour la glycoprotéine gp 120. Or d'après les travaux de Pillail, *et al.*², la présence d'une histidine ou proline en position 13 de la boucle V3 du gène de la glycoprotéine gp120 était significativement corrélée à l'existence d'une compartimentation parmi les variants du LCR. Dans la littérature, il est retrouvé que la présence de résidus basiques en position 11 et 25 (arginine ou lysine) était corrélée à un phénotype X4^{11 60}, ce qui n'était pas le cas de notre séquence X4 possédant une glycine, acide aminé apolaire et un acide aspartique, résidu acide en position 11 et 25 respectivement. De plus les acides aminés à ces mêmes positions sont retrouvés pour certaines autres séquences R5 analysées par Geno2Pheno. Le changement d'acides aminés en position 11 et 25 ne doit pas être nécessaire ni suffisant pour induire le phénotype X4 ou R5. On sait d'ailleurs que des changements en acides aminés dans les régions proches de la boucle V3 jouent également un rôle sur le tropisme et le choix du co-récepteur lors de l'entrée du virus dans la cellule hôte⁶⁰. Un changement d'acide aminé pour une lysine en position 6 est retrouvé sur notre séquence X4. Aucun lien à ce jour n'est décrit entre tropisme X4 et présence d'un acide aminé basique en position 6 mais il serait intéressant d'étudier cette position, complétant l'identification de déterminants de la boucle V3 et autres régions du gène *env* impliqués dans le tropisme viral.

On peut se demander si la présence d'une compartimentation dans le SNC est liée à une symptomatologie neurologique particulière. Plusieurs auteurs se sont déjà penchés sur la question. Une compartimentation dans le SNC peut être retrouvée chez des patients sans trouble neurologique voire même asymptomatiques. Dans les travaux de Schnell, *et al.* précédemment décrits, en réalisant une étude longitudinale, une compartimentation dans le SNC a été retrouvée chez 3 patients sur 11 au stade de primo-infection à VIH dont un seul présentait des troubles neurologiques. Fait intéressant, pour ce dernier patient, les auteurs ont montré que la compartimentation dans le SNC lors de la primo-infection pouvait être transitoire. L'équipe de Ritola *et al.*⁶¹ a montré en utilisant le HTA que la compartimentation dans le SNC ainsi que le niveau de diversité globale n'étaient pas liés à la présence d'une atteinte cérébrale. La présence de variants viraux uniques, décelables dans un seul des deux compartiments était observable chez des patients atteints d'une HAD, d'un « trouble cognitivo-moteur mineur » tout comme chez les patients ne souffrant pas d'atteinte neurologique voire asymptomatiques. Cependant, les patients atteints d'HAD avaient significativement plus de variants uniques dans le LCR que les patients non atteints d'HAD. Ce lien entre compartimentation et HAD a également été vérifié par Harrington, *et al.*⁵⁷. Ces derniers ont appliqué la méthode HTA et la PCR conventionnelle suivie d'un séquençage pour l'étude de la compartimentation sur 85 paires sang et LCR, prélevées chez des patients atteints de l'infection à VIH à divers stades de la maladie, primo-infection, infection chronique sans atteinte neurologique, infection chronique avec atteinte neurologique mineure, HAD. Ils ont trouvé peu de compartimentation dans le SNC chez les patients en phase de primo-infection, un taux de compartimentation élevé parmi les patients présentant une infection chronique, avec peu de différence selon qu'ils étaient symptomatiques neurologiquement ou non. Les patients atteints d'HAD présentaient une compartimentation de façon significativement plus importante que les autres groupes de patients. La compartimentation dans le SNC peut donc être retrouvée à différents stades de l'infection à VIH, primo-infection, infection chronique ou HAD. Il existe un lien significatif entre HAD et compartimentation dans le SNC. Cependant, l'imputabilité d'une compartimentation dans l'apparition de cette atteinte neurologique n'a pas été démontrée.

Notre étude a impliqué 4 patients, nous avons retrouvé une compartimentation dans le SNC de 2 patients. Ces derniers patients présentaient des signes de méningite, attribuée au VIH pour le patient A et sans étiologie pour le patient C. Nous n'avons retrouvé aucune compartimentation chez les deux patients de notre étude ayant atteint le stade SIDA, les patients B et D. Le patient B était atteint de toxoplasmose cérébrale. On pourrait penser que sa pathologie neurologique est liée uniquement à la toxoplasmose. Or, le fort taux de charge virale dans le LCR (6,67 logs), nous a amené à suspecter une atteinte neurologique à VIH associée. Il n'a cependant pas été retrouvé de compartimentation chez ce patient. Le patient D atteint d'une encéphalopathie à VIH ne présentait pas de compartimentation non plus. On peut noter une population très homogène de variants du plasma et du LCR sur l'arbre phylogénétique obtenu. Or, le taux de CD4 de ce patients est très faible à 128 /mm³, avec un nadir de 20 /mm³. Ce patient a atteint le stade SIDA où la baisse de la pression immune spécifique peut expliquer une moindre diversification de la population virale.

En s'appuyant sur la méthode du SGA pour analyser finement des variants viraux et faire une analyse phylogénétique, nous avons pu réaliser une étude de la compartimentation dans le SNC de 4 patients atteints de troubles neurologiques. Parmi ces 4 patients, on pouvait conclure chez 2 patients à la présence d'une compartimentation dans le LCR. La cause de l'apparition d'une compartimentation dans le SNC n'est pas élucidée. Il est nécessaire de poursuivre les travaux sur des effectifs plus importants pour pouvoir comprendre les conditions d'apparition d'une compartimentation dans le SNC et pour rechercher un lien éventuel entre certaines formes d'atteinte neurologique et la présence de celle-ci. L'application du SGA à une étude longitudinale rétrospective à partir d'analyses sur des prélèvements séquentiels serait utile pour répondre à ces questions.

BIBLIOGRAPHIE

1. Salemi M, Lamers SL, Yu S, De Oliveira T, Fitch WM, McGrath MS. Phylodynamic analysis of human immunodeficiency virus type 1 in distinct brain compartments provides a model for the neuropathogenesis of AIDS. *J. Virol.* sept 2005;79(17):11343-11352.
2. Pillai SK, Pond SLK, Liu Y, Good BM, Strain MC, Ellis RJ, et al. Genetic attributes of cerebrospinal fluid-derived HIV-1 env. *Brain.* juill 2006;129(Pt 7):1872-1883.
3. Bigaillon C, Mérens A, Rapp C. Intérêt des tests génotypiques de résistance du VIH aux antirétroviraux en pratique clinique quotidienne. *Revue Francophone des Laboratoires.* mai 2010;2010(422):69-82.
4. Landmarks of the HIV genome [Internet]. [cité 16 janv 2013]. Disponible sur: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>
5. Bishop K. Research - Bishop group | MRC National Institute for Medical Research, London [Internet]. [cité 5 janv 2013]. Disponible sur: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/research/kate-bishop/>
6. SIDABLOG : Article : Pourquoi les anticorps sont si peu efficaces [Internet]. [cité 5 janv 2013]. Disponible sur: <http://www.sidablog.fr/articles/28/Pourquoi-anticorps-peu-efficaces.php>
7. Carnec X, Zaïdi S, Amara A. Mécanismes moléculaires de l'entrée du VIH dans les cellules cibles. *Virologie.* 1 sept 2007;11(2):86-94.
8. Pozzetto B, Delezay O, Hamzeh-Cognasse H, Lawrence P, Lucht F, Bourlet T. Place des microbicides vaginaux dans la prévention de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine. *Antibiotiques.* juin 2010;12(2):90-99.
9. Huang C, Tang M, Zhang M-Y, Majeed S, Montabana E, Stanfield RL, et al. Structure of a V3-Containing HIV-1 gp120 Core. *Science.* 11 nov 2005;310(5750):1025-1028.
10. Wyatt R, Moore J, Accola M, Desjardin E, Robinson J, Sodroski J. 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.* sept 1995;69(9):5723-5733.
11. Resch W, Hoffman N, Swanstrom R. Improved success of phenotype prediction of the human immunodeficiency virus type 1 from envelope variable loop 3 sequence using neural networks. *Virology.* 15 sept 2001;288(1):51-62.

12. Jensen MA, Li F-S, Van 't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He H-X, 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. *Journal of Virology*. 25 nov 2003;77(24):13376-13388.
13. Dolisi G. Biotop Physiopathologie du SIDA - Evolution de la maladie [Internet]. [cité 5 janv 2013]. Disponible sur: http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_evolution.htm
14. Apostolova N, Blas-García A, Esplugues JV. Mitochondrial interference by anti-HIV drugs: mechanisms beyond Pol- γ inhibition. *Trends in Pharmacological Sciences*. déc 2011;32(12):715-725.
15. 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*. 20 juin 1996;381(6584):667-673.
16. Letendre S, Marquie-Beck J, Capparelli E, Best B, Clifford D, Collier AC, et al. Validation of the CNS Penetration-Effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system. *Arch. Neurol.* janv 2008;65(1):65-70.
17. Letendre S. Correlates of Time-to-Loss-of-Viral-Response in CSF and Plasma in the CHARTER Cohort (CROI 2010) [Internet]. 2010 [cité 17 janv 2013]. Disponible sur: <http://hnrc.hivresearch.ucsd.edu>
18. Référentiel National, Collège des enseignants de Neurologie, version 30/08/02. Complications neurologiques de l'infection par le VIH et l'herpès virus[En ligne]. <http://www.univ-rouen.fr/>
19. ANOFEL. Parasitoses et mycoses 2ème edition | Livre | Elsevier Masson. MASSON; 2010.
20. Naggara O, Létourneau-Guillon L, Mellerio C, Belair M, Pruvo J-P, Leclerc X, et al. IRM de diffusion et encéphale. *Journal de Radiologie*. mars 2010;91(3, Part 2):329-351.
21. Gaillard F. Primary CNS Lymphoma (HIV +ve) - B-cell | Image | Radiopaedia.org [Internet]. [cité 6 janv 2013]. Disponible sur: <http://radiopaedia.org/images/20999>
22. Neuroradiologie Grenoble. Cas cliniques [Internet]. [cité 6 janv 2013]. Disponible sur: http://neuro.radioanatomie.com/001_medecins/001_cas_cliniques/cas-clinique-neuroradio-248.html
23. McArthur JC, Hoover DR, Bacellar H, Miller EN, Cohen BA, Becker JT, et al. Dementia in AIDS patients: incidence and risk factors. Multicenter AIDS Cohort Study. *Neurology*. nov 1993;43(11):2245-2252.
24. Criton C. Sida et complications neurologiques : Ne pas banaliser la plainte cognitive chez le patient infecté par le VIH - SidaSciences[En ligne] [Internet]. [cité 6 janv 2013]. Disponible sur: <http://sidasciences.inist.fr/?Sida-et-complications>

25. Moulignier A. [Dementia complex due to HIV disease and aging]. *Psychol Neuropsychiatr Vieil*. sept 2007;5(3):193-207.
26. Alsalam H. HIV encephalitis | Image | Radiopaedia.org [Internet]. [cité 12 janv 2013]. Disponible sur: <http://radiopaedia.org/images/141306>
27. Letvin NL. Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nature Reviews Immunology*. déc 2006;6(12):930-939.
28. Nickle DC, Shriner D, Mittler JE, Frenkel LM, Mullins JI. Importance and detection of virus reservoirs and compartments of HIV infection. *Curr. Opin. Microbiol.* août 2003;6(4):410-416.
29. Nickle DC, Jensen MA, Shriner D, Brodie SJ, Frenkel LM, Mittler JE, et al. Evolutionary indicators of human immunodeficiency virus type 1 reservoirs and compartments. *J. Virol.* mai 2003;77(9):5540-5546.
30. Tachet A, Dulioust E, Salmon D, De Almeida M, Rivalland S, Finkielsztejn L, et al. Detection and quantification of HIV-1 in semen: identification of a subpopulation of men at high potential risk of viral sexual transmission. *AIDS*. 7 mai 1999;13(7):823-831.
31. Rouzioux C, Avettand-Fénoël V. La quantification de l'ADN-VIH : où, comment, pourquoi ? *Virologie*. 1 mai 2009;13(2):15-23.
32. Poles MA, Boscardin WJ, Elliott J, Taing P, Fuerst MMP, McGowan I, et al. Lack of decay of HIV-1 in gut-associated lymphoid tissue reservoirs in maximally suppressed individuals. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* sept 2006;43(1):65-68.
33. Belmonte L, Olmos M, Fanin A, Parodi C, Baré P, Concetti H, et al. The intestinal mucosa as a reservoir of HIV-1 infection after successful HAART. *AIDS*. 1 oct 2007;21(15):2106-2108.
34. Avettand-Fénoel V, Hocqueloux L, Müller-Trutwin M, Prazuck T, Melard A, Chaix M-L, et al. Greater diversity of HIV DNA variants in the rectum compared to variants in the blood in patients without HAART. *J. Med. Virol.* sept 2011;83(9):1499-1507.
35. Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Learn GH, Fouda GG, Kang HH, Mahlokozera T, et al. Origin and evolution of HIV-1 in breast milk determined by single-genome amplification and sequencing. *J. Virol.* mars 2011;85(6):2751-2763.
36. Gantt S, Carlsson J, Heath L, Bull ME, Shetty AK, Mutsvangwa J, et al. Genetic analyses of HIV-1 env sequences demonstrate limited compartmentalization in breast milk and suggest viral replication within the breast that increases with mastitis. *J. Virol.* oct 2010;84(20):10812-10819.
37. Haase AT. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature*. 11 mars 2010;464(7286):217-223.

38. Bull M, Learn G, Genowati I, McKernan J, Hitti J, Lockhart D, et al. Compartmentalization of HIV-1 within the female genital tract is due to monotypic and low-diversity variants not distinct viral populations. *PLoS ONE*. 2009;4(9):e7122.
39. Sullivan ST, Mandava U, Evans-Strickfaden T, Lennox JL, Ellerbrock TV, Hart CE. Diversity, Divergence, and Evolution of Cell-Free Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Vaginal Secretions and Blood of Chronically Infected Women: Associations with Immune Status. *J Virol*. août 2005;79(15):9799-9809.
40. Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM, Dal Canto MC, Pezeshkpour GH, Yungbluth M, et al. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science*. 5 sept 1986;233(4768):1089-1093.
41. Kramer-Hämmerle S, Rothenaigner I, Wolff H, Bell JE, Brack-Werner R. Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Virus Res*. août 2005;111(2):194-213.
42. Misra A, Ganesh S, Shahiwala A, Shah SP. Drug delivery to the central nervous system: a review. *J Pharm Pharm Sci*. août 2003;6(2):252-273.
43. Bingham R, Ahmed N, Rangi P, Johnson M, Tyrer M, Green J. HIV encephalitis despite suppressed viraemia: a case of compartmentalized viral escape. *Int J STD AIDS*. oct 2011;22(10):608-609.
44. plasmid2-textthr.gif (Image GIF, 584x608 pixels) - Redimensionnée (52%)[En ligne] [Internet]. [cité 5 janv 2013]. Disponible sur: <http://www.scq.ubc.ca/images/plasmid2-textthr.gif>
45. Centre de Vulgarisation de la Connaissance (CVC), unité de la Faculté des Sciences de l'Université Paris-Sud XI. Clonage : quelques clés pour comprendre...[En ligne] [Internet]. [cité 5 janv 2013]. Disponible sur: http://www.clonage.u-psud.fr/index.php?option=com_content&view=article&id=211&Itemid=30
46. Palmer S, Kearney M, Maldarelli F, Halvas EK, Bixby CJ, Bazmi H, et al. Multiple, linked human immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutations in treatment-experienced patients are missed by standard genotype analysis. *J. Clin. Microbiol*. janv 2005;43(1):406-413.
47. Salazar-Gonzalez JF, Bailes E, Pham KT, Salazar MG, Guffey MB, Keele BF, et al. Deciphering human immunodeficiency virus type 1 transmission and early envelope diversification by single-genome amplification and sequencing. *J. Virol*. avr 2008;82(8):3952-3970.
48. Keele BF. Identifying and characterizing recently transmitted viruses. *Curr Opin HIV AIDS*. juill 2010;5(4):327-334.
49. Duncan CJA, Sattentau QJ. Viral determinants of HIV-1 macrophage tropism. *Viruses*. nov 2011;3(11):2255-2279.

50. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* oct 2011;28(10):2731-2739.
51. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 27 juill 2004;101(30):11030-11035.
52. Rossi F, Querido B, Nimmagadda M, Cocklin S, Navas-Martín S, Martín-García J. The V1-V3 region of a brain-derived HIV-1 envelope glycoprotein determines macrophage tropism, low CD4 dependence, increased fusogenicity and altered sensitivity to entry inhibitors. *Retrovirology.* 6 oct 2008;5(1):89.
53. Schnell G, Price RW, Swanstrom R, Spudich S. Compartmentalization and clonal amplification of HIV-1 variants in the cerebrospinal fluid during primary infection. *J. Virol.* mars 2010;84(5):2395-2407.
54. Slatkin M, Maddison WP. A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles. *Genetics.* nov 1989;123(3):603-613.
55. Blackard JT. HIV compartmentalization: a review on a clinically important phenomenon. *Curr. HIV Res.* mars 2012;10(2):133-142.
56. Zárte S, Pond SLK, Shapshak P, Frost SDW. Comparative Study of Methods for Detecting Sequence Compartmentalization in Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* 15 juin 2007;81(12):6643-6651.
57. Harrington PR, Schnell G, Letendre SL, Ritola K, Robertson K, Hall C, et al. Cross-sectional characterization of HIV-1 env compartmentalization in cerebrospinal fluid over the full disease course. *AIDS.* 15 mai 2009;23(8):907-915.
58. Goodenow MM, Collman RG. HIV-1 coreceptor preference is distinct from target cell tropism: a dual-parameter nomenclature to define viral phenotypes. *Journal of Leukocyte Biology.* 21 août 2006;80(5):965-972.
59. Jayakumar P, Berger I, Autschbach F, Weinstein M, Funke B, Verdin E, et al. Tissue-resident macrophages are productively infected ex vivo by primary X4 isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* avr 2005;79(8):5220-5226.
60. Hoffman NG, Seillier-Moiseiwitsch F, Ahn J, Walker JM, Swanstrom R. Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop. *J. Virol.* avr 2002;76(8):3852-3864.
61. Ritola K, Robertson K, Fiscus SA, Hall C, Swanstrom R. Increased human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) env compartmentalization in the presence of HIV-1-associated dementia. *J. Virol.* août 2005;79(16):10830-10834.

ANNEXE: PROTOCOLE DU SGA



Centre National de Référence-VIH

SINGLE GENOME AMPLIFICATION OF HIV-1 ENVELOPE

Amorces :

ATG GCA GGA AGA AGC GGA RRC	EXT M5
CTT RTA AGT CAT TGG TCT TAA AGG YAC	EXT M3
AATTCTCGAGAATTCAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATG	INT M5 XE (<u>XhoI</u> -EcoRI)
GGCCACGCGTCTAGACTACTTTTGGACCACTTGCCMCCCAT	INT M3 MX (<u>MluI</u> -XbaI)

- I. **Extraction ARN** - kit Qiagen (QIAamp Viral RNA Mini Kit ref : 52904) à partir de 280 µl de plasma (suivre protocole fabriquant) ou EZ1
2. **Synthèse ADNc** - kit Invitrogen (Superscript III First strand synthesis system for RT-PCR ref : 18080-051)
3. **PCR1/PCR2** - kit Invitrogen (Platinum PCR Supermix HIGH FI ref : 34353)

1- Synthèse d'ADNc : 3 tubes par échantillons

Dénaturation de l'ARN

Nb d'échantillons	µl		RNA Template
dNTP (10mM)	2	10	16µl
		20	
Amorce EXT M3 (dil 1/50) 2µM	2	20	
	4	40	

- Distribuer 4 µl de mix par tube
- Ajouter 16 µl d'ARN

Synthèse d'ADNc

Ajouter 20 µl de ce mix aux 20 µl d'ARN dénaturé

Nb déchantillons	µl	10
MgCl2 25mM	8	80
10X Buffer Mix	4	40
DTT(100mM)	4	40
RNase OUT 40u/µl	2	20
SSIII 200u/µl	2	20

→ Volume final: 40 µl

-Agiter et incuber 60 min à 50°C

-Ajouter dans chaque tube 1µl de SSIII

60 min à 55°C

15 min à 70°C et poser dans la glace

Prog 15

Pooler les 3 aliquots et effectuer la recherche de la dilution SGA. Volume total d'ADNc : 120µl

2- Recherche de la dilution SGA

Nombre de dilutions testées : 4 (en fonction de la charge virale. EX : 1/5, 1/10, 1/15, 1/20)

Nombre de points par dilution : 10

A/ Préparer les dilutions d'ADNc :

PCR1

Pur

1/5 10µl d'ADNc pur dans 40µl d'eau
1/10 20 µl d'ADNc pur dans 180 µl d'eau
1/15 20 µl d'ADNc pur dans 280 µl d'eau
1/20 20µl d'ADNc pur dans 380 µl d'eau

Volume disponible après dilution et

50 µl
40 µl
190 µl
290 µl
390 µl

B/ First round amplification reaction : PCR1

-Préparer 1 mix pour chaque point de dilution (4 mix)

Nb d'échantillons	μL	11	Volume en μl de	x4
Platinum SuperMix	18	198		
EXT M5 (10mM)	0,5	5,5		
EXT M3 (10μM)	0,5	5,5		
	19	209	11	

Ne pas distribuer. Emmener les mix dans la pièce « révélation ».

Ajouter dans chaque mix 10μl d'ADNc aux différentes dilutions.

Distribuer 20μl par (mix-ADNc) par tube (10 tubes).

Thermocycleur

2 min 94°C

15 s 94°C

30 s 55°C

3 min 68°C

35 cycles Prog 16

10 min 68°C

Hold 4°C

C/ Second round amplification reaction : PCR2

Préparer un mix pour 40 tubes

Nb d'échantillons	μL	45
Platinum SuperMix	18	810
INT M5 (10mM)	0,5	22,5
INT M3 (10μM)	0,5	22,5
	19	855

Distribuer **19μl de mix par tube.**

Dans la pièce « révélation », ajouter **1μl par tube de produit de PCR1** à l'aide d'une pipette multicanaux.

Thermocycleur

2 min 94°C

15 s 94°C

30 s 55°C

3 min 68°C

35 cycles

Prog 16

10 min 68°C

Hold 4°C

D/ Résultat du gel

On recherché le point de dilution donnant **20% de positivité**.

Si nécessaire, refaire des dilutions supplémentaires ou intermédiaires.

Quand la dilution est trouvée, lancer la plaque 96 puits.

3- PCR nichée pour une plaque de 96 puits

FIRST ROUND AMPLIFICATION REACTION

Préparer le mix PCR1 dans la salle du mix, mais **ne pas distribuer**. Emmener le mix et la plaque dans la pièce « révélation ».

Déposer 19µl de mix dans 2 puits pour les témoins +(19µl de mix + 1µl d'ADNc pur)
-(19µl de mix + 1µl d'eau)

Dans le reste du mix, ajouter 99µl d'ADNc dilué

Distribuer dans tous les puits restant (94), 20 µl du mélange mix-ADNc dilué

Nb d'échantillons	1 plt µL	n+1 101	Volume en µl de
Platinum SuperMix	18	1818	
envB5out (10mM)	0,5	50,5	
envB3out (10µM)	0,5	50,5	
	19	1919	101

Distribuer 20µl par tube de mélange Mix/DNAc

↑
ajouter l'ADNc au mix
↓

Thermocycleur

2 min	94°C		
15 s	94°C	35 cycles	Prog 16
30 s	55°C		
3 min	68°C		
10 min	68°C		
Hold	4°C		

SECOND ROUND (Nested) PCR REACTION

Préparer le mix PCR2 dans la pièce du mix, mais **ne pas distribuer**. Emmener le tube et la plaque dans la salle « révélation ».

Distribuer 19µl de mix2 dans chaque puits et ajouter avec une pipette multicanaux 1µl de PCR1.

Nb d'échantillons	µL	100	Volume en µl de
Platinum SuperMix	18	1800	
Amorce IntM5XE (10mM)	0,5	50	
Amorce IntM3MX (10µM)	0,5	50	
	19	1900	100

Distribuer 19µl par tube
Ajouter 1µl de produit de PCR1

Thermocycleur

2 min	94°C		
15 s	94°C	35 cycles	Prog 16
30 s	55°C		
3 min	68°C		
10 min	68°C		
Hold	4°C		

GEL : 3-5 µl de produit de PCR2

Académie d'Orléans – Tours

Université François-Rabelais

Faculté de Médecine de TOURS

BEZ Stéphanie

Thèse n°

100 pages – 41 figures - 5 tableaux

Résumé :

La compartimentation du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est le reflet d'une évolution indépendante du virus dans différents organes ou tissus. Le neurotropisme du VIH a pour conséquence l'apparition de pathologies neurologiques, y compris chez des patients séropositifs apparemment en succès thérapeutique. Sous une pression de sélection immunitaire moindre et du fait d'une moins bonne pénétration de certaines molécules anti-rétrovirales, les variants viraux qui se développent au niveau du système nerveux central peuvent diverger de la population virale plasmatique et notamment présenter des mutations de résistance aux antirétroviraux différentes de celles des variants sanguins.

L'objectif de notre travail était de réaliser une étude exploratoire en utilisant une technique d'isolement de clones viraux appelée « Single Genome Amplification » (SGA) à la problématique de la compartimentation. Le SGA suivi du séquençage nucléotidique a été appliqué à l'étude du liquide céphalo-rachidien (LCR) et du plasma de quatre patients VIH+ atteints de troubles neurologiques divers. Une analyse phylogénétique a ensuite permis de répondre à la question de la compartimentation entre LCR et plasma. Des profils hétérogènes avec compartimentation entre LCR et plasma ont été constatés chez deux patients sur quatre, suggérant différents mécanismes ou implications du VIH dans les pathologies neurologiques associées à l'infection par ce virus.

Mots clés :

- Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)
- «Single genome amplification» (SGA)
- Amplification de génomes uniques
- Compartimentation
- Système nerveux central

Jury :

Président : **Monsieur le Professeur GOUDEAU Alain**

Membres : **Monsieur le Docteur BASTIDES Frédéric**
Madame le Docteur GAUDY-GRAFFIN Catherine
Monsieur le Professeur MEREGHETTI Laurent
Monsieur le Professeur BARIN Francis

Date de la soutenance : 15 février 2013