



Année 2021

N° de thèse : 17/19 CSVS

Thèse de doctorat national

pour obtenir le grade de Docteur Es-Sciences
de l'Université Mohammed V de Rabat

Filière : Biologie médicale, pathologie humaine
et expérimentale et environnement

Présentée et soutenue publiquement

Le 03/12/2021

par

Fatima Zahra FARISSI

Née le 23 Février 1988 à Casablanca



Sous le thème :

**Etude de la prédisposition génétique à l'infection par le VIH-1
chez une cohorte marocaine : influence des polymorphismes CCR5-Δ32
(rs333), CCR2 +190 G>A (rs1799864) & SDF1 +801 G>A (rs1801157)**

JURY:

Pr M. ADNAOUI	MD, Professeur de Médecine Interne, FMPR, Université Mohammed V- Rabat	Président
Pr S. ZOUHAIR	PES, FMPM, Université Cadi Ayyad-Marrakech	Rapporteur
Pr H. EL ANNAZ	Pr Agrégé, FMPR, Université Mohammed V- Rabat	Rapporteur
Pr E. EL FAHIME	PES, CNRST, Université Mohammed V- Rabat	Rapporteur
Pr N. HJIRA	MD, PES, FMPR, Université Mohammed V, Rabat	Examineur
Pr A. BOUHOUCHE	PES, FMPR, Université Mohammed V, Rabat	Examineur
Pr A. BELMEKKI	MD, PES, FMPR, Université Mohammed V, Rabat	Directeur de thèse



Année 2021

N° de thèse : 17/19 CSVS

Thèse de doctorat national

pour obtenir le grade de Docteur Es-Sciences
de l'Université Mohammed V de Rabat

Filière : Biologie médicale, pathologie humaine
et expérimentale et environnement

Présentée et soutenue publiquement

Le 03/12/2021

par

Fatima Zahra FARISSI

Née le 23 Février 1988 à Casablanca



Sous le thème :

**Etude de la prédisposition génétique à l'infection par le VIH-1
chez une cohorte marocaine : influence des polymorphismes CCR5-Δ32
(rs333), CCR2 +190 G>A (rs1799864) & SDF1 +801 G>A (rs1801157)**

JURY:

Pr M. ADNAOUI	MD, Professeur de Médecine Interne, FMPR, Université Mohammed V- Rabat	Président
Pr S. ZOUHAIR	PES, FMPM, Université Cadi Ayyad-Marrakech	Rapporteur
Pr H. EL ANNAZ	Pr Agrégé, FMPR, Université Mohammed V- Rabat	Rapporteur
Pr E. EL FAHIME	PES, CNRST, Université Mohammed V- Rabat	Rapporteur
Pr N. HJIRA	MD, PES, FMPR, Université Mohammed V, Rabat	Examineur
Pr A. BOUHOUCHE	PES, FMPR, Université Mohammed V, Rabat	Examineur
Pr A. BELMEKKI	MD, PES, FMPR, Université Mohammed V, Rabat	Directeur de thèse

AU NOM D'ALLAH
LE CLEMENT, LE MISERICORDIEUX

ETUDE DE LA PRÉDISPOSITION GÉNÉTIQUE À
L'INFECTION PAR LE VIH-1 CHEZ UNE COHORTE
MAROCAINE : INFLUENCE DES POLYMORPHISMES
CCR5-Δ32 (RS333), *CCR2 +190 G>A* (RS1799864)
& *SDF1 +801 G>A* (RS1801157)

AVANT-PROPOS

Cette thèse rentre dans le cadre de l'obtention du diplôme de doctorat national, au Centre d'Etudes Doctorales des Sciences de la Vie et de la Santé, de la faculté de médecine et de pharmacie de Rabat (FMPR), Université Mohammed V de Rabat, filière « Biologie médicale, pathologie humaine et expérimentale et environnement ».

C'est le fruit d'une collaboration entre notre équipe de recherche en virologie moléculaire et oncobiologie du centre GENOPATH et la Plateforme Génomique Fonctionnelle des UATRS au CNRST.

Elle étudie les facteurs génétiques impliqués dans la résistance naturelle au VIH-1.

L'idée de ce projet de recherche est venue suite à l'absence des données sur l'impact de ces facteurs sur l'infection par le VIH-1 au Maroc. Une recherche bibliographique approfondie a été menée pour faire le choix des polymorphismes génétiques à étudier.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés sous la direction du Monsieur Saad MRANI, Professeur de Virologie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de l'Université Mohammed V-Rabat, et responsable de notre équipe de recherche.

Les manipulations ont été réalisées au laboratoire de virologie de l'hôpital militaire de Rabat et la plateforme génomique fonctionnelle UATRS au CNRST.

DEDICACES

→ À mes très chers parents : *Mohamed FARISSI et Zohra KORAIBAN*

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

→ À mes très chers (es) frère et sœurs : *Youssef, Rabab & Kawtar*

Je ne peux exprimer à travers ces lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers toi mon cher frère docteur et vous mes chères sœurs. Puisse l'amour et la fraternité nous unissent pour toujours et à jamais.

→ À mon très cher mari : *Hicham Haouari*

Merci pour ton soutien et tes conseils qui m'ont permis de mieux avancer. Merci d'être là.

→ À mon très cher oncle *Mohamed FAHIM* :

*Merci pour ta présence dans notre vie,
Merci pour ta connexion spirituelle avec mon père.*

→ À toute ma famille

REMERCIEMENTS

- ▶ À NOTRE MAITRE ET EX. DIRECTEUR DE THESE : monsieur **Saad MRANI**, professeur de virologie. Je suis ravie d'avoir travaillé en votre compagnie. Car outre votre appui scientifique, vous avez toujours été là pour me coacher, me guider, m'inspirer, me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse. Et en dépit des grandes difficultés et des maints obstacles que j'ai pu rencontrer, vous m'avez toujours prodigué encouragements et conseils et avez su porter un intérêt constant et particulier à mon travail. La qualité de votre encadrement scientifique m'a permis de mener à bien ce travail. Vous m'avez donné votre temps et je pense que c'est le cadeau le plus précieux de tous. Vous dire seulement merci ne peut jamais rembourser tout le dur travail que vous avez investi en moi. Veuillez bien trouver dans ce travail, un modeste témoignage de mon profond respect et de mon entière reconnaissance. Merci infiniment mon colonel
- ▶ À monsieur le PRESIDENT du Jury : **M. ADNAOUI**, professeur de médecine interne à la Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V- Rabat. C'est pour moi un grand honneur de vous voir présider cette thèse. Ce travail est une occasion pour moi d'apprécier vos qualités humaines et professionnelles. Qu'il me soit permis de vous remercier, cher maître, et de vous exprimer mon estime et profond respect.
- ▶ À NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE : monsieur **Abdelkader BELMEKKI**, MD, PES, FMPR, Université Mohammed V, Rabat qui a bien voulu être directeur de ma thèse.
- ▶ À NOS MAITRES ET RAPPORTEURS DE THESE : monsieur **S. ZOUHAIR**, professeur de Microbiologie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Cadi Ayyad-Marrakech, monsieur **H. EL ANNAZ**, professeur de microbiologie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V- Rabat, et monsieur **El Mostapha EL FAHIME**, professeur de Biologie Moléculaire et responsable de la Plateforme Génomique Fonctionnelle des UATRS au CNRST de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

- ▶ À NOS MAITRES ET EXAMINATEURS DE THESE : monsieur **N. HJIRA**, MD, PES, FMPR, Université Mohammed V et monsieur **A. BOUHOUCHE**, PES, FMPR, Université Mohammed V pour avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.

- ▶ À monsieur **J. TAOUFIK** ex DIRECTEUR DU CENTRE D'ETUDES DOCTORALES des Sciences de la Vie et de la Santé et le professeur **T. DAKKA**, nouveau directeur du CEDOC. Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein du centre doctoral et de m'avoir permis d'effectuer cette thèse dans de bonnes conditions.

- ▶ AUX MEMBRES DE L'EQUIPE DE LA PLATEFORME GENOMIQUE FONCTIONNELLE des UATRS, en particulier, l'ingénieur **S. ELALAOUI AMINE** et le professeur **M. MELLOUL** : je suis très reconnaissante pour votre collaboration et disponibilité.

- ▶ À monsieur **My AbdelAziz ELALAOUI**, professeur membre de l'équipe de Plateforme Génomique Fonctionnelle des UATRS. Je tiens à vous remercier vivement, professeur, pour votre disponibilité, votre patience, ainsi que pour vos efforts personnels pour mener à terme ce travail, et pour m'avoir fait profiter de vos compétences scientifiques et techniques. Quoique je dise, les mots ne sauraient exprimer ma profonde reconnaissance.

- ▶ A **Najwa ALAOUI & Hassan BOULAHYAOU**. Je suis si reconnaissante d'avoir deux amis comme vous. Ma plus profonde gratitude pour toute votre aide. Cela a été un plaisir de partager ces moments avec vous. Un immense Merci chers amis.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	4
DEDICACES	5
REMERCIEMENTS	6
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	12
ملخص	14
RESUME	15
ABSTRACT	16
LISTE D'ABREVIATIONS	17
LISTE DES TABLEAUX	21
LISTE DES FIGURES.....	22
LISTE DES ANNEXES	24
INTRODUCTION GENERALE.....	25
OBJECTIFS DE THESE	29
PREMIERE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	31
CHAPITRE I : LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE « VIH »	32
<i>I - HISTORIQUE ET DECOUVERTE.....</i>	<i>33</i>
<i>II - ORIGINE.....</i>	<i>34</i>
<i>III - CLASSIFICATION TAXONOMIQUE</i>	<i>35</i>
<i>IV - CARACTERISTIQUES GÉNÉRALES DU VIH-1</i>	<i>35</i>
IV.1 - Morphologie et structure protéique.....	35
IV.2 - Organisation génomique.....	36
IV.2.1 - Gènes structuraux	37
IV.2.2 - Gènes régulateurs et accessoires.....	39
IV.3 - Les protéines virales.....	39
IV.3.1 - Les protéines structurales	39
IV.3.2 - Les protéines enzymatiques.....	46
IV.3.3 - Les protéines régulatrices	51
IV.3.4 - Les protéines accessoires	54
<i>V - INTERACTION VIH-1/ CELLULE HÔTE</i>	<i>61</i>
V.1 - Les cellules cibles	61
V.2 - Récepteurs du VIH-1	63
V.2.1 - Le récepteur cellulaire principal : CD4	63
V.2.1.1 - Structure.....	63
V.2.1.2 - Expression et fonctions biologiques.....	65
V.2.1.3 - Le rôle du CD4 dans l'infection au VIH-1	66
V.2.2 - Les corécepteurs majeurs	67
V.2.2.1 - Le récepteur CCR5.....	68

V.2.2.1.1 - Découverte et fonctions biologiques.....	68
V.2.2.1.2 - Structure.....	69
V.2.2.1.3 - L'expression du CCR5 et le VIH-1.....	70
V.2.2.2 - Le récepteur CXCR4.....	71
V.2.2.2.1 - Découverte.....	71
V.2.2.2.2 - Structure.....	72
V.2.2.2.3 - Expression.....	73
V.2.2.2.4 - La chimiokine SDF1.....	75
V.2.2.2.4.1 - Structure.....	75
V.2.2.2.4.2 - Expression et régulation de l'activité du SDF1.....	77
V.2.2.2.4.3 - Fonctions biologiques de l'axe SDF1 / CXCR4.....	79
V.2.2.2.4.4 - SDF1 et l'infection par le VIH-1.....	80
V.2.3 - Les corécepteurs alternatifs.....	81
V.2.3.1 - Le récepteur CCR2.....	81
V.2.3.1.1 - Découverte et Structure.....	81
V.2.3.1.2 - Expression.....	82
V.2.3.1.3 - Ligands associés et fonctions.....	83
V.2.3.1.4 - L'AXE CCL2 / CCR2 et l'infection par le VIH-1.....	84
V.3 - Tropisme viral.....	86
V.3.1 - Classification et nomenclature.....	86
V.3.2 - Conversion phénotypique R5-X4.....	87
V.4 - Réplication virale.....	89
V.4.1 - La phase précoce.....	90
V.4.1.1 - L'entrée du VIH-1 dans la cellule cible.....	90
V.4.1.1.1 - L'adhésion du virus à la cellule hôte :.....	91
V.4.1.1.2 - La liaison de l'ENV au récepteur CD4.....	91
V.4.1.1.3 - La liaison aux corécepteurs.....	92
V.4.1.1.4 - La fusion membranaire.....	97
V.4.1.2 - La décapsidation.....	98
V.4.1.3 - La transcription inverse.....	98
V.4.1.4 - L'import nucléaire et l'intégration.....	100
V.4.2 - La phase tardive.....	102
V.4.2.1 - La transcription et la traduction.....	102
V.4.2.2 - L'assemblage et le bourgeonnement.....	102
V.4.2.3 - La maturation virale.....	104
VI - VARIABILITE GENETIQUE DU VIH-1.....	106
VI.1 - Origine du VIH-1 et de sa diversité génétique.....	106
VI.1.1 - Mécanismes générant la variabilité génétique.....	108
VI.1.2 - Distribution géographique des sous-types, des CRF et des URF du VIH-1.....	108
VI.1.3 - Conséquences de la variabilité génétique.....	111
CHAPITRE II : L'INFECTION AU VIH-1/SIDA.....	116
I - MODALITES DE TRANSMISSION.....	117
II - EPIDEMIOLOGIE : SITUATION ACTUELLE.....	118
II.1 - Au niveau mondial.....	118
II.2 - Au Maroc.....	119
III - PHYSIOPATHOLOGIE.....	120
III.1 - Progression de l'infection in vivo.....	120
III.2 - Classification clinique de l'infection.....	123
IV - DIAGNOSTIC.....	125
IV.1 - Les marqueurs biologiques de l'infection par le VIH-1.....	125
IV.2 - Tests de dépistage.....	127
IV.2.1 - Détection des anticorps.....	128
IV.2.2 - Détection de virus.....	129
V - SUIVI DES PATIENTS.....	131
VI - TRAITEMENT ANTIRETROVIRAL.....	132

VI.1 - Principe et objectifs	133
VI.2 - Classes thérapeutiques	133
VI.2.1 - Les inhibiteurs de la transcriptase inverse	134
VI.2.2 - Inhibiteurs de l'Intégrase (INI)	135
VI.2.3 - Inhibiteurs de la Protéase (IP)	135
VI.2.4 - Inhibiteurs d'entrée	135
CHAPITRE III : RESISTANCE NATURELLE A L'INFECTION AU VIH-1	137
I - FACTEURS INFLUENÇANT LA SUSCEPTIBILITE AU VIH-1 ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE.....	138
I.1 - Les facteurs viraux	139
I.1.1 - Impact de la variabilité du VIH-1	139
I.1.2 - Impact de la coinfection avec le virus GB-C.....	140
I.2 - Facteurs de l'hôte	140
I.2.1 - Les facteurs génétiques	140
I.2.1.1 - Gènes codant pour des récepteurs de surface cellulaire et de ses ligands	141
I.2.1.1.1 - Le gène <i>CCR5</i>	141
I.2.1.1.1.1 - Le polymorphisme génétique <i>CCR5-Δ32</i>	141
I.2.1.1.1.2 - Autres mutations de <i>CCR5</i>	145
I.2.1.1.2 - Le gène <i>CCR2</i>	147
I.2.1.1.2.1 - Le polymorphisme <i>CCR2 +190 G>A (rs1799864)</i>	148
I.2.1.1.3 - Le gène <i>CXCR4</i>	149
I.2.1.1.1 - Le gène <i>CX3CR1</i>	150
I.2.1.1.2 - Le gène <i>RANTES</i>	151
I.2.1.1.3 - Le gène <i>SDF1</i>	152
I.2.1.1.3.1 - Le polymorphisme <i>SDF1 +801 G>A (rs1801157)</i>	152
I.2.1.2 - Les gènes du HLA	154
I.2.1.3 - Autres gènes liés à l'immunité.....	155
I.2.2 - Facteurs démographiques et clinico-biologiques	159
I.2.3 - Facteurs psychosociaux	160
DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX DE THESE.....	161
CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES	162
I - SCHEMA DE L'ETUDE.....	163
II - POPULATION ETUDIEE.....	163
II.1 - Groupe des cas	163
II.2 - Groupe des témoins	163
II.3 - Effectif analysé	164
II.4 - Considération éthique.....	164
III - METHODES	164
III.1 - Prélèvements sanguins.....	164
III.2 - Quantification de l'ARN viral et détermination du taux des lymphocytes T CD4+	164
III.3 - Extraction d'ADN génomique.....	165
III.4 - Dosage et contrôle de la pureté de l'ADN.....	165
III.5 - Génotypage du polymorphisme <i>CCR5-Δ32 (rs333)</i>	166
III.6 - Génotypage du polymorphisme <i>CCR2 +190 G>A (rs1799864)</i>	167
III.7 - Génotypage du polymorphisme <i>SDF1 +801 G>A (rs1801157)</i>	170
III.8 - Evaluation de l'évolution immunovirologique	171
III.9 - Analyse statistique	171
CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION	173
I - Le polymorphisme génétique <i>CCR5-Δ32 (rs333)</i> et son association avec la susceptibilité au VIH-1 et la progression de la maladie chez les patients sous traitement antirétroviral	174
I.1 - Contexte de l'étude	174

I.2 - Résultats	174
I.2.1 - Caractéristiques démographiques et cliniques	174
I.2.2 - Distribution génotypique et allélique du polymorphisme <i>CCR5-Δ32</i>	176
I.2.3 - Association entre le polymorphisme <i>CCR5-Δ32</i> et l'origine ethnique des participants à l'étude	177
I.2.4 - Association entre le polymorphisme <i>CCR5-Δ32</i> et la progression de la maladie	178
I.3 - Discussion	179
I.4 - Conclusion	181
I.5 - Publication	181
<i>II - Le polymorphisme génétique CCR2+190 G>A (rs1799864) et son impact sur la susceptibilité au VIH-1 et les marqueurs immunovirologiques prédictifs de la progression de l'infection chez les patients sous traitement antirétroviral.....</i>	<i>188</i>
II.1 - Contexte de l'étude	188
II.2 - Résultats	188
II.2.1 - Caractéristiques démographiques et cliniques	188
II.2.2 - Distribution génotypique et allélique du polymorphisme <i>CCR2 +190 G>A</i>	190
II.2.3 - Association entre le polymorphisme <i>CCR2 +190 G>A</i> et l'ethnie	192
II.2.4 - Association entre le polymorphisme <i>CCR2 +190 G>A</i> et les caractéristiques clinique et immunovirologiques du groupe des cas	192
II.2.5 - Association entre le polymorphisme <i>CCR2 +190 G>A</i> et l'évolution immunovirologique	193
II.3 - Discussion	195
II.4 - Conclusion	197
II.5 - Publication	198
<i>III - Le polymorphisme génétique SDF1 +801 G>A (rs1801157) et son effet sur la susceptibilité au VIH-1 et l'évolution immunovirologique prédictive de la progression de la maladie chez les patients sous traitement antirétroviral</i>	<i>206</i>
III.1 - Contexte de l'étude	206
III.2 - Résultats	206
III.2.1 - Caractéristiques de la population étudiée	206
III.2.2 - Distribution génotypique et allélique du polymorphisme <i>SDF1 +801 G>A</i>	208
III.2.3 - Association du polymorphisme <i>SDF1 +801 G>A</i> avec l'ethnie et les paramètres immunovirologiques et clinique des patients	210
III.2.4 - Association entre le SNP <i>SDF1 +801 G>A</i> et l'évolution immuno-virologique	212
III.3 - Discussion	215
III.4 - Conclusion	222
III.5 - Publication	222
CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES	224
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	228
ANNEXES.....	275

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Articles originaux publiés dans une revue scientifique internationale indexée :

FARISSI, FZ., El Annaz H, El Alaoui M. A, Elkochri S, Tagajdid M. R, Abi R, Frikh R, El Fahime EM, Hjira N, Mrani S. **Investigation of *CCR5-Δ32* (rs333) genetic polymorphism frequency and its relationship with HIV-1 susceptibility and disease progression: A Moroccan case-control study.** Gene Reports. 2019; 15, 100391.

FARISSI FZ., El Annaz H, Melloul M, El Alaoui MA, Tagajdid MR, Abi R, Alaoui Amine S, Marda A, Boui M, El Fahime EM, Mrani S. **Analysis of the *CCR2-64I* (rs1799864) genetic polymorphism distribution and its effect on the risk of HIV-1 infection and immunovirological outcomes in Moroccan ART-treated individuals.** Gene Reports. 2020; **20**: p. 100715.

Article soumis:

FARISSI FZ., El Annaz H, El Alaoui MA, Abi R, Boui M, El Fahime EM, Mrani S. **Better immunovirological outcomes in moroccan HIV-1 infected patients under HAART due to carriage of *SDF1 +801 G>A* (rs1801157) genetic polymorphism.**

Communications affichées :

FARISSI, FZ. Facteurs génétiques impliqués dans la résistance naturelle à l'infection au VIH au Maroc : rôle des gènes *CCR5*, *CCR2* et *SDF1*. **4^{èmes} journées scientifiques des CEDOC-SVS, Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat. 15-16 Février 2013**

FARISSI, FZ. *CCR5-Δ32* (rs333) genetic polymorphism and resistance/susceptibility to HIV-1 infection in Morocco. **Journée scientifique du centre de recherche "GénoPath", Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat. 25 Avril 2019**

FARISSI, FZ. *CCR5-Δ32* (rs333) heterozygosity and HIV-1 disease progression in Moroccan HIV-1 infected patients. **Journée scientifique du centre de recherche "GENOPATH », Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat. 25 Avril 2019**

FARISSI, FZ. *CCR5-Δ32* (rs333) genetic polymorphism and HIV-1 infection among Moroccan population. **9èmes Journées scientifiques du CEDoc-SVS, Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat. 15-20 Avril 2019**

FARISSI, FZ. Analysis of the C-C Chemokine Receptor 5 delta-32 genetic polymorphism frequency and its effect on the risk of HIV-1 infection and disease progression among Moroccan population. **5^{ème} édition du Forum Africain de la Santé, Université Internationale Abulcasis des Sciences de la Santé, Rabat. 14 Juin 2019**

دراسة الاستعداد الوراثي للإصابة بفيروس العوز المناعي البشري - 1 لدى مجموعة مغربية: تأثير تعدد الأشكال الوراثية (rs333) CCR5-Δ32، (rs1799864) CCR2 +190 G>A و (rs1801157) SDF1 +801 G>A

فاطمة الزهراء فارسي

ملخص

تعدد الأشكال الوراثية (rs333) CCR5-Δ32، (rs1799864) CCR2+190G>A و (rs1801157) SDF1+801 G>A للجينات التي ترمز على التوالي لمستقبلات فيروس العوز المناعي-1 (HIV-1): CCR2, CCR5 و اللجين SDF1 المرتبط بالمستقبل CXCR4، قد تؤثر على القابلية للإصابة ب HIV-1 و / أو تطور المرض. لذلك كان الهدف الرئيسي من دراسة الحالات والشواهد هذه، تقييم الارتباط بين الأليلات الطافرة CCR5-Δ32، CCR2+190A (64I) و SDF1+801A والقابلية للإصابة ب HIV-1، بالإضافة إلى مؤشرات تطور المرض لدى المغاربة.

تضمنت مجموعتي المرضى و الشواهد المدروسة ما مجموعه 148 مريضا مصابا ب (HIV-1) و 342 من الشواهد الأصحاء من مناطق مختلفة من المغرب. طرق التنميط الجيني المستخدمة كانت أساسا تفاعل البوليميراز المتسلسل وتسلسل الحمض النووي. تم إجراء المقارنة بين المتغيرات باستخدام اختبار χ^2 ، اختبار فيشر الدقيق، اختبار مان ويتني أو اختبار التباين الاحصائي. تم تقييم العوامل التنبؤية بالتطور المناعي - الفيروسي (لدراسة كل من CCR2+190 G>A و SDF1+801G>A) باستخدام الانحدار اللوجستي.

الأليل CCR5-Δ32 نادر الوجود عند المغاربة، بينما الأليلين CCR2+190A و SDF1+801A متواجدان بنسب أكبر.

لم يكن أي من تعدد الأشكال الوراثية التي تمت دراستها مرتبطا بقابلية الإصابة بفيروس HIV-1 ($P > 0.05$). أما فيما يتعلق بتطور الإصابة بعدوى HIV-1، فإن الأليل CCR5-Δ32 (حالة النمط الجيني متغاير الزيجوت) والأليل CCR2+190A (النمط الجيني متماثل الزيجوت + النمط الجيني متغاير الزيجوت) قد لا يؤثران مباشرة على مؤشرات تطور المرض لدى المرضى المصابين ب HIV-1 الذين يخضعون للعلاج بمضادات الفيروسات القهقرية ($p > 0.05$). من ناحية أخرى، ارتبط حمل الأليل SDF1+801A بشكل كبير، بتطور مناعي/ تقهقر فيروسي أفضل بعد عام واحد من العلاج ($p = 0.03$). بالإضافة إلى ذلك، فإن حمل الأليلين الطافرين CCR2+190A و SDF1+801A معا هو عامل تنبؤي بإنتعاش مناعي جيد وتحكم أفضل في التطور الفيروسي ($p = 0.02$).

يمكن أن يكون تعدد الأشكال الوراثي SDF1+801G>A، بمفرده أو مع CCR2+190G>A، مؤشرا تنبؤيا قويا لتطور الإصابة بعدوى HIV-1 لدى المرضى الخاضعين للعلاج بمضادات الفيروسات القهقرية في المغرب.

الكلمات المفتاحية: فيروس العوز المناعي البشري-1؛ CCR5-Δ32 ؛ CCR2+190 G>A ؛ SDF1+801 G>A؛ قابلية الإصابة ؛ تطور المرض ؛ المغرب

Etude de la prédisposition génétique à l'infection par le VIH-1 chez une cohorte marocaine : influence des polymorphismes *CCR5-Δ32* (rs333), *CCR2 +190 G>A* (rs1799864) & *SDF1 +801 G>A* (rs1801157)

Fatima Zahra FARISSI

RESUME

Les polymorphismes *CCR5-Δ32* (rs333), *CCR2+190G>A* (rs1799864) et *SDF1+801G>A* (rs1801157) des gènes codant respectivement pour les corécepteurs du VIH-1 : CCR5, CCR2 et le ligand SDF1 du corécepteur CXCR4, peuvent influencer la susceptibilité au VIH-1 et/ou la progression de l'infection.

L'objectif principal de cette étude cas-témoin était donc d'évaluer l'association des allèles mutés *CCR5Δ32*, *CCR2+190A* (64I) et *SDF1+801A* avec la susceptibilité au VIH-1, et les marqueurs de progression de la maladie chez les marocains.

Les groupes des patients et des témoins analysés comportaient 148 patients infectés par le VIH-1 et 342 témoins sains provenant de différentes régions du Maroc. Les méthodes du génotypage utilisées étaient principalement, l'amplification génique et le séquençage d'ADN. La comparaison entre les variables a été effectuée à l'aide du test χ^2 , test exact de Fisher, test de Mann-Whitney ou test ANOVA. Dans l'étude du *CCR2+190G>A*, et l'étude du *SDF1+801G>A*, les facteurs prédictifs de l'évolution immunovirologique ont été évalués par régression logistique.

L'allèle *CCR5-Δ32* est rare dans notre population. Par contre, les allèles *CCR2+190A*, et *SDF1 +801A* sont assez fréquents.

Aucun des polymorphismes étudiés n'a été associé à la susceptibilité au VIH-1 ($p > 0.05$). Concernant la progression de la maladie, les allèles *CCR5-Δ32* (à l'état hétérozygote) et *CCR2+190A* (homozygotes + hétérozygotes) pourraient ne pas influencer directement les marqueurs immunovirologiques de la progression de la maladie chez les patients infectés par le VIH-1 sous traitement antirétroviral ($p > 0.05$). L'allèle *SDF1+801A* a été par contre significativement associé à une bonne évolution immunovirologique après un an de traitement ($p=0.03$). En outre, le portage de deux allèles mutés *CCR2+190A* et *SDF1+801A* est un facteur prédictif d'une bonne restauration immunologique et un bon contrôle virologique ($p=0.02$).

Le *SDF1+801G>A*, seul ou en association avec le *CCR2+190G>A*, pourrait être un indicateur pronostique puissant de la progression de la maladie chez les patients sous thérapie antirétrovirale au Maroc.

Mots clés : VIH-1, *CCR5-Δ32* ; *CCR2+190G>A* ; *SDF1+801G>A* ; susceptibilité ; progression de la maladie ; Maroc

Analysis of the genetic predisposition to HIV-1 infection in a moroccan cohort: impact of CCR5-Δ32 (rs333), CCR2 +190 G>A (rs1799864) & SDF1 +801 G>A (rs1801157) polymorphisms

Fatima Zahra FARISSI

ABSTRACT

The *CCR5-Δ32* (rs333), *CCR2 +190G>A* (rs1799864) and *SDF1 +801G>A* (rs1801157) polymorphisms of the genes coding respectively for the HIV-1 coreceptors: CCR5, CCR2 and the ligand for CXCR4 coreceptor: SDF1, may influence susceptibility to HIV-1 and/or disease progression.

The main objective of this case-control study was therefore to evaluate the association between *CCR5-Δ32*, *CCR2 +190A* (64I) and *SDF1 +801A* mutated alleles and susceptibility to HIV-1 infection, as well as markers of HIV-1 disease progression in the Moroccan population.

The analyzed cases and controls groups consisted of a total of 148 HIV-1 infected patients and 342 healthy controls from different regions of Morocco. The genotyping methods used were mainly amplification by Polymerase Chain Reaction and DNA sequencing. Comparison between variables was performed using the χ^2 test, Fisher exact test, Mann-Whitney U test, or ANOVA test. In the *CCR2 +190G>A* and *SDF1 +801G>A* analysis, the predictive factors for immunovirologic outcomes were assessed using logistic regression analysis.

The *CCR5-Δ32* allele is rare in our population. On the other hand, the *CCR2 +190A*, and *SDF1 +801A* alleles are quite frequent.

None of the polymorphisms studied was associated with susceptibility to HIV-1 ($p > 0.05$). Regarding HIV-1 disease progression, the *CCR5-Δ32* allele (heterozygous state) and the *CCR2+190A* allele (homozygous + heterozygous) might not directly affect the immunovirological markers of disease progression in HIV-1 infected patients undergoing antiretroviral therapy ($p > 0.05$). Carrying the *SDF1 +801A* allele, on the other hand, was significantly associated with better immunovirological outcomes after one year of treatment ($p=0.03$). In addition, the carriage of two mutated alleles *CCR2 +190 A* and *SDF1 +801A* is a predictive factor for better immunological recovery and virological outcome ($p=0.02$).

The *SDF1 +801G>A*, alone or combined with the *CCR2 +190G>A* polymorphism, could be a powerful prognostic indicator of HIV-1 disease progression among patients undergoing antiretroviral therapy in Morocco.

Keywords: HIV-1, *CCR5-Δ32*; *CCR2 +190G>A*; *SDF1 +801G>A*; susceptibility; disease progression; Morocco

LISTE D'ABREVIATIONS

ABC : Abacavir
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ALIX : ALG-2 interacting protein X
ANRS : Agence nationale de recherches sur le sida
APOBEC3G: apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G
ARM: Arginine Rich Motif
ARN: Acide ribonucléique
ARNm: Acide ribonucléique messenger
ARNtLys: ARN de transfert lysine
ARV: Antirétroviral
AZT: Zidovudine
bNAb: broadly neutralizing antibodies
BST-2: Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2
CA : Capside
CD4i : CD4-induced
CCR5 : Récepteur à C-C chimiokine de type 5
CCR2 : Récepteur à C-C chimiokine de type 2
CD: Cellule Dendritique
CDC: Centers for Disease Control and Prevention
CDR : Complementarity-Determining Regions
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV : Cytomégalovirus
Crm1 : Chromosomal Region Maintenance 1
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CPI : Complexe de Préintégration
CRF : Circulating Recombinant Form
CTL: lymphocytes T cytotoxiques
CXCR4: C-X-C Motif Chemokine Receptor 4
CX3CR1: C-X3-C Motif Chemokine Receptor 1
DC-SIGN: Dendritic Cell-specific ICAM3-Grabbing Non-integrin
DDI: Didanosine
ddNTP: didésoxyribonucléotide triphosphate
dNTP: désoxyribonucléotide triphosphate
ECL: Extracellular Loop
EGF: Epidermal Growth Factor
ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Env: Enveloppe
ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FDA: Food and Drug Administration
FGT: Female Genital Tract
FPRL1: Formyl Peptide Receptor-like 1
FTC: Emtricitabine
gag: group-specific antigen
gp: glycoprotéine

GPR: G Protein-Coupled Receptor
 GRK: G protein-coupled Receptor Kinase
 HAART: Highly Active Antiretroviral Therapy
 HHV-6: Human Herpesvirus - 6
 HIF-1: Hypoxia-Inducible Factor-1
 HLA: human leukocyte antigen
 HMGB1: High-Mobility Group Box 1
 HRPE : Human Retinal Pigment Epithelium
 HSH : Homme ayant relation Sexuelle avec Homme
 HSPC: Hematopoietic Stem and Progenitor Cells
 HTLV: Human T-Lymphotropic Virus
 HWE: Hardy-Weinberg
 IC : Intervalle de Confiance
 ICL : Intracellular Loop
 IFN: Interferon
 IFNAR: Interferon Alpha and Beta Receptor
 Ig : Immunoglobine
 IL : Interleukine
 IN : Intégrase
 INI : Inhibiteur de l'Intégrase
 INNTI : Inhibiteur Non Nucléosidique de la Transcriptase Inverse
 INTI : Inhibiteurs Nucléosidique / Nucléotidique de la Transcriptase Inverse
 IP : Inhibiteur de la Protéase
 Kb : kilobase
 KIR: killer cell Ig-like receptor
 LC: Langerhans cells
 Lck: Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
 LCR: Liquide Céphalo-Rachidien
 LEDGF: Lens Epithelium Derived Growth Factor
 LESTR: Leukocyte-derived Seven-Transmembrane domain Receptor
 LLP: Lentivirus Lytic Peptide
 LTNP: Long Term Non Progressors
 LTR: Long Terminal Repeat
 MA: Matrice
 MBL: Mannose-Binding Lectin
 MCP: Monocyte Chemotactic Protein
 MDM: Monocyte-Derived Macrophages
 MIP: Macrophage Inflammatory Protein
 MRCA: Most Recent Common Ancestor
 NASBA: Nucleic Acid Sequence-Based Amplification
 NC: Nucléocapside
 NEDD4: Neuronal precursor cell-Expressed Developmentally Downregulated 4
 Nef: Negative Factor
 NES: Nuclear Export Signal
 NFS : Numération Formule Sanguine
 NK : Natural Killer
 NLS: Nuclear Localization Signal

NMDA: N-Methyl-D-Aspartic acid
NPC: Nuclear Pore Complex
NRF: Nuclear Respiratory Factor
NSI : Non-Syncytia-Inducing
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ONUSIDA : programme commun des nations unies sur le VIH/SIDA
OR: Odds Ratio
ORF: Open Reading Frame
ORL: Otorhinolaryngologie
PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS: Primer Binding Site
PCR: Polymerase Chain Reaction
PIC: Pre-Integration Complex
PML : ProMyelocytic Leukemia
Pol : Polymérase
PR : Protéase
P-TEFb : Positive Transcription Elongation Factor b
PPIA : Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase A
PR : Protéase Rétrovirale
PTP : Pore de Transition de Perméabilité mitochondriale
PVIH : Personne Vivant avec le VIH
RANTES: Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted
RBD : Receptor Binding Domain
RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G
RE: Réticulum Endoplasmique
Rev: Regulator of Expression of Viral protein
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RNAse H : Ribonucléase H
RP : Rapid Progressor
RRE : Rev Responsive Element
RT : Rétrotranscriptase
RTC : Reverse Transcription Complex
SDF : Stromal cell-Derived Factor
SI : Syncytium-Inducing
SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SIV : Simian Immunodeficiency Virus
SIVcpz : SIV du chimpanzé
SIVgor : SIV du gorille
SNC: Système Nerveux Central
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SP-1: Specificity Protein 1
SP: Slow Progressor
SPSS: Statistical Package for the Social Sciences
spVL: set-point Viral Load
STR: Short Tandem Repeats
TAF: Tenofovir Alafenamide Fumarate
Tat: Transactivator of Transcription

TAR: Transactivator Responsive Element
TAK: Tat-Associated Kinase
TCR: T Cell Receptor
TDF: Tenofovir Disoproxil Fumarate
TGF: Transforming Growth Factor
Th: T helper cells
TLR 9: Toll-Like Receptor 9,
TMD: Transmembrane *Domain*
TNF: Tumor Necrosis Factors
TRIM5: Tripartite Motif-containing protein 5
TROD: Test Rapide d'Orientation Diagnostique
TSG101: Tumor Susceptibility Gene 101
URF: Unique Recombinant Form
UTR: Untranslated Region
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
Vif: Viral infectivity factor
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
Vpr : Viral protein r
Vpu : Viral protein u
VSV : Virus de la Stomatite Vésiculaire
WHIM: Verrues - Hypogammaglobulinémie - Infections - Myélokathexis
βFGF : β Fibroblast Growth Factor
3TC : Lamuvidine

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I :** Classification de l'infection par le VIH chez les adultes et chez les adolescents (1993)
- Tableau II :** Classification de l'infection à VIH chez l'adulte et l'adolescent (OMS)
- Tableau III :** Mélange réactionnel de la réaction de séquence
- Tableau IV :** Programme de PCR de séquence
- Tableau V :** Caractéristiques de la population étudiée
- Tableau VI :** Mesures du taux des cellules CD4 et de la charge virale VIH-1 chez le groupe des cas (n= 148)
- Tableau VII :** Comparaison entre les nombres des génotypes attendus et observés chez les cas et les témoins
- Tableau VIII :** Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme CCR5-Δ32 (RS333)
- Tableau IX :** Comparaison du stade clinique et des marqueurs de la progression de la maladie VIH-1 entre les porteurs du polymorphisme CCR5-Δ32 (CCR5/Δ32) et les non-porteurs (CCR5/CCR5) dans le groupe des cas (n= 148)
- Tableau X :** Caractéristiques des cas et des témoins
- Tableau XI :** Mesures du taux des cellules CD4 et de la charge virale VIH-1 chez les patients (n= 100)
- Tableau XII :** Comparaison entre les nombres des génotypes CCR2 +190 G>A prévus et observés chez les cas et les témoins
- Tableau XIII :** Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme CCR2 +190 G>A chez les cas et les témoins
- Tableau XIV :** Comparaison de l'ethnie et des caractéristiques cliniques en fonction des génotypes CCR2 +190 G>A
- Tableau XV :** Analyses univariée et multivariée des facteurs associés à l'évolution immunovirologiques chez les patients traités
- Tableau XVI :** Caractéristiques de la population étudiée
- Tableau XVII :** Mesures du taux des cellules CD4 et de la charge virale VIH-1 chez les patients (n= 100)
- Tableau XVIII :** Comparaison entre les fréquences génotypiques prévues et observées chez les cas et les témoins
- Tableau XIX :** Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme SDF1 +801 G>A chez les cas et les témoins
- Tableau XX :** Comparaison des caractéristiques des patients en fonction des génotypes SDF1
- Tableau XXI :** Analyses univariée et multivariée des facteurs associés à l'évolution immunovirologique chez les patients après un an de TAR

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Arbre phylogénétique des différents SIV et VIH fondé sur les séquences du gène *pol*
- Figure 2 : Structure du VIH-1
- Figure 3 : Représentation schématique du génome du VIH-1
- Figure 4 : Représentation des précurseurs protéiques et des protéines issues de leur maturation
- Figure 5 : Structures des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1
- Figure 6 : Structure de la matrice du VIH-1 en trimère
- Figure 7 : Structure de la capsid du VIH-1
- Figure 8 : Séquence de la protéine de nucléocapsid du VIH-1
- Figure 9 : Structure de la protéine p6
- Figure 10 : Structure du dimère de la protéase du VIH-1
- Figure 11 : Structure de la transcriptase inverse du VIH-1
- Figure 12 : Structures des trois domaines isolés de l'intégrase du VIH-1
- Figure 13 : Structure d'un dimère du double domaine NTD-CCD (IN¹⁻²¹²) de l'intégrase du VIH-1
- Figure 14 : Mécanisme d'activation transcriptionnelle par la protéine Tat
- Figure 15 : Structure de la protéine Rev
- Figure 16 : Structure de la protéine Nef, ancrée à la membrane cellulaire
- Figure 17 : Unités fonctionnelles de la protéine Vif
- Figure 18 : Structure de la protéine Vpu
- Figure 19 : Structure de la protéine Vpr du VIH-1
- Figure 20 : Structure de la molécule CD4
- Figure 21 : Interaction CD4-gp120
- Figure 22 : Structure de la protéine CCR5
- Figure 23 : Structure de la protéine CXCR4
- Figure 24 : Structure cristalline de l'isoforme SDF1 α
- Figure 25 : Structures de la protéine CCR2
- Figure 26 : Tropisme du VIH-1
- Figure 27 : Conversion phénotypique R5-X4 au cours de l'infection
- Figure 28 : Cycle répliatif du VIH-1
- Figure 29 : Modèle d'entrée du VIH-1 dans la cellule cible
- Figure 30 : Cryo-tomographie électronique du complexe CD4 – gp120 – CCR5
- Figure 31 : Interfaces entre gp120 et CCR5
- Figure 32 : Comparaison des différentes conformations de la gp120
- Figure 33 : Représentation schématique des différentes étapes de la transcription inverse
- Figure 34 : Intégration de l'ADN viral dans l'ADN de la cellule hôte
- Figure 35 : Assemblage et bourgeonnement de la particule virale
- Figure 36 : Particule virale du VIH-1
- Figure 37 : Répartition régionale des différents sous-types, CRFs et URFs du VIH-1 durant la période 2010-2015
- Figure 38 : Histoire naturelle de l'infection à VIH en l'absence de traitement chez un patient hypothétique
- Figure 39 : Cinétique d'apparition des marqueurs biologiques de l'infection à VIH-1

- Figure 40** : Structure du gène *CCR5*
- Figure 41** : Différence entre le *CCR5* et le *CCR5-Δ32*
- Figure 42** : Expression du *CCR5* à la surface de la cellule
- Figure 43** : Organisation structurale du gène *CCR2*
- Figure 44** : Organisation structurale du gène *CXCR4*
- Figure 45** : Organisation structurale du gène *CX3CR1*
- Figure 46** : l'organisation du gène *RANTES* sur le chromosome 17q11.2 et l'emplacement des SNP
- Figure 47** : Organisation structurale du gène *SDF1*
- Figure 48** : Dosage et contrôle de la pureté des échantillons d'ADN
- Figure 49** : Electrophorèse sur gel d'agarose (3%) des produits d'amplification de la séquence contenant le polymorphisme *CCR5-Δ32*
- Figure 50** : Electrophorèse sur gel d'agarose (3%) des produits d'amplification de la séquence contenant le polymorphisme *CCR2 +190 G>A*
- Figure 51** : Electrophorèse sur gel d'agarose (3%) des produits d'amplification de la séquence contenant le polymorphisme *SDF1 +801 G>A*
- Figure 52** : Les résultats du séquençage du gène *CCR2*
- Figure 53** : Les résultats du séquençage du gène *SDF1*

LISTE DES ANNEXES

- ANNEXE I :----- Fiche de renseignements des patients infectés par le VIH-1
- ANNEXE II :----- Accord favorable du comité d'éthique
- ANNEXE III :----- Protocole d'extraction d'ADN par le Kit ISOLATE II Blood DNA Kit de Biorline
- ANNEXE IV :----- Purification Produits PCR
- ANNEXE V :----- Purification des produits de la réaction de séquence
- ANNEXE VI :----- Electrophorégrammes des séquences sens et anti-sens du gène SDF1



INTRODUCTION GENERALE

L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) qui est l'agent responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité parmi les maladies infectieuses dans le monde et surtout en Afrique. Au cours des trois dernières décennies, on a assisté à une propagation mondiale de l'infection par ce virus.

Malgré la prise de conscience mondiale et la mise en œuvre de stratégies de prévention ; les nombres de personnes infectées et les personnes atteintes du SIDA ne cessent d'augmenter dans le monde entier. Selon le dernier rapport de l'ONUSIDA publié en 2020, 38 millions de personnes vivaient avec le VIH (PVVIH) dont 1,7 million de nouveaux cas d'infection et 690.000 décès dus aux maladies liées au sida en 2019 [1], ce qui indique que le VIH reste, au niveau planétaire, un défi majeur pour la santé publique.

Au Maroc, et malgré tous les efforts déployés dans la lutte contre le VIH pour maintenir une prévalence faible et relativement stable de cette infection en population générale, la prévalence du VIH enregistrée chez les populations clés demeure plus élevée. Depuis le premier cas enregistré en 1986, le nombre des PVVIH a atteint 22.000 en fin 2020 avec 740 nouvelles infections et 300 décès, selon les estimations du ministère de la santé [2].

En dépit des maintes améliorations en matière de prévention du VIH et de traitements antirétroviraux, la pandémie a continué à dépasser les efforts mondiaux. Le succès des thérapies antivirales dans le contrôle de la réplication du VIH n'a pas comblé le besoin de nouvelles approches qui pourraient prévenir l'infection car les traitements disponibles actuellement ne permettent pas une éradication et une élimination complète du virus de son réservoir cellulaire. Par conséquent, la difficulté du développement d'un vaccin préventif ou thérapeutique efficace reste un obstacle majeur. Il a été établi que la susceptibilité à l'infection par le VIH-1 et à la progression de la maladie varie selon les individus et les populations, ce qui confirme le rôle de la variabilité génétique de l'hôte.

Jusqu'à présent, l'accent a été surtout mis sur l'identification de phénotypes de susceptibilité différente à l'infection (dans la population générale et dans les groupes à haut risque qui ont été exposés au virus mais non infectés) ou de marqueurs de la gravité de la maladie, notamment le taux des cellules T CD4+, le taux d'ARN-VIH-1 plasmatique et le délai d'apparition du SIDA. L'une des approches permettant de comprendre la réponse immunitaire au VIH-1 et les raisons

de son échec chez la plupart des gens consiste à examiner les individus qui semblent résister soit à l'acquisition du virus, soit à ses ravages une fois qu'il a été contracté.

Plusieurs études ont démontré que les facteurs génétiques, notamment les polymorphismes des gènes codant pour les chimiokines et les récepteurs des chimiokines, jouent un rôle important dans la variabilité inter-individuelle de la réponse contre le VIH-1/SIDA [3]. Les polymorphismes les plus cités dans la littérature et qui sont associés à la résistance naturelle au VIH-1 sont les *CCR5-Δ32* (rs333), *CCR2 +190 G>A* (p. Val64Ile, rs1799864) et *SDF1 +801 G>A* (rs1801157).

La mutation *CCR5-Δ32* (rs333) du gène codant pour CCR5 (le corécepteur majeur du VIH-1), est la plus étudiée et est associée à la résistance naturelle à l'infection par le VIH-1, car elle peut inhiber, à l'état homozygote, l'entrée des souches R5. Certains traitements contre l'infection par le VIH-1 ont même été développés sur la base de ces résultats. Les individus infectés par le VIH-1, qui sont hétérozygotes pour cet allèle, semblent présenter un ralentissement de la progression de la maladie vers le stade SIDA [4].

Concernant le polymorphisme *CCR2 +190 G>A* (rs1799864) du gène codant pour CCR2, un corécepteur alternatif du VIH-1, et le polymorphisme *SDF1 +801 G>A* (rs1801157) du gène qui code pour le ligand (SDF1), du corécepteur CXCR4 du VIH-1, plusieurs études ont rapporté qu'ils n'influencent pas la susceptibilité ou le risque de l'infection par le VIH-1 chez les individus homozygotes et les hétérozygotes pour ces allèles. Par ailleurs, il a été rapporté que ces deux polymorphismes peuvent être associés à la progression de la maladie. Les individus porteurs de ces allèles progressent plus lentement vers le SIDA par le maintien d'une charge virale VIH stable et un lent déclin des cellules T CD4+ [5, 6]. Cependant, cette association reste très controversée surtout chez les patients séropositifs suivant un traitement antirétroviral. En fait, l'effet des allèles mutés ci-dessus (*CCR5-Δ32*, *CCR2 +190A (64I)* et *SDF1 +801A*) sur la progression clinique a été démontré plus clairement chez les patients non traités.

Chez les patients recevant une thérapie antirétrovirale hautement active (HAART), leur influence sur la restauration immunologique ou le contrôle virologique demeure incertaine. Certaines études ont révélé une amélioration des réponses immunologique et virologique en association avec les gènes mentionnés [7-11], contrairement à d'autres qui n'ont pas trouvé de corrélation significative [12, 13].

La distribution de ces variations génétiques varie considérablement d'une population à l'autre. L'allèle *CCR5-Δ32*, est relativement rare et la fréquence la plus élevée a été observée chez les Caucasiens [14]. L'allèle *CCR2 +190A (64I)* est par contre plus fréquent dans de nombreux groupes ethniques dans le monde, surtout en Afrique et en Asie [15]. Concernant l'allèle *SDF1 +801A*, la fréquence la plus élevée a été observée chez les populations océaniques [16].

Malgré le rôle important de la chimiokine SDF1 et des récepteurs de chimiokines CCR5 et CCR2 dans la réponse immunitaire au VIH-1, il n'existe pas de données sur leur contribution à la fois dans la résistance à l'infection par le VIH-1 et dans la progression de la maladie chez les individus marocains. Une étude précédente a été menée auprès des individus marocains séronégatifs pour le VIH-1 a démontré que le *CCR5-Δ32* est présent dans la population marocaine à une faible fréquence [17]. Cependant, aucune étude n'avait analysé la distribution de cet allèle et son association avec la susceptibilité au VIH-1 et la progression de la maladie chez les patients séropositifs au VIH-1. En outre, aucune étude n'a été menée pour étudier les allèles *CCR2 +190A (64I)* et *SDF1 +801A*.

D'où l'intérêt de notre projet de thèse qui s'intéresse pour la première fois au Maroc à ***l'effet des polymorphismes génétiques CCR5-Δ32 (RS333), CCR2 +190 G>A (rs1799864) et SDF1 +801 G>A (rs1801157) sur l'infection par le VIH-1.***

Le manuscrit de cette thèse commence de prime abord par une synthèse bibliographique sur les différents aspects du VIH /SIDA et la résistance naturelle à l'infection par ce virus. En second lieu, nous présentons nos travaux de thèse et les différents résultats obtenus, dont le principal objectif était de vérifier l'existence d'une association entre les polymorphismes *CCR5-Δ32* (rs333), *CCR2 +190 G>A* (rs1799864) et *SDF1 +801 G>A* (rs1801157) et la susceptibilité à l'infection par le VIH-1 et avec la progression de la maladie.



OBJECTIFS DE THESE

Les facteurs génétiques de l'hôte jouent un rôle important dans la résistance naturelle au VIH-1. Plusieurs recherches ont démontré que les polymorphismes des gènes codant pour les corécepteurs du VIH-1 ou leurs ligands pourraient avoir un effet protecteur contre l'acquisition du VIH-1 et/ou la progression rapide de la maladie vers le stade SIDA.

Cependant, l'influence de ces polymorphismes diffère d'une population à une autre et les conclusions sont donc controversées. Les polymorphismes les plus étudiés sont les *CCR5-Δ32* (rs333), *CCR2 +190 G>A* (Val64Ile, rs1799864) et *SDF1 +801 G>A* (rs1801157).

Malgré l'importance de ces mutations dans la compréhension de la résistance à l'infection par le VIH-1 et leur rôle comme facteurs prédictifs de la progression de la maladie, aucune donnée n'est disponible concernant l'effet de ces polymorphismes génétiques sur l'infection par le VIH-1 au Maroc.

Dans ce contexte, nous avons mené une étude cas-témoins pour déterminer en premier lieu, les fréquences alléliques et génotypiques des variants *CCR5-Δ32*, *CCR2 +190A (64I)* et *SDF1 +801A* chez les patients séropositifs pour le VIH-1 et les témoins sains non infectés par le VIH-1, dans le but de vérifier l'existence d'une association de ces variants génétiques à la susceptibilité à l'infection par le VIH-1.

Dans un second lieu, nous avons vérifié l'existence d'une association entre ces allèles mutés et les marqueurs de progression de la maladie chez les patients sous traitement antirétroviral.

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE





**Chapitre I : Le Virus de
l'Immunodéficience Humaine « VIH »**

I - HISTORIQUE ET DECOUVERTE

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent pathogène responsable d'une pandémie depuis plus de trente ans. En effet, le point de départ de l'épidémie de SIDA était officiellement en juin 1981 quand le US *Centers for Disease Control* (CDC) d'Atlanta publia dans leur revue *Morbidity and Mortality Weekly Report*, des résultats concernant une augmentation du nombre de cas de pneumonies à *Pneumocystis carinii* et de sarcomes de Kaposi, plus particulièrement chez les jeunes hommes homosexuels à New York, Los Angeles, et San Francisco [18]. Le syndrome est appelé donc *Gay-Related Immune Deficiency (GRID)* car les premiers cas touchés étaient des homosexuels. À la fin de la même année, les mêmes symptômes étaient ensuite détectés chez des toxicomanes et des personnes transfusées, puis chez des hommes hétérosexuels et des femmes d'Afrique centrale.

Le CDC postule donc l'existence d'un nouveau syndrome dont la particularité est l'acquisition d'un état immunodéprimé, caractérisé par la chute du nombre de lymphocytes T. Finalement, ce nouveau type d'immunodéficience fut appelé « syndrome d'immunodéficience acquise » (SIDA) [19].

L'agent étiologique du SIDA chez l'homme a été découvert dans les laboratoires de Drs. Robert Gallo et Luc Montagnier. En 1983, Françoise Barré-Sinoussi et ses collaborateurs identifièrent un rétrovirus dans le ganglion lymphatique d'un patient homosexuel atteint du syndrome de la lymphadénopathie (LAS). Ce nouveau virus sera appelé ultérieurement lymphadenopathy-associated virus (LAV) [20].

En 1984, l'équipe de R. Gallo identifia l'agent causal du SIDA, un rétrovirus baptisé HTLV-III mais les résultats de séquençage des deux virus LAV et HTVL-III montrèrent que ces deux virus ne forment qu'un seul et unique virus [21].

En 1986, Le comité international de taxonomie des virus introduisit donc le terme actuel de Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). De plus, l'équipe de L. Montagnier isolèrent chez des sujets atteints de SIDA, le VIH-2 qui est un virus proche du VIH-1 [22].

En octobre 2008, la communauté scientifique attribua le Prix Nobel de médecine à F. Barré-Sinoussi et L. Montagnier.

II - ORIGINE

L'origine du VIH est un sujet qui a intrigué plusieurs chercheurs. Les VIH-1 et VIH-2 sont liés à d'autres lentivirus de primates appelés SIV pour « *simian immunodeficiency virus* », détectés chez des espèces de singes en Afrique. Le VIH-1 est proche des SIVcpz et SIVgor, qui infectent naturellement les chimpanzés et les gorilles d'Afrique Centrale de l'ouest alors que le VIH-2 est proche des SIVsmm, retrouvés chez les mangabeys enfumés d'Afrique de l'Ouest [23].

Selon les analyses phylogénétiques, il existe une filiation entre ces virus, ce qui prouve la transmission inter-espèce du singe à l'Homme (figure 1). Pour expliquer le mode de cette transmission, plusieurs hypothèses ont été suggérées mais les plus consensuelles sont le contact avec du sang ou des sécrétions contaminées du singe infecté, que ce soit par morsures ou par écorchure au cours de chasse, de dépeçages ou suite à la consommation d'une viande insuffisamment cuite [24].

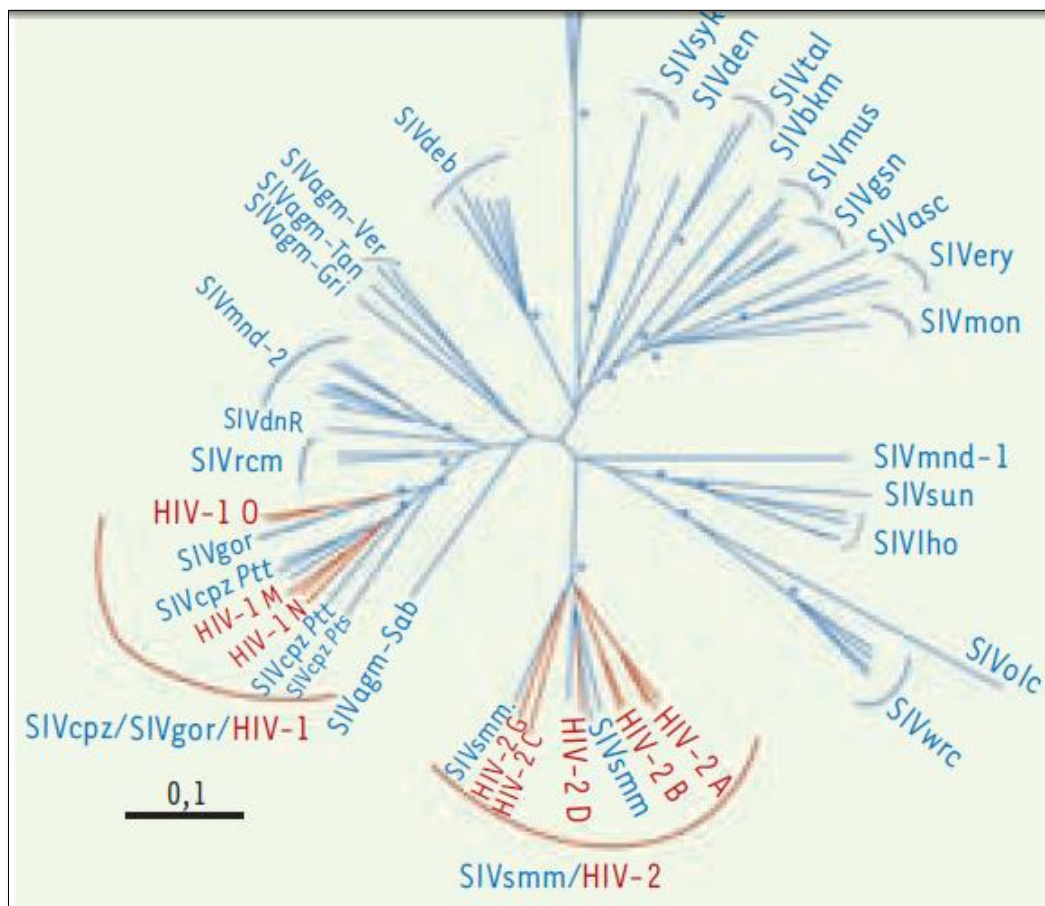


Figure 1. Arbre phylogénétique des différents SIV et VIH fondé sur les séquences du gène pol [24]

III - CLASSIFICATION TAXONOMIQUE

Le VIH est un virus à ARN qui appartient à la famille des *Retroviridae*, caractérisée principalement par son mode de répllication dépendant de la **transcriptase inverse** (TI). La présence de cette enzyme permet la rétrotranscription de l'ARN simple brin en ADN bicaténaire ce qui va permettre son intégration par la suite dans l'ADN chromosomique de la cellule hôte. Le VIH appartient à la sous-famille des *Orthoretrovirinae* et au genre des *Lentivirus* qui ont un effet cytopathogène et responsable des infections progressives caractéristiquement lentes avec une répllication virale constante [25]. Les *lentivirus* sont répartis en cinq sous-groupes en fonction de l'espèce hôte qu'ils infectent. Ces cinq sérogroupes sont les primates, les caprins, les bovins, les chevaux et les félins. Le VIH fait partie des lentivirus des primates dont la caractéristique distinctive est leur utilisation de CD4 en tant que récepteur pour l'entrée virale [26].

IV - CARACTERISTIQUES GÉNÉRALES DU VIH-1

IV.1 - Morphologie et structure protéique

Les deux types du virus de l'immunodéficience humaine, le VIH-1 et le VIH-2, possèdent la même structure et la même organisation génomique mais diffèrent par le poids moléculaire de leurs protéines et de leurs enzymes. Le VIH-1 est un virus enveloppé sphérique dont les virions matures mesurent environ 100-140 nm de diamètre [27]. Il comporte, de l'extérieur vers l'intérieur, une enveloppe externe sous forme d'une bicouche lipidique provenant de la membrane cytoplasmique de la cellule hôte [28]. La surface de cette enveloppe est pourvue des spicules glycoprotéiques constitués de deux sous-unités nommées selon leur poids moléculaire et attachées par des liaisons non covalentes : la **glycoprotéine** de surface ou **gp 120** (gp105 pour VIH-2) et la **glycoprotéine** transmembranaire ou gp 41 (gp36 pour VIH-2). Ces complexes glycoprotéiques sont responsables de l'attachement du virus à la cellule hôte [29, 30].

La face interne de l'enveloppe est tapissée d'une matrice protéique (MA) faite de la p17 (p 16 pour le VIH-2) qui entoure la capsid (CA) virale conique formée par l'assemblage des protéines p24 (p26 pour le VIH-2). Cette capsid renferme les enzymes virales nécessaires à la répllication virale (**La transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase**) et le génome viral sous forme de deux copies d'ARN viral monocaténaire, de polarité positive associées à des protéines de nucléocapsid (NC) [31] (figure 2).

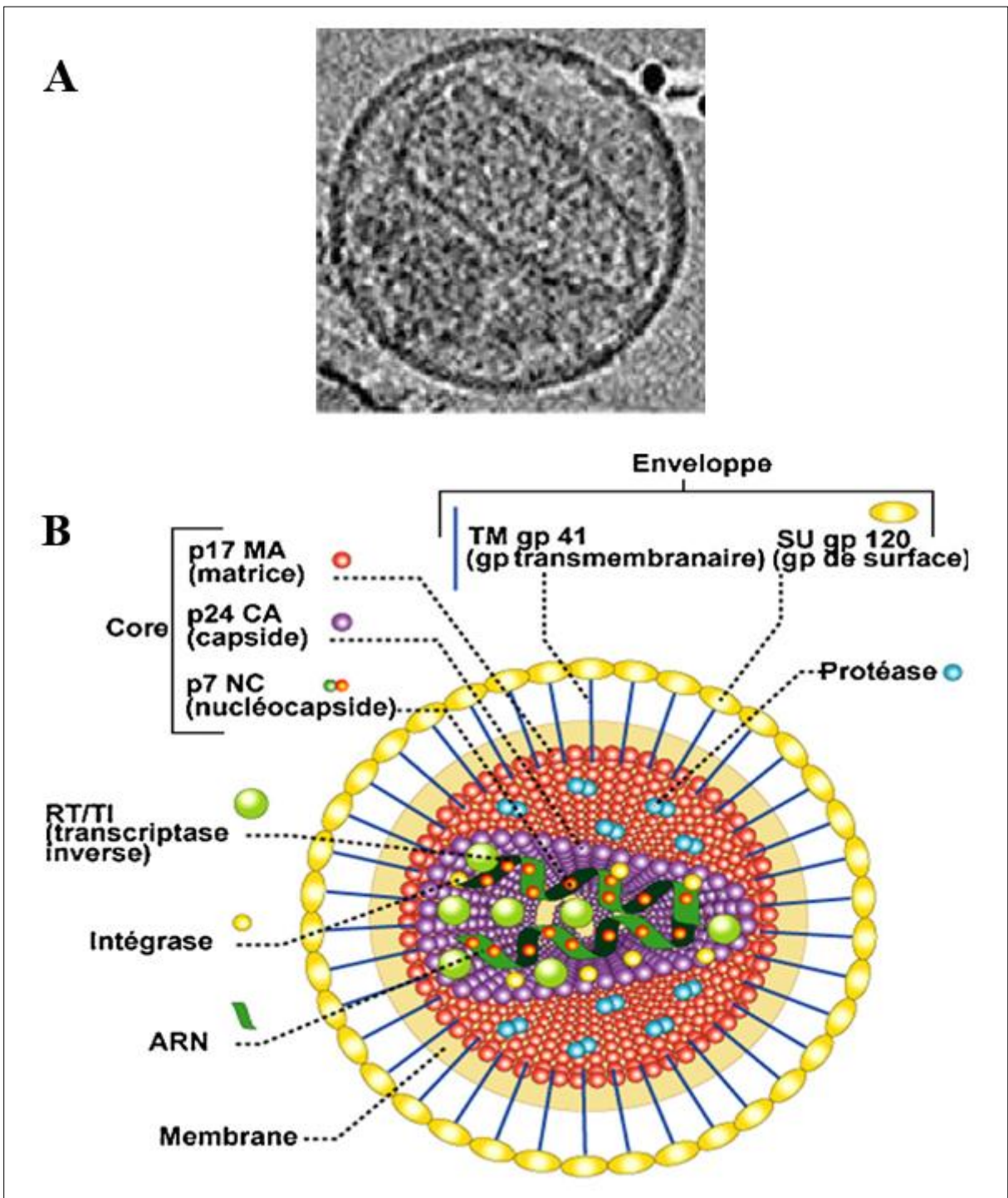


Figure 2 : Structure du VIH-1. (A), Cryo-tomographie électronique d'une particule virale mature du VIH-1 [32]. (B), Représentation schématique du virion mature du VIH-1 détaillant la localisation des protéines virales et la structure approximative du virion [33]

IV.2 - Organisation génomique

La première séquence complète du VIH a été découverte en 1985 [34]. Le VIH-1 possède un génome complexe qui contient neuf cadre de lecture ouvert (*open reading frame* ou ORF en

anglais) produisant 15 protéines y compris les protéines virales structurales, enzymatiques et auxiliaires [35]. Ce génome d'environ 9.8 kb est flanqué de chaque extrémité par des séquences répétées nommées *Long Terminal Repeat* (LTR) d'environ 630 pb qui se divisent en trois éléments : U3, R et U5 [36]. Ces régions contiennent des signaux importants qui jouent un rôle essentiel dans la transcription, la transcription inverse et l'encapsidation du génome viral. La région U3 du LTR 5' contient le promoteur viral. La transcription est initiée à la jonction U3-R du LTR 5' et se termine dans la région R du LTR 3' qui contient les signaux de terminaison de la transcription et de polyadénylation.

En plus des gènes structuraux (*gag / pol / env*) communs à tous les Rétrovirus et qui produisent respectivement les antigènes de la nucléocapside, les enzymes nécessaires à la réplication virale et les protéines de surface du virion, l'ADN proviral code également pour d'autres gènes classés comme: régulateurs (*tat / rev*) et accessoires (*nef / vif / vpr* et *vpu* pour le VIH-1 ou *vpx* pour le VIH-2) [37] (figure 3).

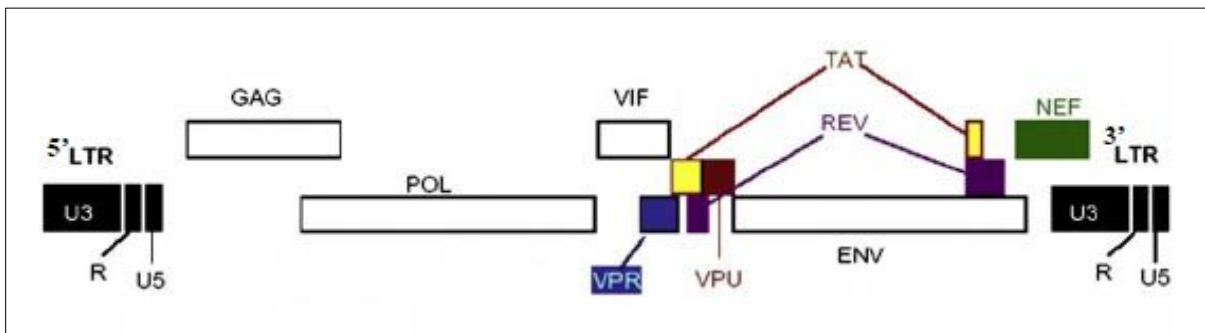


Figure 3 : Représentation schématique du génome du VIH-1 [38]. **Gag** : Group-specific antigen; **Pol**: Polymerase; **Env**: Envelope; **Vif** : «Viral infectivity factor»; **Vpu** : Viral protein u; **Vpr**: Viral protein r; **Tat**: Transactivator of transcription; **Rev** : Regulator of expression of viral protein; **Nef**: Negative effector.

IV.2.1 - Gènes structuraux

Le **gène gag** code pour un précurseur polyprotéique de 55 kDa appelé Pr55^{Gag} qui est l'acteur majeur du processus d'assemblage des rétrovirus, car il contient la grande majorité des informations intervenant dans l'assemblage viral. Ce précurseur est clivé pendant ou juste après le bourgeonnement du virus par la protéase virale pour donner des protéines virales matures qui formeront la structure interne du virus : la protéine de matrice (p17, MA), protéine de capsid (p24, CA), protéine de nucléocapsid (p7, NC) et la protéine p6. Des peptides courts

d'espacement sont également présents entre les domaines CA et NC (p2) et entre les domaines NC et p6 (p1) [39] (figure 4).

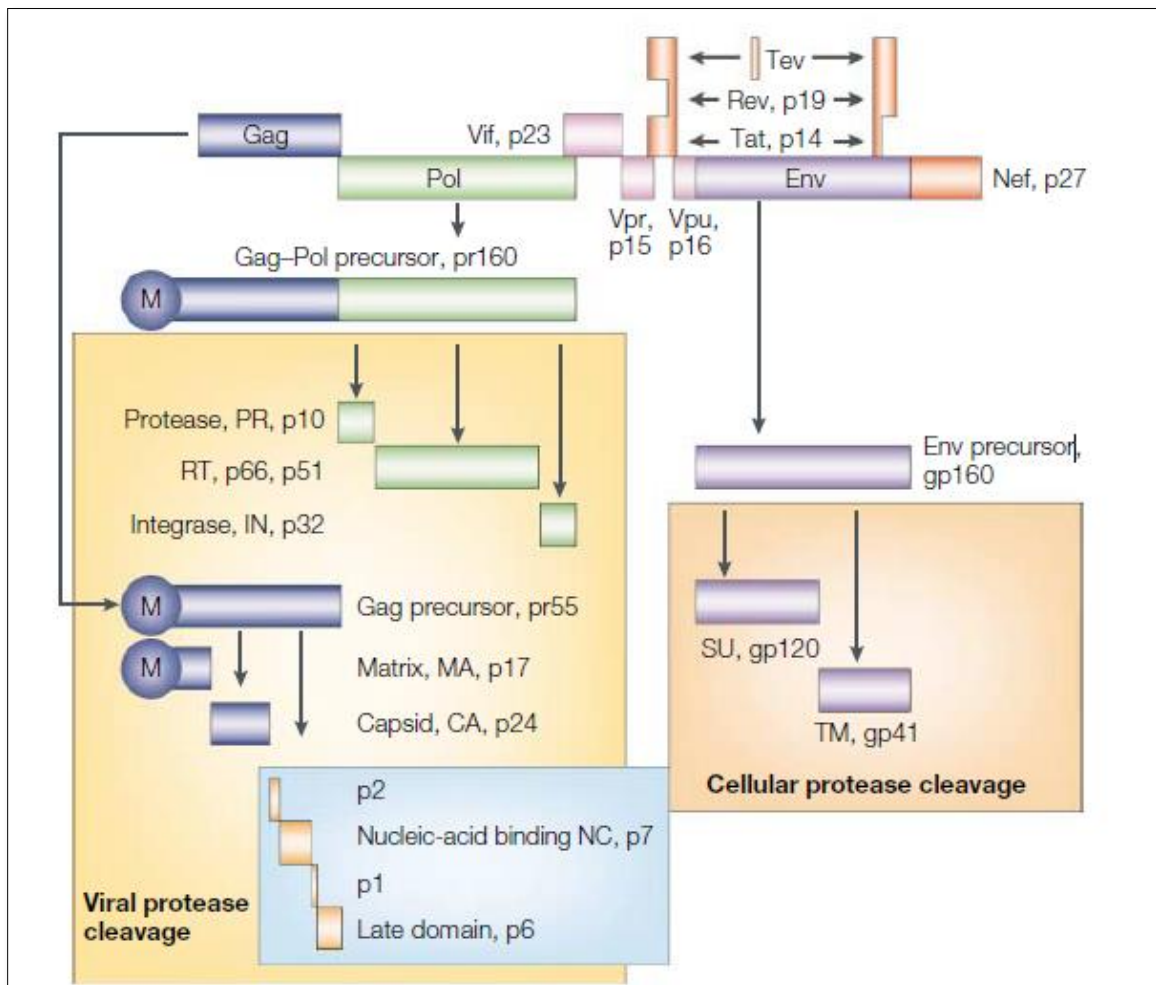


Figure 4 : Représentation des précurseurs protéiques et des protéines issues de leur maturation [40]

Le **gène *pol*** (*polymerase*) code pour le précurseur polyprotéique Gag-Pol de 160 kDa ($\text{Pr160}^{\text{gag-pol}}$) qui est synthétisé à partir du même transcrite primaire utilisé pour les protéines du gène *gag*. Le clivage protéolytique du $\text{Pr160}^{\text{Gag-Pol}}$ génère trois enzymes virales essentielles à la réplication du VIH-1 : **la protéase** (p11, PR), **la rétrotranscriptase** (p66/p51, RT), et **l'intégrase** (p32, IN) [37] (figure 4).

Le **gène *env*** (*envelope*) code pour le précurseur glycoprotéique Env de 160 kDa (**gp160**). Ce précurseur est glycosylé et ensuite clivé au sein du réticulum endoplasmique par des protéases cellulaires [41] en deux glycoprotéines : une **glycoprotéine de surface 120 (gp120, SU)** et une

glycoprotéine transmembranaire 41 (gp41, TM) [42] (figure 4). Contrairement aux gènes *gag* et *pol*, la protéine du gène *env* est synthétisée à partir d'un ARN messager épissé [43].

IV.2.2 - Gènes régulateurs et accessoires

Les gènes régulateurs (*tat*, *rev*) sont importants dans la régulation de l'expression de l'information génétique virale, faisant du génome du VIH-1 probablement le plus complexe de la famille des rétrovirus.

Le gène *tat* est indispensable à la réplication virale. Il code pour une petite protéine trans-activatrice de 14 KDa (*Trans-Activator of Transcription* ou **Tat**, également appelée p14) d'environ 86 acides aminés qui joue rôle essentiel dans l'expression du virus et dans la pathogénicité du VIH [44].

Le gène *rev* code pour une petite protéine régulatrice **Rev** (Regulator of Expression of Virion proteins, également appelée p19) de 19 KDa obtenue après traduction d'un ARNm doublement épissés. Cette protéine assure des fonctions régulatrices indispensables à la réplication du virus [45].

Les gènes accessoires (*nef*, *vif*, *vpr* et *vpu*) également appelés facteurs de virulence ne sont pas indispensables à la réplication virale mais nécessaires à la maturation et au relargage des virions. Ils codent respectivement pour des petites protéines virales multifonctionnelles : **Nef** (Negative factor, p27), **Vif** (Viral infectivity factor), **Vpr** (Viral protein r) et **Vpu** (Viral protein u). Ces protéines dites « accessoires ou auxiliaires » sont associées à la virulence et à la pathogénèse du VIH-1 [46].

IV.3 - Les protéines virales

IV.3.1 - Les protéines structurales

Les glycoprotéines d'enveloppe : La surface de l'enveloppe du VIH-1 est hérissée de nombreux spicules appelées glycoprotéines d'enveloppe (Env), essentielles pour l'entrée du virus dans les cellules cibles. Ces spicules sont issus du clivage du précurseur glycoprotéique (gp160) par une protéase cellulaire (la furine), en deux protéines matures : la glycoprotéine de surface (SU) gp120 de 120 kDa, et la glycoprotéine transmembranaire (TM) gp41 de 41 kDa [47-49]. Ces deux glycoprotéines s'associent par des interactions non covalentes en un trimère d'hétérodimères gp120-gp41 (figure 5A et 5B) qui est exprimé à la surface cellulaire, puis à la

surface du virion après bourgeonnement viral. Chaque virion possède environ 14 trimères gp120/gp41 [29, 50-54].

La glycoprotéine de surface de l'enveloppe, gp120 (~ 480 acides aminés), est une protéine fortement glycosylée et divisée en cinq segments conservés (C1 – C5) entrecoupés de cinq segments variables (V1 – V5). Cette protéine contient principalement deux domaines : un domaine interne et un domaine externe connectés par un feuillet de liaison β inter-domaines «*bridging sheet*» (figure 5C) [51]. Le domaine interne de la gp120, d'où émanent les boucles variables V1/V2, est dépourvu de glycanes et se forme principalement par les régions constantes C1 et C5 impliquées dans l'interaction de la gp120 avec l'ectodomaine de la gp41 [55]. Le domaine externe d'où proviennent les boucles V3¹, V4 et V5, est par contre hautement glycosylé et il interagit avec le récepteur CD4 et les corécepteurs aux chimiokines CCR5/CXCR4 de la cellule cible (par la boucle V3) [55].

La glycoprotéine transmembranaire gp41, quant à elle, est responsable de la fusion des membranes virale et cellulaire [63, 64]. Cette glycoprotéine (~345 acides aminés) se compose de trois domaines principaux : le domaine extracellulaire N-terminal ou ectodomaine, le domaine transmembranaire et le domaine intracytoplasmique C-terminale (queue cytoplasmique). L'ectodomaine a un rôle direct dans le processus de la fusion membranaire qui

¹ La boucle variable (V3) de la gp120 est l'une des régions critiques de l'enveloppe du VIH-1 responsables de l'interaction avec les cellules hôtes. V3 est hautement glycosylée et se compose typiquement de 35 acides aminés (de 31 à 39). Elle joue un certain nombre de rôles biologiques importants [56]. Non seulement elle est indispensable pour la liaison de corécepteur, mais elle détermine également le choix du corécepteur [57]. De plus, V3 peut interagir avec d'autres éléments au niveau des spicules glycoprotéiques du virus pour contrôler la sensibilité globale du virus à la neutralisation [58]. L'immunisation avec des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 provoque souvent des réponses neutralisantes dirigées principalement contre V3 [59, 60]. Cependant, la boucle V3 est une région très variable d'un isolat de virus à l'autre ce qui impose une restriction de l'utilisation d'anticorps anti-V3. Ces derniers ne peuvent en effet neutraliser que les isolats contre lesquels ils ont été produits.

Dans les premiers travaux de La Rosa et al. [61, 62], une analyse des séquences de la région V3 de 245 isolats a montré la conservation importante de certains résidus, notamment ceux situés au sommet de la boucle, et une plus grande variabilité à d'autres positions [61]. Ainsi, une conservation supérieure à 80 % est constatée pour 9 positions parmi les 14 acides aminés centraux. Les tétrapeptides GPGR ou GPGQ sont notamment présents au sommet de la boucle dans la quasi-totalité des isolats de VIH-1: la séquence GPGR est hautement conservée dans toutes les séquences connues du sous-type B, tandis que d'autres isolats du groupe M sont caractérisés par la séquence GPGQ hautement apparentée à cette position.

Le degré élevé de conservation de certaines de ces positions d'acides aminés suggère qu'ils ont un rôle structurel et fonctionnel clé et sont importants dans certains aspects de l'infectivité du virus, comme la modulation de la conformation de la boucle V3, ou pour moduler l'interaction avec le corécepteur. La Rosa et al. ont également prédit que la structure secondaire de la séquence consensus du V3 (CTRPNNNTRKSIHIGPGRFYTTGEIIGDIRQAHC) consiste en un brin β étendu, tour β de type II autour des résidus GPGR, un brin β puis une hélice α [61, 62]. La présence de deux résidus cystéine flanquant la séquence conduit à une liaison covalente (pont disulfure) qui se traduit par une conformation en boucle. Cette structure est la structure commune de la boucle V3, malgré la variabilité importante au niveau de certaines positions.

est la principale fonction de la protéine gp41. Ce domaine (~170 acides aminés) peut être subdivisé en cinq régions (figure 5D): un peptide de fusion (FP) hydrophobe suivi par la région de répétitions d'heptapeptides située en position N-terminale (NHR ou HR1), une boucle hydrophile formée par un pont disulfure, la région de répétition d'heptapeptides situées en position C-terminale (CHR ou HR2), et enfin la région externe proximale de la membrane (MPER) [65-67].

Le domaine transmembranaire (~ 25 acides aminés) hautement conservé est responsable de l'ancrage de l'Env dans les membranes virale et cellulaire. De plus, il a été démontré que ce domaine peut être impliqué dans la fusion membranaire lors de l'entrée du virus dans la cellule hôte [68, 69].

Le domaine cytoplasmique (~150 acides aminés) comprend essentiellement trois segments organisés en hélice- α amphipathiques, nommés peptides lytiques (LLP-1, LLP-2 et LLP-3) [70, 71].

Ces peptides sont impliqués dans la fusogénicité [72], la stabilité [73], la multimérisation [74], l'expression à la surface cellulaire [75], et l'incorporation de la glycoprotéine d'enveloppe (Env) dans les virions [76].

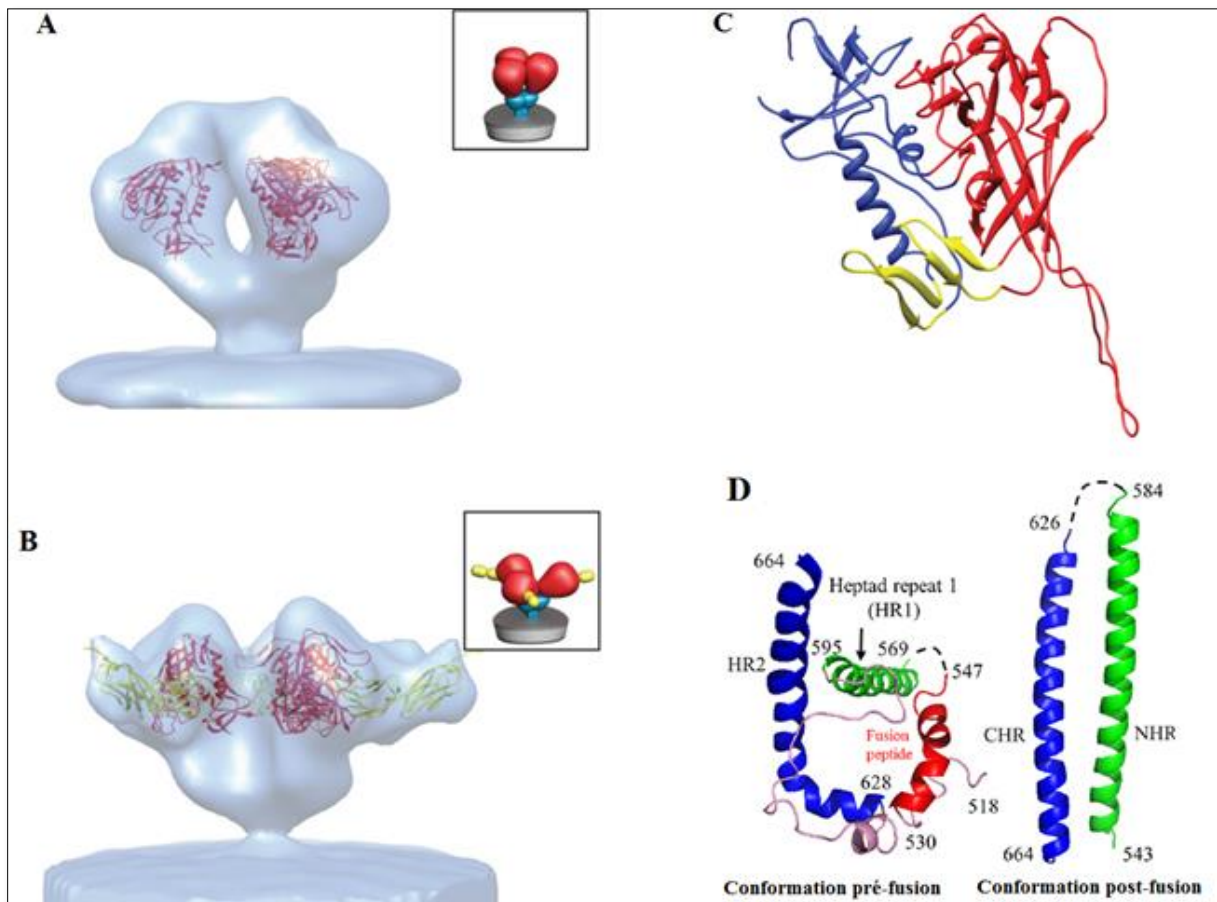


Figure 5 : Structures des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 (Adaptées de [77-79]). **(A) et (B)**, Cryo-tomographie électronique des trimères gp120 / gp41 du VIH-1 en conformations fermée et ouverte (déclenchée par le CD4 soluble) respectivement. Les coordonnées atomiques ajustées de gp120 sont indiquées en rouge, et celles du CD4 soluble sont indiquées en jaune. La gp41 est indiquée en cyan. **(C)**, Structure cristallographique de la gp120. Le domaine interne est en bleu, le feuillet de liaison « *bridging sheet* » est en jaune et le domaine externe avec la boucle V3 est en rouge. **(D)**, structure pré- et post-fusion de l'ectodomaine de la gp41 avec les différentes régions fonctionnelles.

Protéine de matrice (p17, MA) : Le domaine matriciel forme l'extrémité N-terminale du précurseur polyprotéique Pr55^{Gag} et, pendant la synthèse de Pr55^{Gag}, le résidu Gly N-terminal de la matrice est modifié par la fixation covalente d'un fragment d'acide myristique [80]. Dans les virions matures, la protéine p17 est un polypeptide de 132 acides aminés qui s'associe en trimères tapissant la surface interne de l'enveloppe virale [81] (figure 6). Elle possède une séquence signal de localisation nucléaire, une séquence d'export nucléaire et une séquence de transport à la membrane. Cette protéine intervient de manière fondamentale dans différentes étapes de la réplication virale, à la fois au début et à la fin du cycle de vie du virus. Elle est impliquée dans le processus de pénétration virale en interagissant avec le domaine cytoplasmique de la protéine gp41 et aussi dans l'importation nucléaire du complexe de pré-

intégration ou PIC (Pre-Integration Complex). De plus, la p17 permet le ciblage de Pr55^{Gag} vers la membrane plasmique cellulaire induisant l'assemblage du virus au niveau de la membrane, et favorise l'incorporation des glycoprotéines gp41/gp120 dans l'enveloppe des virions en maturation [82, 83].



Figure 6 : Structure de la matrice du VIH-1 en trimère [84]. Les sous-unités sont colorées en rouge, bleu et en vert

Protéine de capsid (p24, CA) : La p24 (ou protéine de **capsid**, CA), libérée de la polyprotéine Pr55gag par la protéase virale est la composante principale de la capsid du VIH-1 mature, également appelée noyau du VIH-1. Cette capsid est caractérisée par une forme conique composée d'environ 1500 monomères de la protéine p24 entourant le complexe nucléoprotéique d'ARN viral chez les virions matures. Les monomères de capsid s'assemblent en 250 anneaux hexamériques et 12 pentamères qui servent d'unités de base formant la structure conique (figure 7). La CA est une composante essentielle pour l'infection car elle est impliquée pendant les étapes précoces du cycle viral telles que la transcription inverse et l'import nucléaire et aussi lors des étapes tardives comme l'assemblage et la maturation [85].

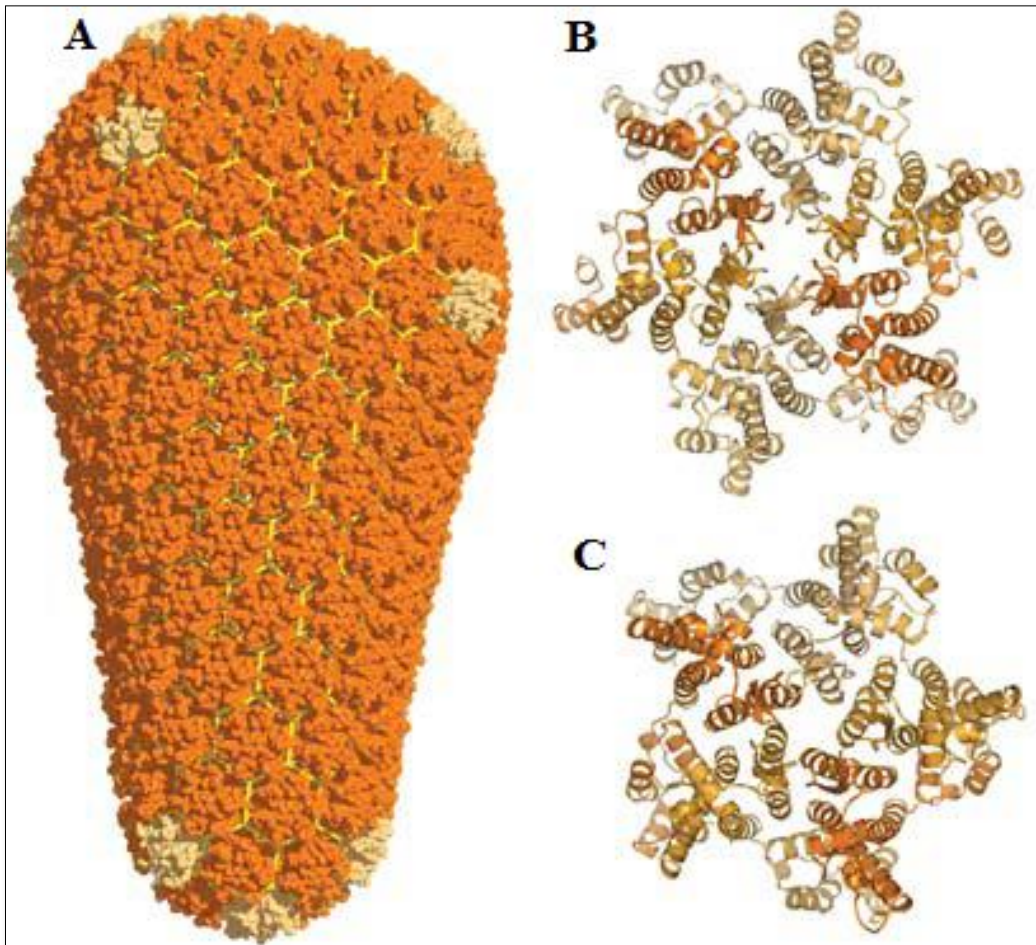


Figure 7 : Structure de la capside du VIH-1 [86]. (A), Modèle moléculaire de la capside du VIH-1, avec des hexamères en orange et des pentamères en beige. (B), Structure de l'hexamère des protéines de CA VIH-1. (C), Structure du pentamère des protéines de CA

Protéine de nucléocapside (p7, NC) : La NCp7 est une petite protéine basique de 55 acides aminés, dérivée de la protéine précurseur Pr55gag [87]. Elle est caractérisée par la présence de deux domaines à doigts de zinc, contenant chacun le motif invariant de liaison aux ions métalliques $CX_2CX_4HX_4C$ ou CCHC, et qui sont connectés par un peptide de liaison flexible [88] (figure 8). Cette structure lui confère une forte affinité pour les acides nucléiques; environ 1500 à 2000 molécules de nucléocapside (NC) recouvrent et protègent l'ARN génomique viral en formant des oligomères [89].

La NCp7 mature est multifonctionnelle ; elle possède une activité chaperonne d'acides nucléiques, ce qui signifie qu'elle facilite le remodelage des structures de l'acide nucléique viral pour former les conformations les plus thermodynamiquement stables. Cette activité est essentielle pour la réplication du virus et joue un rôle crucial dans la médiation d'une transcription inverse hautement spécifique et efficace. De plus, la NC est importante pour

l'intégration de l'ADN viral dans le chromosome de la cellule hôte et pour la maturation virale [90, 91].

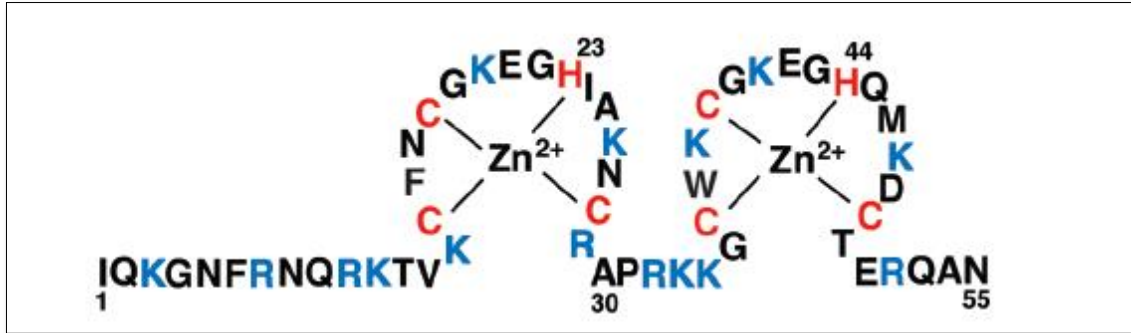


Figure 8 : Séquence de la protéine de nucléocapside du VIH-1 (NL4-3 isolate) [91]. Les résidus cystéine et histidine sont indiqués en rouge et les résidus basiques sont marqués en bleu.

La protéine p6 : Le domaine p6 situé à l'extrémité C-terminale du Pr55^{Gag} est impliqué dans la formation des virions [92]. Cette protéine est composée de 52 acides aminés et considérée comme la principale phosphoprotéine des particules du VIH-1. Elle possède deux domaines tardifs : PTAP et YPXnL qui interviennent durant la phase tardive du cycle viral en interagissant avec le domaine TSG101 (*Tumor Susceptibility Gene 101*) et la protéine ALIX (*ALG-2 interacting protein X*) associés au complexe ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), qui permet de catalyser la fission de la membrane cellulaire pour accomplir le processus du bourgeonnement [93-95]. Cette protéine possède aussi une séquence LXXLF qui participe à l'incorporation de la protéine Vpr dans le virion néoformé (figure 9) lors de l'assemblage viral [96]. De plus, la p6 intervient dans le contrôle de la taille des particules virales [97].

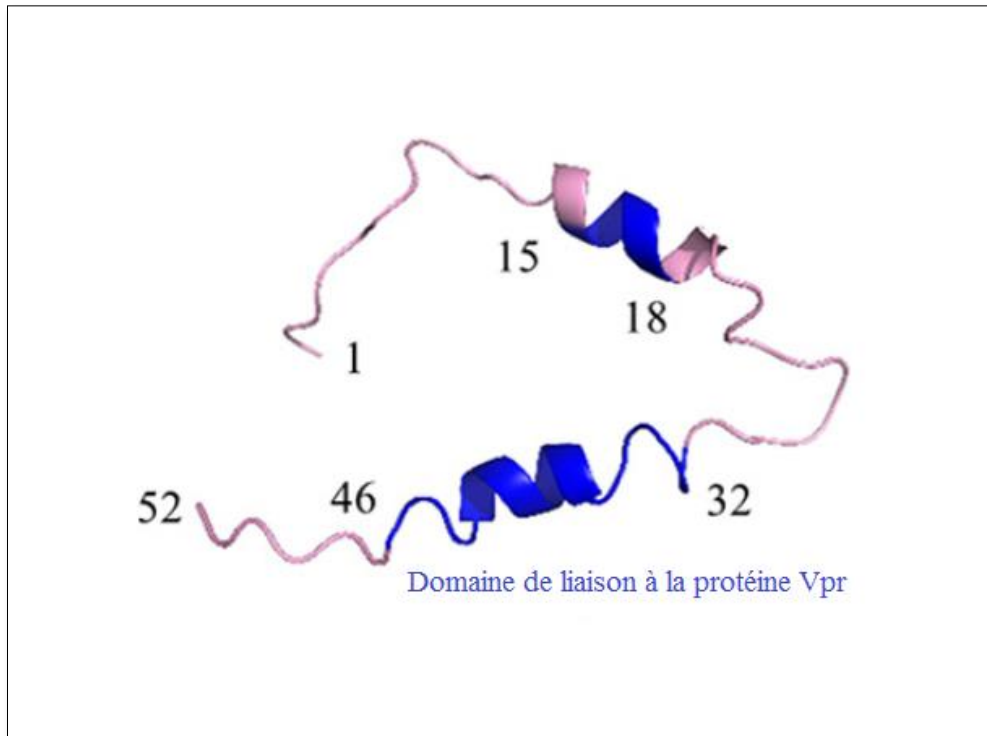


Figure 9 : Structure de la protéine p6 [78]

IV.3.2 - Les protéines enzymatiques

La protéase (p11, PR) : La protéase est une petite enzyme de 99 acides aminés et qui fait partie de la famille des aspartyl-protéases [98]. Elle est synthétisée dans le cadre du Pr160^{Gag-Pol} et est responsable de sa propre libération à partir de ce précurseur. Contrairement aux protéases aspartiques cellulaires qui sont actives en tant que monomères, l'activité catalytique de la protéase du VIH-1 nécessite la formation d'un homodimère symétrique [99]. Le site actif de cette protéine se trouve à l'interface des deux monomères, et est constitué de deux triades catalytique Asp25-Thr26-Gly27 [100] et couvert par deux régions flexibles « Flaps » contrôlant l'entrée du substrat polypeptidique [101] (figure 10). La p11 influence de manière vitale le cycle viral car elle clive les polyprotéines Gag et Gag-Pol en protéines structurales et fonctionnelles matures nécessaires à l'assemblage et la maturation du virus [102].

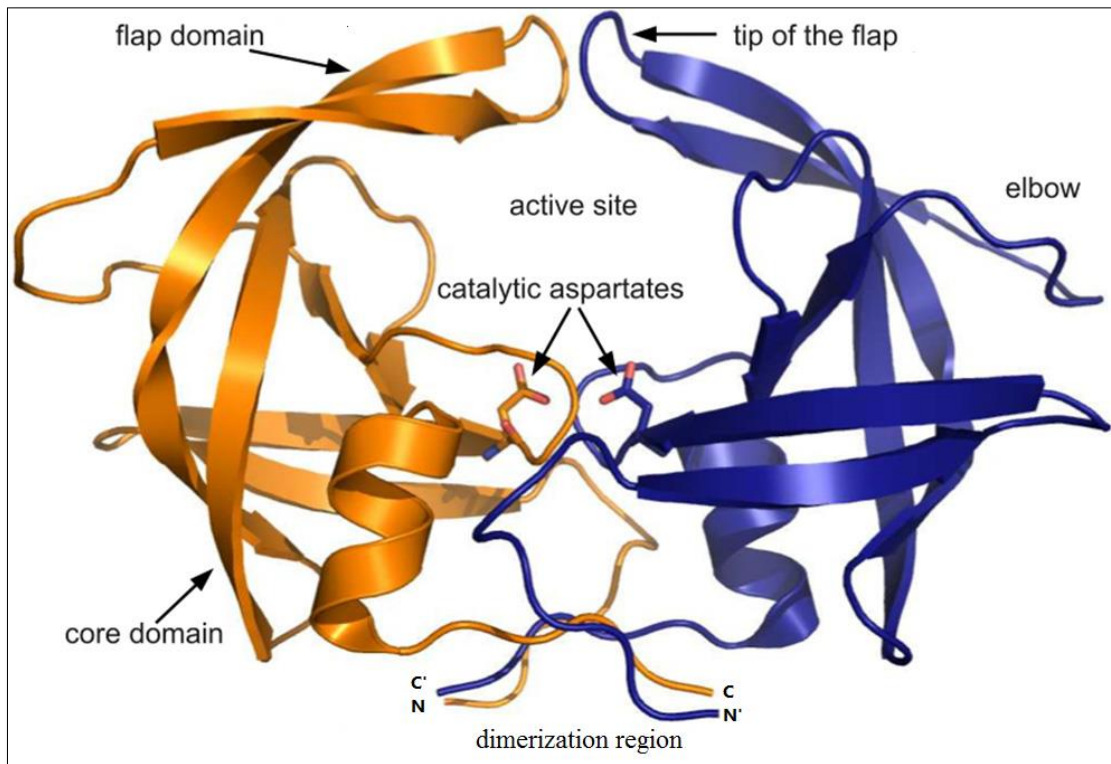


Figure 10 : Structure du dimère de la protéase du VIH-1 [103].

Les monomères sont représentés en orange et bleu.

La rétrotranscriptase (p66/p51, RT) : La transcriptase inverse (TI) ou rétrotranscriptase (RT) est une enzyme multifonctionnelle dérivée de la polyprotéine Gag-Pol, et responsable de la rétrotranscription du génome rétroviral à ARN simple brin en ADN linéaire double brin, qui est ensuite intégré dans le génome hôte par l'intégrase virale. Elle présente donc à la fois une activité polymérase ARN et ADN dépendante, capable d'incorporer les déoxyribonucléotides aussi bien sur l'ADN que l'ARN, et une activité ribonucléase H (RNase H) responsable de la dégradation de l'ARN sous forme hybride dans les deux sens 5' - 3' et 3' - 5' [104]. Cette action engendre des oligonucléotides, 3'OH et 5'P de 6 à 10 résidus de long, qui serviront d'amorces pour l'initiation de la synthèse d'ADN grâce à l'activité polymérase de la TI.

La RT est active sous forme d'un hétérodimère asymétrique composé de deux chaînes polypeptidiques apparentées : p66 et p51 composées respectivement de 56 et 440 acides aminés. Toute l'activité enzymatique de la RT est associée à la sous-unité p66 qui contient deux domaines spatialement distincts : la polymérase à son extrémité N-terminale, en commun avec la p51, et un domaine RNase H à son extrémité C-terminale [105, 106]. La sous-unité p51 issue du clivage protéolytique d'une unité p66 (élimination du domaine RNase de p66), est

catalytiquement inactive mais elle joue un rôle d'échafaudage structurel dans l'hétérodimère de la TI [107]. Les deux domaines polymérase de p66 et p51 se composent de 4 sous-domaines : les doigts (*fingers*), la paume (*palm*), le pouce (*thumb*) et la *connection* qui relie la polymérase et la RNase H et qui est critique pour l'interaction TI-acide nucléique [104] (figure 11).

L'activité ADN polymérase de la TI est caractérisée par une faible fidélité qui se traduit par l'accumulation de mutations dans le génome du VIH-1. Ces mutations sont à l'origine de la haute diversité génétique du VIH-1.

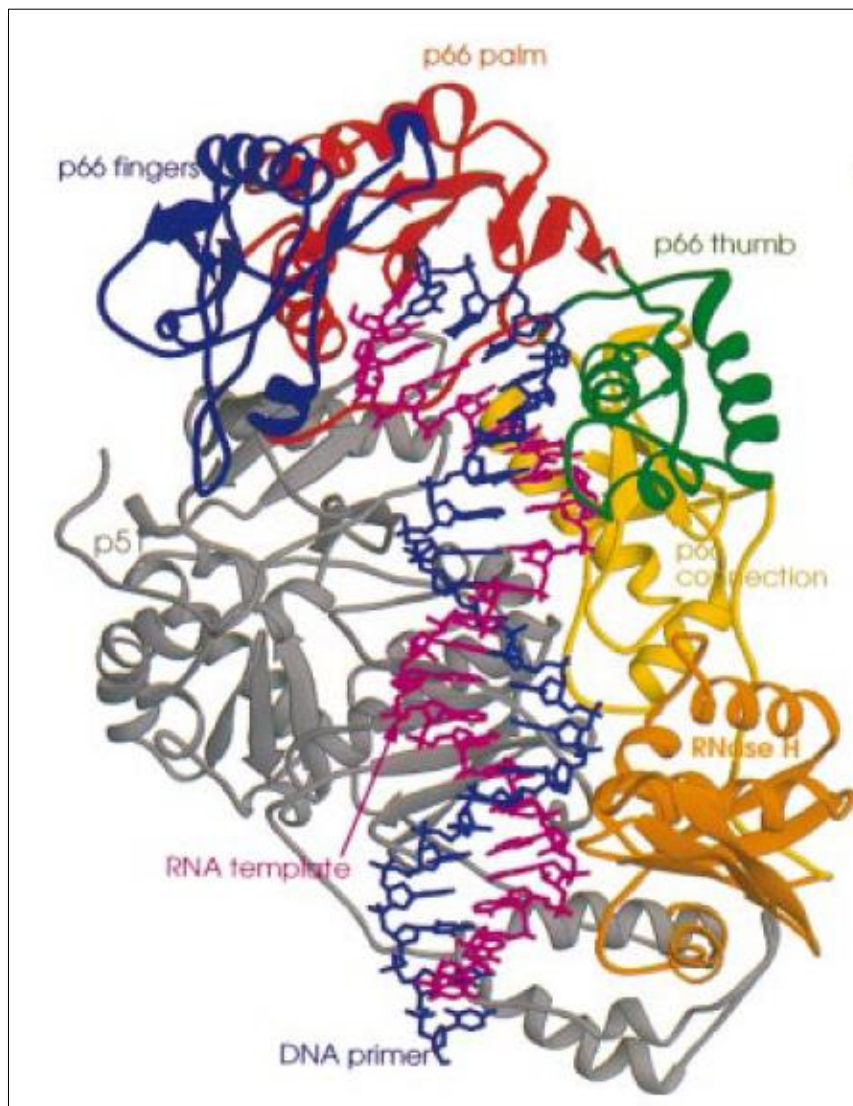


Figure 11 : Structure de la transcriptase inverse du VIH-1 en complexe avec des acides nucléiques [108]. Les sous-domaines de la sous-unité p66 sont représentés en différentes couleurs. La sous-unité p51 est colorée en gris. Les brins de l'ARN matrice et de l'amorce d'ADN sont représentés en magenta et bleu, respectivement.

L'intégrase (p32, IN) : L'intégrase est l'enzyme qui catalyse l'étape de l'insertion covalente de l'ADN proviral produit par la transcriptase inverse dans l'ADN de la cellule hôte. C'est une

protéine de 288 acides aminés (32 kDa), produite à partir du précurseur polyprotéique Pr160^{Gag-Pol} et active sous forme multimérique [109]. Elle se compose de trois domaines fonctionnels distincts :

- Un domaine N-terminal (IN¹⁻⁴⁹) avec un motif conservé « HHCC » analogue à un doigt de zinc qui lie le Zn²⁺, favorisant éventuellement la multimérisation de la protéine, un processus clé de l'intégration [110] ;
- Un domaine central ou domaine catalytique (IN⁵⁰⁻²¹²) contenant une triade catalytique (D, D-35, E) hautement conservée, qui est indispensable pour l'activité enzymatique [109] ;
- Un domaine C-terminal (IN²¹³⁻²⁸⁸) qui est le domaine le moins conservé. Ce domaine se lie de manière non spécifique à l'ADN et donc principalement impliqué dans la stabilité du complexe IN-ADN [111].

La structure complète du protomère d'intégrase (IN1 288), des oligomères ou les complexes de ces structures avec l'ADN n'a pas été déterminée, à cause de problème de solubilité et de faible flexibilité inter-domaines. Néanmoins, des études ont élucidé plusieurs structures de domaines isolés (figure 12) ou de deux domaines consécutifs (figure 13) [112, 113]. Ces différents domaines sont présents sous forme de dimères qui se forment à chaque extrémité de la molécule d'ADN viral [114].

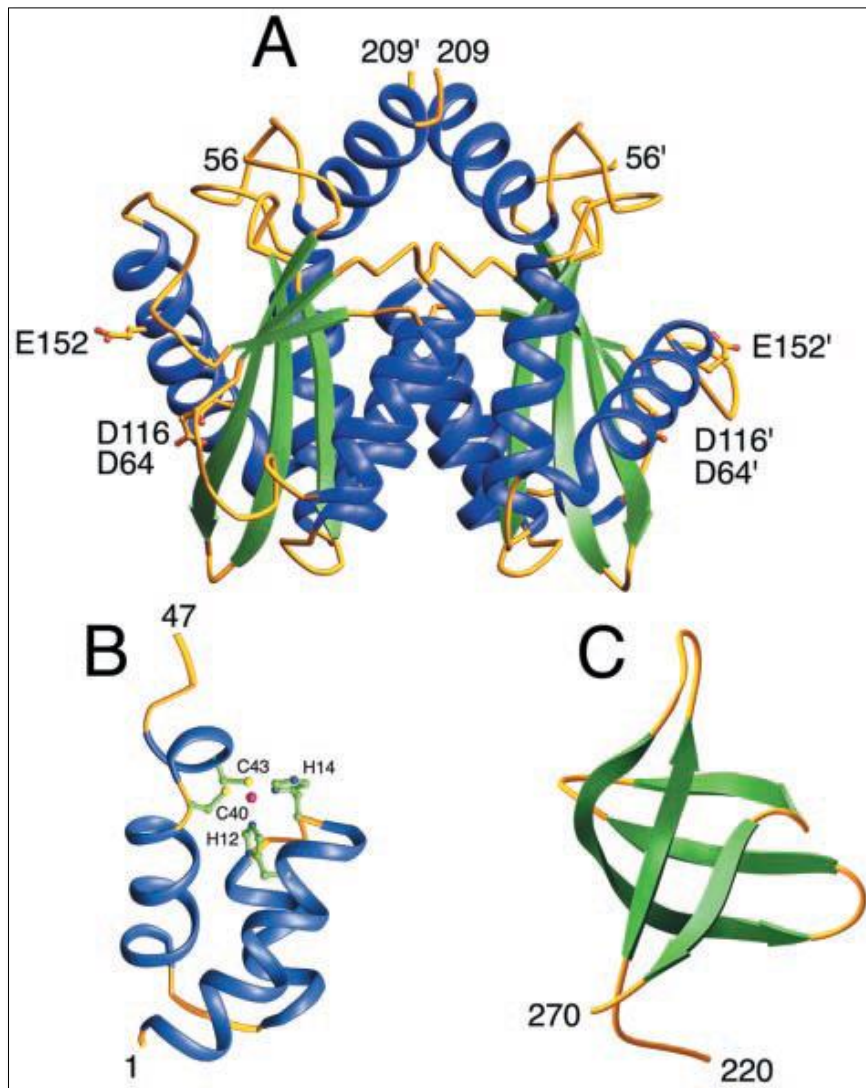


Figure 12 : Structures des trois domaines isolés de l'intégrase du VIH-1 [115]. (A) le domaine catalytique ; (B) le domaine N-terminal ; (C) le domaine C-terminal.

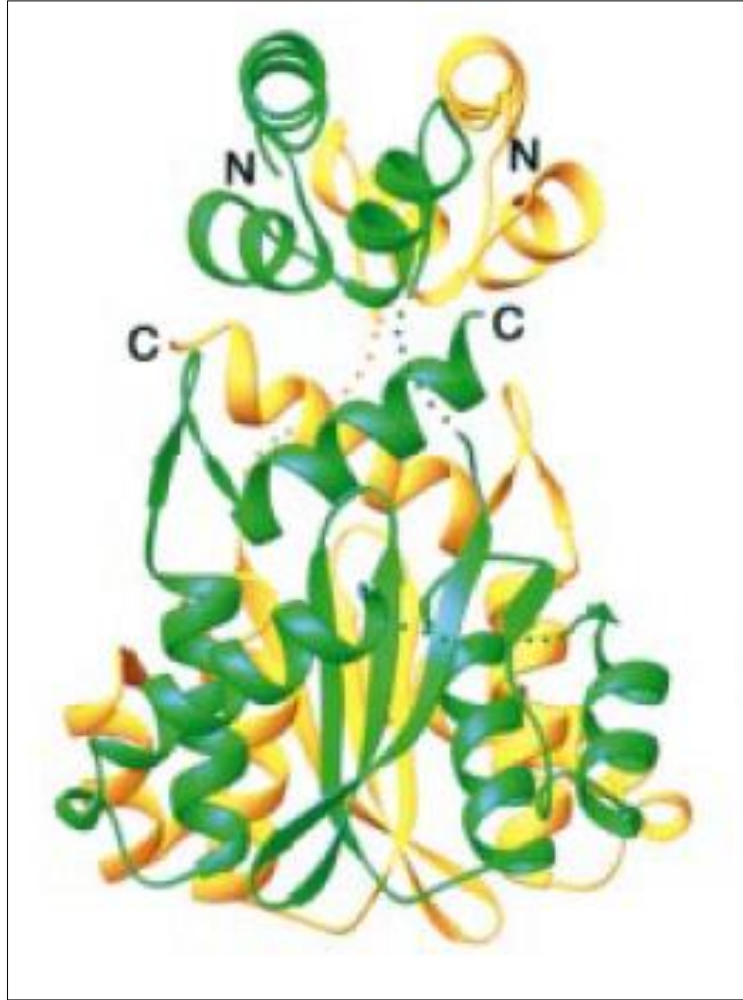


Figure 13 : Structure d'un dimère du double domaine NTD-CCD (IN¹⁻²¹²) de l'intégrase du VIH-1 [113]

IV.3.3 - Les protéines régulatrices

Tat (Transactivator of transcription) : La protéine Tat est une protéine régulatrice codée par deux exons et comme son nom l'indique, c'est une activatrice clé de la transcription du VIH-1. Cette protéine exprimée au début du cycle de vie viral est essentielle à la réplication du VIH-1 et module également l'expression des gènes responsables de la survie et de la prolifération cellulaire. La tat se compose de 86–104 acides aminés et son poids varie de 14 à 16 kDa. Toutefois, Il a été démontré que les formes incomplètes de cette protéine virale (de 58 à 72 acides aminés) peuvent également être biologiquement actives [116]. L'analyse mutationnelle de la protéine Tat a permis d'identifier deux domaines fonctionnels importants: une région riche en arginine qui est nécessaire pour se lier à une séquence d'ARN spécifique du LTR des ARNm naissants appelé TAR (*Trans-acting Responsive element*), et un domaine d'activation impliqué dans ses interactions avec la machinerie cellulaire [117, 118]. En se liant à la région TAR, la

protéine Tat modifie les propriétés du complexe de transcription, en recrutant au promoteur viral des enzymes avec une activité acétyl- transférase, qui changent la conformation de la chromatine au site d'intégration provirale. De plus, Tat recrute le complexe d'élongation de transcription positive (P-TEFb), aussi appelé TAK (*Tat-associated kinase*) composé de la kinase CDK9 cellulaire et de la cycline T1. Ce complexe régule la transcription dépendante de l'ARN polymérase II en permettant l'activation de l'élongation suite à l'action de la CDK9, qui phosphoryle les résidus sérine du domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II (figure 14) [119-121].

La Tat permet également de réguler les niveaux d'expression d'un certain nombre de gènes cellulaires. Par exemple, il a été démontré que cette protéine régule positivement les niveaux d'expression de certaines cytokines du CD4 (le principal récepteur du VIH), du corécepteur du VIH-1 CCR5, et du récepteur de l'interleukine-2 (CD25) dans les cellules infectées par le VIH-1 [122-124]. De plus, elle régule négativement plusieurs gènes, tels que le gène codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I [125].

La Tat est capable également, après sa libération à partir des cellules infectées, d'entrer dans des cellules non infectées et agir directement sur les gènes cibles; elle représente donc un facteur déterminant de la progression vers le stade SIDA [126, 127]. La régulation positive des gènes cellulaires par Tat entraîne par conséquent des effets supplémentaires, tels que l'activation de l'apoptose et l'immunosuppression [128, 129]. Dans certaines conditions, cette protéine inhibe l'apoptose par l'induction du gène bcl-2 [130, 131].

Vu son rôle pivot dans la réplication virale et dans la pathogenèse de la maladie, Tat et les voies cellulaires qu'elle cible figurent aujourd'hui parmi les cibles thérapeutique anti-VIH.

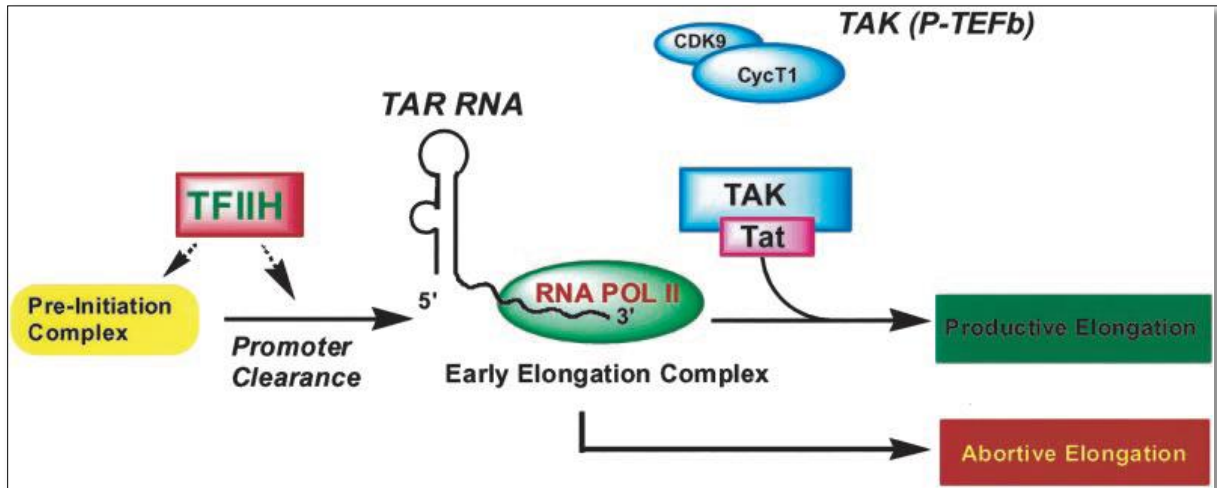


Figure 14 : Mécanisme d'activation transcriptionnelle par la protéine Tat [132]. La transcription est initiée par L'ARN polymérase II humaine à partir du promoteur du VIH et la kinase de TFIID (Transcription factor II Human) intervient aux étapes de clairance du promoteur. TFIID quitte le complexe d'élongation lorsque l'ARNm de 30 à 36 nt est transcrit (40). L'allongement est inefficace en l'absence de protéine Tat. Tat recrute le complexe de kinase P-TEFb (TAK pour la kinase associée à Tat) à l'ARN TAR via la mise en contact de l'ARN et de la cycline T1 du complexe. Ensuite, la kinase CDK9 phosphoryle l'ARN polymérase II et d'autres substrats dans le complexe d'élongation, ce qui permet la processivité de la transcription.

Rev (Regulator of expression of viral proteins) : La protéine Rev composée de 116 acides aminés (18 kD), est générée pendant la phase précoce de réplication virale par la traduction d'un ARNm épissé de 2 kb. C'est une protéine régulatrice et trans-activatrice capable de contrôler l'expression différentielle des protéines virales au niveau post-transcriptionnel en permettant l'export nucléaire des ARNm non et mono épissés du VIH-1, et leur accumulation au niveau du cytoplasme [133-135]. Pour cela, la protéine Rev contient au niveau de son extrémité N-terminale, une séquence riche en arginine appelée ARM (*Arginine Rich Motif*), qui sert à la fois de signal de localisation nucléaire (NLS) et de domaine de liaison à l'ARN (RBD) [136-138]. Elle est flanquée de séquences composant le domaine de multimérisation qui est riche en acides aminés hydrophobes [139, 140] (figure 15). Ces derniers permettent de stabiliser la structure tridimensionnelle de la protéine et de promouvoir l'interaction entre deux protéines Rev.

La Rev possède également un signal d'exportation nucléaire (NES) riche en résidus leucine situé au niveau de son extrémité C-terminale (figure 15). Ce signal ainsi que le signal de localisation nucléaire fonctionnent en accédant aux voies cellulaires pour l'importation et l'exportation nucléaires [138, 141, 142].

Après sa traduction, la protéine Rev interagit avec un récepteur d'import nucléaire, l'importine β , via son domaine NLS et traverse les pores nucléaires. Au niveau du noyau, la protéine Rev se détache de l'importine et se lie à son élément de réponse RRE (*Rev Responsive Element*)

composé de 350 nucléotides, intégré dans le gène *env* au niveau des ARNm viraux non et mono-épissés [137, 138].

Les assemblages Rev-ARN recrutent par la suite Crm1 et d'autres protéines cellulaires via le domaine NES pour former des complexes qui seront exportés du noyau. Une fois dans le cytoplasme, ces complexes se dissocient et les ARNm viraux non et mono-épissés seront encapsidés dans des virions naissants ou traduits en protéines structurales et enzymatiques virales. L'activité de la Rev est donc indispensable pour la réplication virale [143].

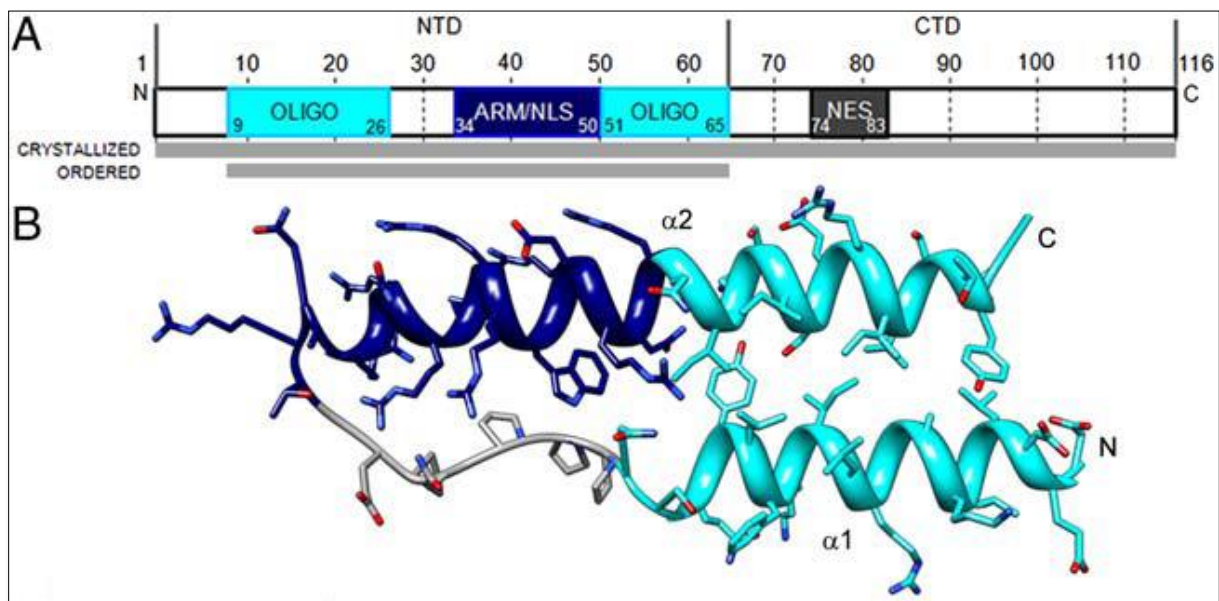


Figure 15 : Structure de la protéine Rev [144]. (A) Organisation des domaines de la Rev. Les séquences de l'oligomérisation (domaine de multimérisation), le motif riche en arginine (ARM) / séquence de localisation nucléaire (NLS) et le signal d'exportation nucléaire (NES) sont représentés en cyan, bleu marine et en gris foncé, respectivement. **(B)** Représentation en ruban du monomère de la Rev montrant le motif hélice-boucle-hélice.

IV.3.4 - Les protéines accessoires

Nef (Negative factor, p27) : La protéine Nef du VIH-1 est une phosphoprotéine auxiliaire d'environ 27 kDa (206 acides aminés) qui est synthétisée à des fortes concentrations au cours des stades précoces de l'infection virale. Elle est présente au niveau du cytosol et également en association avec la membrane cytoplasmique par un groupe myristate attaché à son extrémité N-terminale. Nef a d'abord été soupçonné de réprimer la transcription et inhiber la réplication virale, d'où son acronyme : facteur négatif. Cependant, la majorité des études ont confirmé par la suite que la protéine Nef est un facteur primordial pour la réplication du VIH et pour sa pathogénicité [145-147]. C'est une protéine sans activité enzymatique dont l'action est basée sur sa capacité d'interagir avec plusieurs protéines cellulaires.

D'après les premières expériences de cristallographies aux rayons X et les expériences de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) [148, 149], la protéine Nef (figure 16) se compose de :

- Un noyau (core) structuré (acides aminés 62–147 et 179-200) contenant la plupart des motifs nécessaires pour la liaison à différentes protéines cellulaires ;
- Une extrémité N-terminale flexible myristoylée : acides aminés 2–61 ;
- Une extrémité C-terminale : acides aminés 201–206 ;
- Une boucle interne flexible (acides aminés 148–178) contenant des motifs de liaison qui permettent à la Nef d'interagir avec les voies endocytiques de la cellule.

Nef remplit plusieurs fonctions :

- Augmente la survie des cellules infectées, car elle régule négativement l'expression des molécules de surface cellulaire telles que le CD4 (le principal récepteur du virus), le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et de classe II, CD28 et CD3. Cette régulation négative se produit suite au déclenchement de l'endocytose rapide et la dégradation lysosomale de ces molécules [150-152] ;
- Renforce l'infectiosité du virus et améliore la réplication virale ;
- Altère les voies d'activation des lymphocytes T [153].

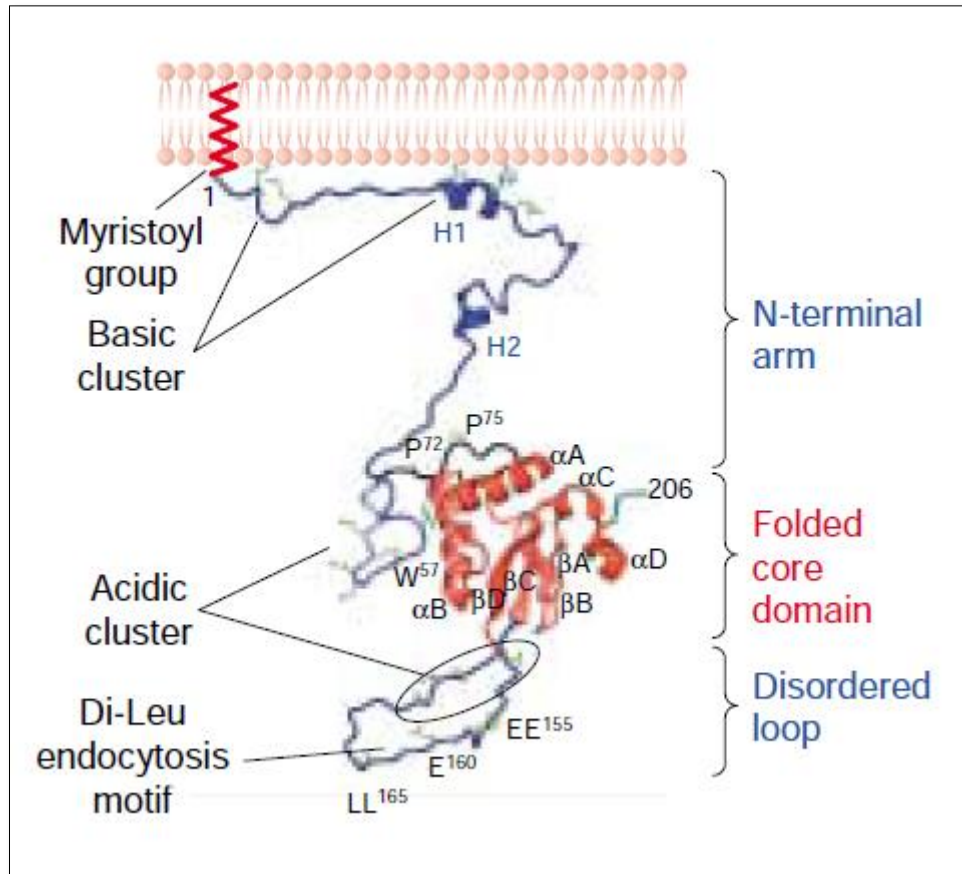


Figure 16 : Structure de la protéine Nef, ancrée à la membrane cellulaire [154]. Les régions flexibles de la Nef [l'extrémité N-terminal et la boucle interne] sont colorées en bleu. Le noyau (core) et l'extrémité queue C-terminale sont représentés en rouge et en cyan, respectivement.

Vif (Viral infectivity factor) : La protéine Vif du VIH-1 est une phosphoprotéine accessoire de 23KD (192 résidus), synthétisée pendant la phase tardive de l'infection virale et intégrée dans le virion par sa liaison à la région 5' de l'ARN génomique et la partie C-terminale de Gag. C'est une protéine cytosolique, qui existe à la fois en tant que fraction soluble dans le cytoplasme et en tant que protéine liée au côté cytoplasmique de la membrane [155, 156]. Elle se présente sous forme monomérique ainsi que sous diverses formes oligomériques [157].

Cette protéine joue un rôle essentiel dans la réplication et l'infectivité du VIH-1 dans les cellules dites "restrictives" ou "non permissives", comme les lymphocytes T CD4+ et les macrophages primaires, à titre d'exemple. Dans ces cellules, le virus déficient en Vif est incapable de produire des particules infectieuses [158, 159]. Par contre, dans les cellules permissives comme certaines lignées lymphocytaires tumorales, Vif n'est pas nécessaire pour la réplication virale.

L'action principale de Vif est de perturber l'activité antivirale de l'enzyme humaine APOBEC3G (en anglais, *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*

3G) [160]. En effet, cette enzyme est une cytidine désaminase qui provoque des mutations au niveau des acides nucléiques viraux [160]. Pour cela, Vif s'associe à l'APOBEC3G et recrute un complexe protéique d'Ubiquitine ligase E3 (Cullin-5, ElonginB, ElonginC, Ring-box-1) qui va cibler APOBEC3G vers la dégradation protéasomale, empêchant ainsi son empaquetage dans les nouvelles particules virales [161, 162]. En l'absence de Vif, APOBEC3G peut bloquer la rétrotranscription de l'ARN rétroviral [160], affectant donc la capacité répliquative du virus. Vif exerce également autres fonctions biologiques nécessaires à la réplication du VIH-1, telles que :

- L'inhibition de la synthèse de la protéine APOBEC3G [163] ;
- L'amélioration de la stabilité du noyau (core) du VIH-1 et l'inhibition de la dégradation prématurée ou le désassemblage des complexes nucléoprotéiques grâce à son interaction avec la nucléocapside (Vif-NC^{Gag}) [164] ;
- L'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 [165] ;
- La régulation de l'initiation de la rétrotranscription grâce à son activité chaperonne, qui lui permet d'empêcher la formation prématurée du complexe d'initiation ou l'encapsidation précoce des dimères d'ARN [166].

Vif se compose de plusieurs domaines fonctionnels (figure 17) :

- Le domaine N-terminal (NTD) (résidus 1-64), contenant la région de liaison à l'ARN [167] et la région principale d'interaction avec APOBEC3G [168] ;
- Le domaine central (résidus 65-100), est également impliqué dans les interactions avec APOBEC3G (via les résidus 73-99), ainsi qu'avec la protéase virale [169]. Ce domaine est suivi d'un motif en doigt de zinc de type CCHH (résidus 108-139), permettant l'interaction avec la Cullin-5 [170] ;
- Le domaine C-terminal (CTD) (résidus 141-192), est important pour la viabilité du virus car il est impliqué dans les interactions de Vif avec les deux composants du complexe d'ubiquitination E3 (ElonginC et Cullin-5) [171], avec la nucléocapside (NCp7) de la protéine Gag du VIH-1 [172], APOBEC3G [173], ainsi qu'avec la membrane de la cellule hôte [174].

Vu le rôle essentiel de la protéine Vif dans l'infectivité du VIH-1, elle est considérée comme cible thérapeutique pour développer des médicaments anti-VIH-1 inhibant sa fonction.

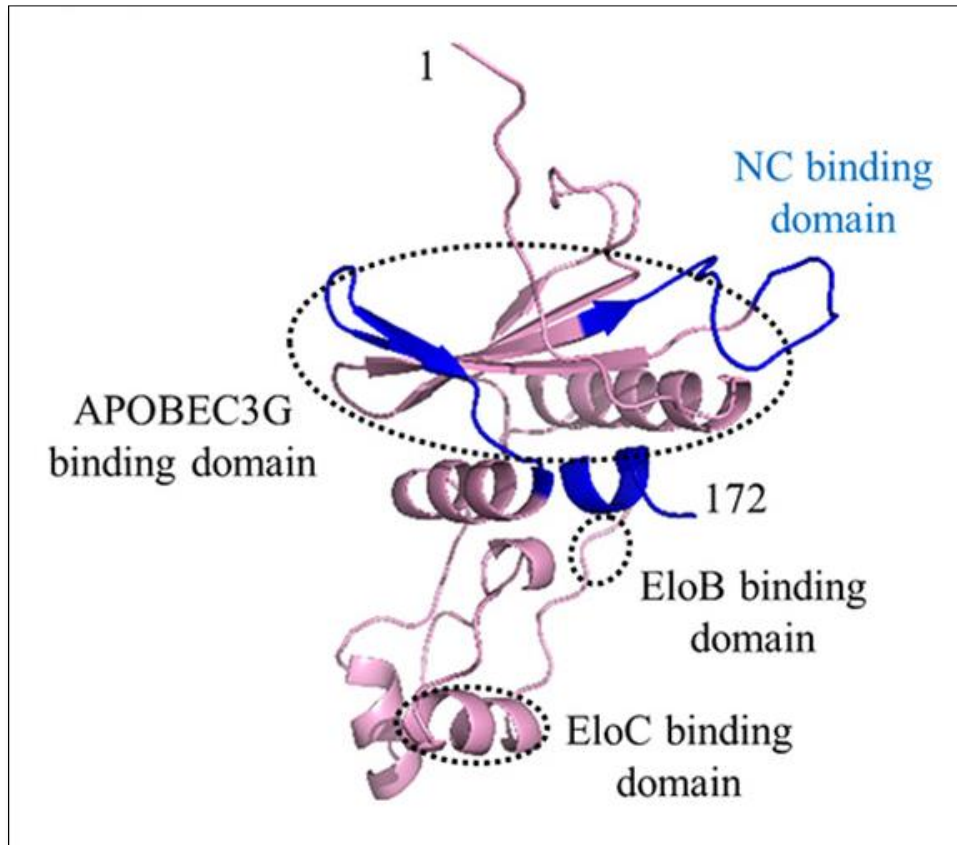


Figure 17 : Unités fonctionnelles de la protéine Vif [78]

Vpu (Viral Protein U): La Vpu du VIH-1 est une protéine membranaire oligomérique appartenant à la famille des viroporines. Elle est traduite à partir d'un ARNm bicistronique codant également pour la protéine Env [175, 176]. Vpu est exprimée à un stade avancé de l'infection et contribue à l'augmentation de la production et la propagation des virions [177]. Cette petite protéine de 81 acides aminés (16 kDa) est composée de deux domaines principaux (figure 18) [178, 179]:

- Un domaine hydrophobe N-terminal (transmembranaire) (27 résidus), qui fonctionne à la fois comme peptide signal et ancre membranaire ;
- Un domaine cytoplasmique (54 résidus) qui contient une paire de résidus sérine (aux positions 52 et 56) phosphorylés par la caséine kinase II [180].

Vpu a deux fonctions principales relatives au bourgeonnement des particules virales, au cours du cycle réplcatif du VIH-1.

La première consiste à diminuer, via son domaine cytoplasmique [179], le niveau d'expression du récepteur CD4 en induisant son ubiquitination et sa dégradation protéasomale au niveau du réticulum endoplasmique (RE) [181]. Cette régulation négative du CD4 empêche l'élimination des cellules infectées et contribue par conséquent, à la propagation du virus.

La deuxième fonction du Vpu est la régulation de la libération des virions via son domaine transmembranaire, par l'inactivation fonctionnelle du facteur de restriction, BST-2 (*Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2*), qui est également connue sous le nom de CD317, HM1.24 ou tetherin [182]. La BST-2 est une protéine transmembranaire cellulaire, capable d'inhiber la libération du VIH-1 et d'autres particules virales enveloppées en les attachant directement à la membrane cellulaire [183]. Suite aux interactions entre les domaines transmembranaires de la Vpu et la BST-2, cette dernière est éliminée de la membrane plasmique des cellules infectées, et exclut donc des sites de l'assemblage des virions [184]. Cela conduit à la dégradation de BST-2 dans les lysosomes ou le protéasome [185]. De plus, le domaine cytoplasmique de Vpu est impliqué dans la redistribution subcellulaire de BST-2, la déplaçant hors des sites d'assemblage viraux au niveau de la membrane plasmique [186].

La contribution de Vpu à la transmission du VIH-1 ainsi que sa persistance au cours de la progression de la maladie mettent en évidence son fort potentiel thérapeutique.

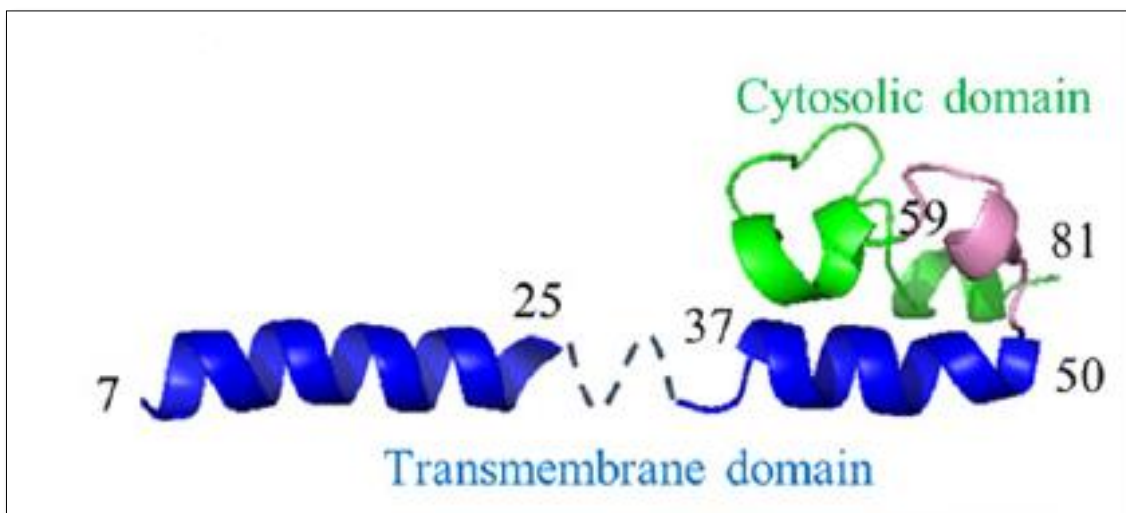


Figure 18 : Structure de la protéine Vpu [78]

Vpr (Viral Protein R) : Vpr est une petite protéine (14 kDa) de 96 acides aminés, et hautement conservée au sein de la famille des lentivirus de primates, notamment le VIH-1, VIH-2 et le SIV [187]. Cette protéine est exprimée à un stade tardif du cycle viral, mais elle est présente pendant les premières étapes de l'infection des cellules cibles puisqu'elle est spécifiquement encapsidée en quantités significatives dans des virions néoformés libérés par les cellules productrices [188]. Cette encapsidation se réalise grâce à une interaction directe de Vpr avec le domaine p6 situé à l'extrémité C-terminale de la polyprotéine Pr55^{gag} [189].

La structure de la protéine a été obtenue par RMN (figure 19) ; elle est caractérisée par trois hélices α amphiphiles bien définies: 17–33, 38–50 et 54–77 reliées par des boucles, et flanquées de domaines N et C-terminaux flexibles [190]. Ces hélices α forment un « cœur » hydrophobe, responsable de l'oligomérisation de Vpr. Il a été démontré que la Vpr forme des homo-oligomères au niveau ou à proximité de l'enveloppe nucléaire. De plus, des dimères et trimères de Vpr ont été trouvés dans le cytoplasme et dans le noyau [191].

Vpr est impliquée dans de nombreuses fonctions du cycle de réplication du VIH-1 :

- Facilite l'import nucléaire du complexe de pré-intégration (CPI) [192] ;
- Induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 [193] ;
- Déclenche l'apoptose des cellules infectées en interagissant directement avec le complexe formant le pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP) [194] ;
- Améliore la réplication virale dans des cellules indivisibles telles que les macrophages, et favorise également, dans une certaine mesure, la réplication virale dans les cellules T CD4 + proliférantes [195] ;
- Joue le rôle d'une protéine architecturale en réorganisant l'ADN viral en une structure plus compacte [196] ;
- Induit l'activation transcriptionnelle de la LTR du VIH-1 et d'autres promoteurs hétérologues [197].

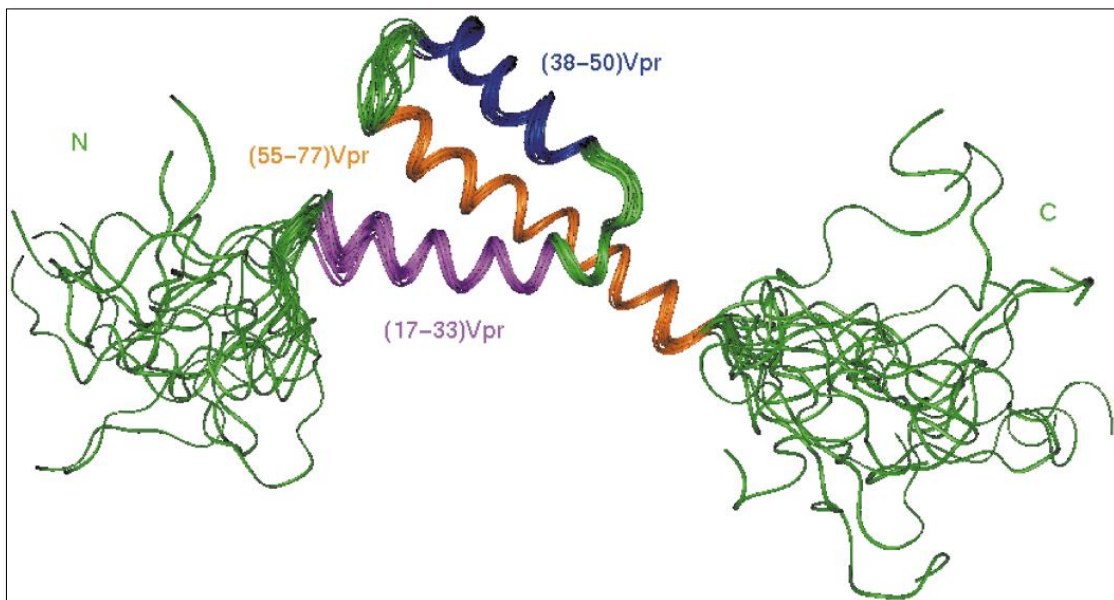


Figure 19 : Structure de la protéine Vpr du VIH-1 [190]. Superposition de 15 structures sélectionnées : les 3 hélices α sont colorées respectivement en mauve, bleu et orange. Les boucles et les domaines N et C-terminaux flexibles sont représentés en vert.

V - INTERACTION VIH-1/ CELLULE HOTE

V.1 - Les cellules cibles

En tant que parasite intracellulaire obligatoire, le VIH-1 n'assure son cycle de multiplication qu'au sein d'une cellule hôte disposant la machinerie nécessaire à la production de virus infectieux. Pour cela, le VIH-1 cible principalement les cellules présentant le récepteur CD4 à leur surface. Ce sont en premier lieu les lymphocytes T CD4+, mais également les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et les cellules microgliales.

Les lymphocytes T CD4+ ou lymphocytes T auxiliaires : Elles sont des cellules responsables de l'activation de l'immunité spécifique dirigée contre divers agents pathogènes. Ces cellules exprimant le récepteur viral CD4 et les deux types de corécepteurs nécessaires à l'infection par le VIH (CCR5 et CXCR4) selon leur état d'activation, constituent une cible privilégiée du VIH-1 [198]. La destruction de ces cellules conduit à l'arrêt du fonctionnement du système immunitaire, amenant alors au stade SIDA. Les T CD4+ sont redistribués via le sang et la lymphe vers divers organes, permettant ainsi une propagation du VIH-1 dans tout l'organisme. Cette propagation est assurée grâce à un transfert direct de cellule à cellule au travers des "synapses virologiques" et "polysynapses" [199, 200]. De plus, Les T CD4+ peuvent servir de réservoirs viraux potentiels du VIH-1 (les LT CD4+ quiescentes). Ces cellules quiescentes assurent la transmission de l'ADN viral aux cellules descendantes à chaque mitose, et permettent au VIH-1 d'être totalement invisible aux lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Néanmoins, la réplication virale peut reprendre au niveau des LT CD4+ quiescentes si elles subissent une activation cellulaire [201].

Les cellules dendritiques (CD) : Ces cellules consistent en une population cellulaire hétérogène présente dans le sang, les tissus lymphoïdes et divers tissus, y compris la muqueuse FGT (*Female Genital Tract*) [202, 203]. Au niveau des muqueuses, les CD sont les principales cibles du VIH-1 lors d'une contamination par voie sexuelle [204]. Ces cellules sont classées en deux types selon les lectines calcium-dépendantes exprimées au niveau de leur surface :

- ✓ Les CD interstitielles exprimant le DC-SIGN (*Dendritic Cell-specific ICAM3-Grabbing Non-integrin*, nommé aussi CD209). Elles sont localisées au niveau de la sous-muqueuse ;

- ✓ Les cellules de Langerhans (LC) exprimant la langérine et qui sont situées dans l'épithélium.

les CD peuvent être impliquées dans la pathogenèse du VIH-1, y compris l'infection de la muqueuse génitale, le transport du virus vers le tissu lymphoïde et la transmission du virus aux lymphocytes T [203]. Tous les sous-types de CD expriment, à divers degrés, le CD4 et les corécepteurs CCR5 et CXCR4, ainsi que d'autres récepteurs capables d'interagir avec le VIH-1 [205].

Les macrophages : Les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dont la fonction principale est la phagocytose et la destruction ultérieure des agents pathogènes dans les vésicules intracellulaires. Ces cellules sont ainsi capables de présenter les antigènes viraux aux lymphocytes T et d'intervenir dans la réponse immunitaire adaptative. De plus, elles sont impliquées dans la réponse immunitaire innée et notamment dans l'inflammation via la sécrétion de cytokines.

Les macrophages sont largement distribués dans les tissus du corps humain et constituent une cible privilégiée des souches R5 de VIH-1 [206]. En effet, ces cellules exprimant les récepteurs essentiels pour la liaison et la fusion du VIH-1 (CD4, CCR5 et CXCR4), sont parmi les premières cellules infectées par le VIH-1 au cours de l'infection [207].

Les macrophages issus de la différenciation des monocytes sanguins sont caractérisés par des capacités migratoires, permettant une dissémination active du virus dans tout l'organisme. Ils assurent également, grâce à leur capacité de franchir la barrière hémato-encéphalique, la transmission du VIH-1 aux cellules du SNC [208].

Les monocytes : Les monocytes sont les cellules de la lignée myéloïde dont dérivent les macrophages et des CD. Après la migration du sang vers les tissus, ces cellules se différencient, après stimulation, en macrophages. Les monocytes exprimant le récepteur viral CD4 et les corécepteurs CXCR4 et CCR5 peuvent être infectés mais de façon latente [209, 210]. De ce fait, elles sont considérées comme un réservoir potentiel pour le VIH-1, le protégeant ainsi de la défense immunitaire du corps et des traitements antiviraux [211].

Les cellules microgliales : Ces cellules constituent avec les macrophages périvasculaires les principales cibles du VIH-1 au niveau du SNC. Malgré la faible réplication virale au sein de

ces cellules, ces dernières peuvent être impliquées dans l'infection au VIH-1. En effet, les cellules microgliales peuvent servir de réservoirs du VIH-1 grâce à leur demi-vie relativement longue [212].

V.2 - Récepteurs du VIH-1

V.2.1 - Le récepteur cellulaire principal : CD4

Le CD4 a été identifié pour la première fois en 1977 à l'aide d'anticorps monoclonaux et initialement nommé T4 chez l'homme, W3 / 25 chez le rat et L3T4 chez la souris [213].

V.2.1.1 - Structure

Organisation génomique : Le gène codant pour le CD4 humain est localisé sur le chromosome 12 et se compose de neuf introns et de 10 exons [214]. Il a été démontré qu'une région de 2,6 kb en amont du site d'initiation de la transcription, ainsi que les deux premiers introns et exons, et une partie de l'exon 3, contiennent les séquences nécessaires à l'expression du CD4 à la surface des macrophages et des lymphocytes T auxiliaires matures [214, 215].

L'analyse de la séquence a montré une absence de sites de liaison à la boîte CAAT ou la boîte TATA, bien que des séquences consensus de la liaison des facteurs de transcription Ets-1 et Myb aient été identifiées. Un élément amplificateur supplémentaire en amont est nécessaire pour l'expression du CD4 à la surface des thymocytes double positifs (CD4 + CD8 +). Un élément silencieux (identifié chez la souris et situé dans le premier intron) est nécessaire pour empêcher l'expression de CD4 dans les cellules CD4-CD8- immatures et dans les cellules CD8 positives matures [216].

Structure protéique : La protéine CD4 est une glycoprotéine membranaire intégrale monomorphe d'un poids moléculaire de 51 kDa, appartenant à la superfamille des immunoglobulines. La protéine humaine mature se compose de 433 acides aminés, avec un ectodomaine de 371 acides aminés, une région transmembranaire de 24 acides aminés et un court domaine cytoplasmique multifonctionnel de 38 acides aminés [217]. La région extracellulaire est constituée de quatre domaines extracellulaires distincts (D1 à D4) (figure 20A) analogues à ceux des immunoglobulines [218]. La structure tridimensionnelle des deux premiers domaines (figure 20B) a été élucidée par cristallographie [219, 220]. Cette analyse cristallographie a montré que la conformation du premier domaine de la molécule CD4 est analogue au domaine variable des immunoglobulines. Toutefois, par analogie avec les Ig, la deuxième région hypervariable (CDR2) de CD4 comporte plus de résidus que le CDR2 des Ig

tandis que la boucle de la troisième région hypervariable (CDR3) est plus courte dans CD4 que dans son équivalent sur les Ig. Quant au deuxième domaine, il présente des analogies avec la région constante des immunoglobulines. Contrairement aux Ig, le pont disulfure de D2 de la molécule CD4 est situé entre deux feuillets parallèles, les feuillets B et C. De plus, D1 et D2 partagent un feuillet β , ce qui confère une grande rigidité à cette structure.

La partie intracellulaire est responsable de la palmitoylation de CD4 [221]. Elle contient également un motif structural (résidus 423-427) et un site de liaison au Lck (*Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) (figure 20C). Le domaine transmembranaire du CD4 contient un motif GGxxG conservé, qui a été signalé comme médiateur de la dimérisation des protéines membranaires [222]. Cependant, un tel effet n'a pas été confirmé pour le CD4. Au contraire, la mutation de ce motif en GVxxL réduit la capacité de la protéine CD4 à améliorer la sensibilité des lymphocytes T aux antigènes faibles [223]. Cela indique l'importance du domaine transmembranaire CD4 dans l'activation des lymphocytes T, mais le mécanisme moléculaire reste inconnu.

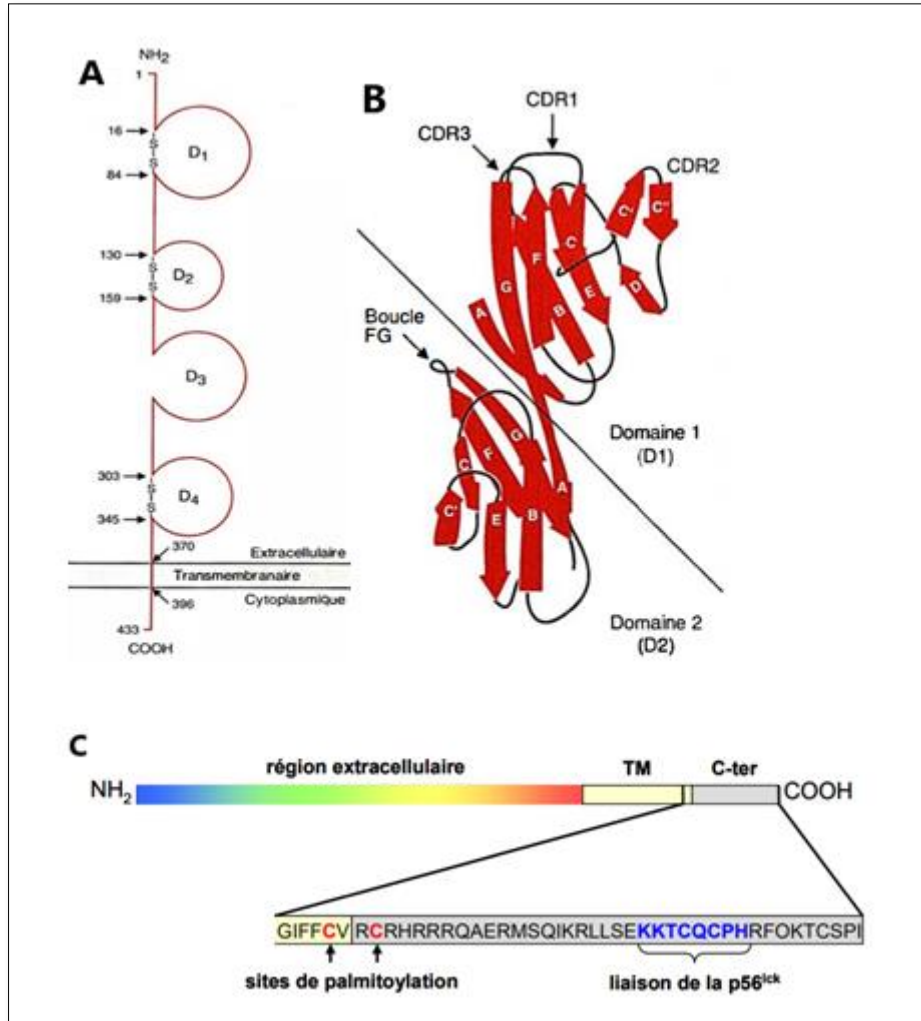


Figure 20 : Structure de la molécule CD4. (A) Les quatre domaines extracellulaires nommés D1, D2, D3 et D4, la région transmembranaire et le domaine cytoplasmique sont indiqués. Les domaines D1, D2 et D4 possèdent des ponts disulfures formés entre deux cystéines [224]. (B) Schéma cristallographique des deux domaines aminoterminaux de la molécule CD4 [224]. (C) Les sites de palmitoylation et de liaison de la kinase p56^{lck} de la partie intracellulaire (Adapté de [221]).

V.2.1.2 - Expression et fonctions biologiques

La protéine CD4 est exprimée principalement par une sous-population de lymphocytes T, mais également, par les macrophages, les monocytes, les granulocytes, les cellules dendritiques, les cellules microgliales et les progéniteurs des cellules myéloïdes. Dans les macrophages et les cellules NK, CD4 joue un rôle dans la différenciation, la migration et l'expression des cytokines [225, 226]. Dans les cellules T, il est impliqué dans le développement thymique et la reconnaissance antigénique en périphérie [227]. Bien que la fonction du CD4 dans le thymus soit bien connue, son rôle dans l'activation des cellules T périphériques reste énigmatique.

À l'origine, deux fonctions du CD4 dans les cellules T périphériques ont été suggérées: 1) CD4 stabilise le complexe TCR-CMHp [227], et 2) CD4 recrute la Lck à proximité du complexe TCR / CD3 afin de phosphoryler les motifs ITAM sur les chaînes CD3 et d'initier la signalisation intracellulaire pendant l'activation des lymphocytes T induite par l'antigène [227-230].

En fait, la protéine CD4 interagit avec la kinase p56lck via son domaine intracellulaire. Cette interaction limite l'endocytose constitutive de CD4 à travers des puits recouverts de clathrine. Du fait que cette kinase est spécifique des lymphocytes, un renouvellement plus important a été observé à la surface des lignées de monocytes [213].

Du côté extracellulaire, CD4 interagit avec le CMH-II présent sur les CPA via ses domaines D1 et D2, et agit comme une protéine d'adhésion. Sa fonction est d'aider et d'améliorer la transduction du signal via le récepteur TCR (T Cell Receptor) qui permet l'activation du lymphocyte après avoir interagi avec le CMH-II. Dans ce contexte, la séparation de la p56lck du CD4, et l'internalisation de ce dernier, pourrait être un mécanisme d'aide au détachement du complexe CD4-TCR du CMH-II, conduisant à la rupture du contact étroit entre la CPA et le lymphocyte [231]. Ce processus est important dans la maturation des thymocytes.

V.2.1.3 - Le rôle du CD4 dans l'infection au VIH-1

En 1986, McDougal et al. ont démontré que le CD4 est le principal récepteur de surface cellulaire pour le VIH [232]. D'autres études utilisant des anticorps monoclonaux contre le CD4 ont démontré que l'infection des lymphocytes T CD4 + par le VIH pouvait être bloquée [233, 234]. Conformément à ces résultats, l'expression forcée de CD4 par transfection génique dans des lignées cellulaires humaines a augmenté la susceptibilité au VIH. Cependant, l'expression forcée de CD4 dans d'autres lignées cellulaires de mammifères, comme celles de souris, a entraîné des infections virales non productives. Ces résultats contradictoires ont conduit à la conclusion qu'il existait des protéines spécifiques aux lignées cellulaires humaines, en plus du CD4, responsables d'infections virales et propagation, et les systèmes déficients en ces facteurs ne favorisent pas la réplication du VIH [235].

La liaison du gp120 au CD4 est une étape essentielle dans l'entrée de la plupart des virus VIH-1, VIH-2 et SIV. La première structure cristalline réussie d'un fragment de CD4 en complexe avec le noyau gp120 (figure 21) a été résolue par Kwong et al. en 1999 par diffraction des rayons X [236]. Cette interaction est devenue depuis, une cible thérapeutique importante.

Après l'infection, le virus utilise plusieurs mécanismes pour réguler à la baisse le taux de CD4 à partir de la surface cellulaire. Cela peut rendre les cellules infectées résistantes à la surinfection, faciliter la libération du virus et limiter la réponse normale de la cellule à l'antigène. Au début de l'infection virale, la régulation négative des molécules CD4 à partir de la surface cellulaire est induite par la protéine Nef du VIH-1 [213]. Plus tard dans l'infection, le CD4 nouvellement synthétisé est retenu dans le RE. Ce CD4 retenu dans le RE subit une dégradation par la protéine virale Vpu [237].



Figure 21: Interaction CD4-gp120 [236]. Diagramme en ruban de la gp120 (rouge) se liant à CD4 (jaune).

V.2.2 - Les corécepteurs majeurs

La molécule CD4 seule n'est pas suffisante pour que la fusion et l'entrée virale se produisent ; des molécules Co réceptrices supplémentaires sur la surface cellulaire jouent également un rôle critique dans l'entrée virale. Plusieurs études ont montré que différentes souches de VIH-1 sont capables d'utiliser préférentiellement différents corécepteurs, avec des implications différentes en ce qui concerne le phénotype viral, le tropisme cellulaire, la transmission virale et la

progression de la maladie [238]. De nombreux corécepteurs utilisés par le VIH-1 ont été découverts [239-241]. Cependant, les études les plus approfondies se sont concentrées sur les récepteurs de chimiokine CXCR4 et CCR5.

V.2.2.1 - Le récepteur CCR5

V.2.2.1.1 - Découverte et fonctions biologiques

Les chimiokines sont de petites protéines ayant plusieurs fonctions, notamment la surveillance immunitaire et le recrutement de cellules immunitaires. La première chimiokine a été découverte en 1977 [242] et depuis lors, une grande superfamille de chimiokines a été identifiée.

Les effets de ces protéines sont médiés par leurs récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Les chimiokines sont classées en C, CC, CXC et CX3C en fonction de la structure et du nombre de résidus cystéine. De plus, les récepteurs sont désignés en rajoutant la lettre «R» pour indiquer le récepteur [243].

Les récepteurs de chimiokine sont constitués de sept domaines transmembranaires et de terminaisons amine et carboxyle. Les récepteurs aux chimiokines C-C partagent souvent un degré d'homologie significatif : le «récepteur au chimiokine C-C de type cinq» (en anglais *C-C chemokine receptor 5* ou CCR5) et le «récepteur au chimiokine C-C de type deux» (en anglais *C-C chemokine receptor 2* ou CCR2) partageant une homologie de 75% [244]. Malgré la structure étroite de ces récepteurs, ils se lient à différents ligands et induisent une variété d'effets.

Le CCR5 est exprimé sur diverses populations cellulaires dont les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules T mémoire du système immunitaire; l'endothélium, l'épithélium, le muscle lisse vasculaire et les fibroblastes; et la microglie, les neurones et les astrocytes dans le système nerveux central [245]. Les ligands naturels du CCR5 comprennent MIP1- α (*Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha*) [246], MIP1- β (*Macrophage Inflammatory Protein-1 bêta*), RANTES (*Regulated upon Activation, Normally T-Expressed and Secreted*), et MCP-2 (*Monocyte Chemotactic Protein*) [244, 247-249]. Le récepteur joue un rôle dans la réponse inflammatoire en dirigeant les cellules vers le site d'inflammation. D'autres récepteurs de chimiokine coopèrent avec le CCR5 pour stimuler les fonctions des lymphocytes T [250]. Les récepteurs améliorent la costimulation des lymphocytes T et la libération de cytokines à partir des lymphocytes T CD4⁺. De plus, les ligands du CCR5 augmentent l'activation des

réponses des lymphocytes T et améliorent la production de lymphocytes T spécifiques de l'antigène [251].

En 1996, les chercheurs ont rapporté que le CCR5 est le corécepteur principal pour l'entrée des souches macrophage-tropiques du VIH [252, 253]. Le VIH utilise ce corécepteur CCR5 en particulier lors des étapes initiales de l'infection. Dragic et al. ont démontré que les ligands pour CCR5 inhibaient l'entrée virale et la fusion médiée par l'enveloppe [252].

V.2.2.1.2 - Structure

La protéine CCR5 est constituée de 352 acides aminés avec un poids moléculaire de 40,6 kDa [248]. La protéine contient une extrémité N-terminale, sept domaines transmembranaires (TMD) constitués de résidus hydrophobes, trois boucles extracellulaires (ECL), trois boucles intracellulaires (ICL) et une queue C-terminale. Cette protéine est composée de résidus conservés, de motifs spécifiques de régions hydrophobes et de modifications post-traductionnelles. Ces régions sont importantes pour la liaison au ligand, la réponse fonctionnelle du récepteur et l'activité du corécepteur du VIH (figure 22).

L'extrémité N-terminale est riche en tyrosine et en acides aminés qui jouent un rôle important à la fois dans l'interaction avec le VIH-1 et la liaison aux chimiokines [254-257].

Semblables à d'autres récepteurs de chimiokine, des résidus de cystéine se trouvent dans les trois ECL et l'extrémité N-terminale [258]. La seconde ICL a un motif de séquence conservé, DRYLAVVA [259].

La plupart des RCPG sont caractérisés par un pont disulfure entre la première et la deuxième ECL [260, 261]. Les récepteurs de chimiokine contiennent une liaison disulfure supplémentaire entre l'extrémité N-terminale et la troisième ECL [262]. Ces liaisons disulfure sont importantes pour la liaison au ligand et la conformation stable du récepteur [261].

La queue C-terminale du CCR5 est caractérisée par diverses modifications et résidus, qui affectent l'expression et la fonction du CCR5. En utilisant des protéines de fusion fluorescentes vertes, Blanpain et al. ont démontré que CCR5 est palmitoylé à l'extrémité C-terminale. Les résidus cystéine (positions 321, 323 et 324) servent d'ancre entre l'extrémité C-terminale et la membrane cellulaire [263]. Cela facilite le transport du récepteur vers la surface cellulaire, influence l'interaction entre le récepteur et les voies de signalisation, et est impliqué dans l'endocytose médiée par le récepteur [263-265]. L'élimination de la palmitoylation réduit

l'expression de surface par capture intracellulaire du récepteur dans les organites et son dégradation ultérieure. Cela réduit la quantité du récepteur utilisée par le VIH-1 pour l'entrée dans la cellule cible. La région C-terminale est également enrichie en sérines et thréonines qui fournissent des sites de phosphorylation pour la kinase spécifique GRK (*G protein-coupled Receptor Kinase*) [266].

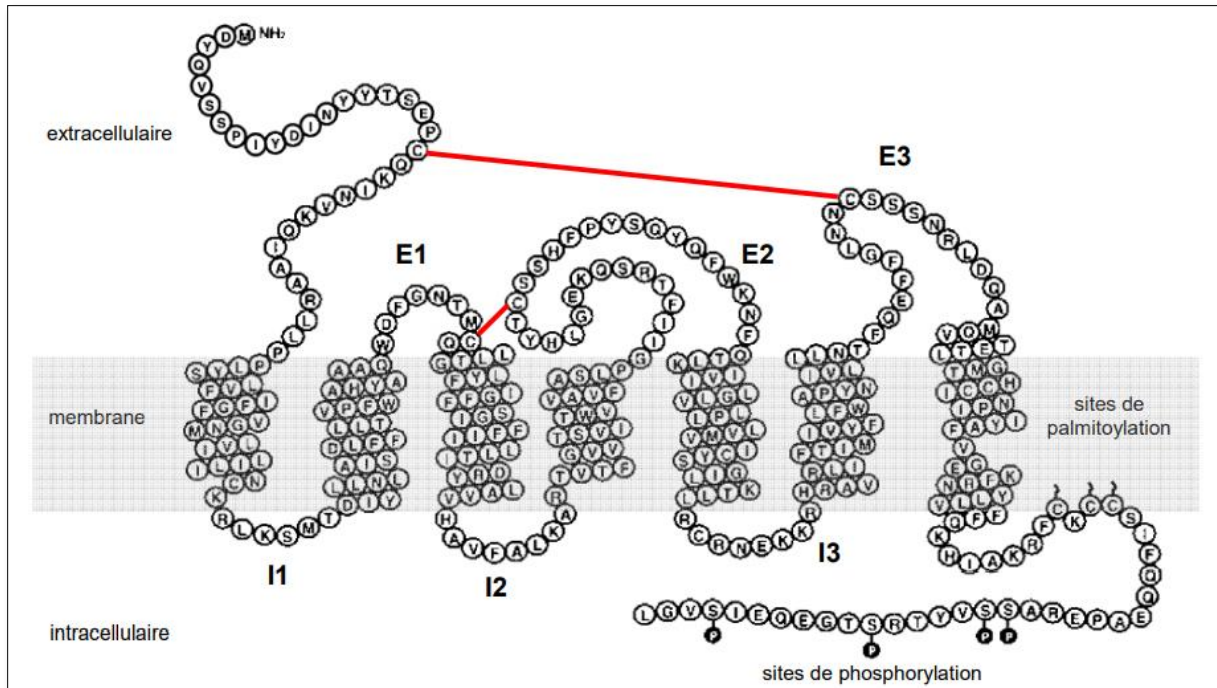


Figure 22 : Structure de la protéine CCR5 [267]

V.2.2.1.3 - L'expression du CCR5 et le VIH-1

L'expression du CCR5 est caractérisée par une grande variabilité interindividuelle [268]. Cela affectait l'infection des lignées cellulaires, des macrophages [269] et des lymphocytes [270] par le VIH-1 (in vitro) [270, 271].

Chez les individus infectés par le VIH-1, le pourcentage de l'expression du CCR5 sur les lymphocytes T CD4⁺ est plus élevé (13,2%) que celui des individus non infectés (6,2%) [272]. La variation des pourcentages de CCR5 chez les individus infectés par le VIH-1 n'était pas corrélée avec le génotype, car trois individus présentant une hétérozygotie pour $\Delta 32^2$, (discuté dans la section I.2.1.1.1), avaient des niveaux d'expression différents (2,7%, 13,1% et 17%). Par ailleurs, il a été rapporté que certains polymorphismes génétiques dans le promoteur du gène

² une mutation du gène *CCR5* connue pour réduire l'infection par le VIH-1

CCR5, responsables d'une expression quantitativement différente du CCR5 à la surface cellulaire, sont significativement corrélés à la progression plus ou moins rapide de l'infection par le VIH-1.

Les chimiokines qui se lient au récepteur CCR5 induisent son endocytose au sein d'endosomes primaires, suivie du recyclage du récepteur à la surface cellulaire. Le fait que la densité membranaire en CCR5 sur les cellules T CD4⁺ soit inversement corrélée à la quantité d'ARN messager du CCL5 présent dans les cellules sanguines mononuclées périphériques [273] est en faveur d'un modèle où la concentration plasmatique des chimiokines liant CCR5 régulerait le niveau d'expression membranaire du CCR5. De même, l'administration d'un antagoniste de CCR5 qui inhibe l'interaction CCR5-chimiokine à des volontaires sains peut également augmenter la densité membranaire en CCR5 à la surface des cellules T CD4⁺ [273]. En l'absence de ligand, il existe un cycle de renouvellement naturel du CCR5 qui a une demi-vie membranaire de quelques heures [274].

L'expression du CCR5 à la surface des cellules T CD4⁺ peut être influencée par différents facteurs. En présence de certaines cytokines (IL-2, IL-15, IFN γ) [275] ou suite à des stimulations antigéniques, la densité en CCR5 augmente [276]. Au contraire, la densité en CCR5 diminue après stimulation via la molécule CD28 [277], en présence d'autres cytokines (IL-4, IL-10, IL-16) [275] ou de progestérone [278]. Il est à noter que la densité membranaire en CCR5 augmente au cours de la primo-infection par le VIH-1, puis reste stable dans le temps, au moins durant la phase asymptomatique de l'infection [279]. En revanche, le pourcentage des cellules T CD4⁺ exprimant le corécepteur CCR5 à leur surface n'est pas stable au cours du temps, aussi bien chez les sujets infectés par le VIH-1 que les sujets non infectés.

V.2.2.2 - Le récepteur CXCR4

V.2.2.2.1 - Découverte

Le CXCR4 est l'un des récepteurs de chimiokine les mieux étudiés, principalement en raison de son rôle de corécepteur pour l'entrée du VIH [280] ainsi que de sa capacité à médier la migration des cellules cancéreuses vers des sites de formation de métastase, et à recruter des effecteurs immunitaires dans les maladies inflammatoires telles que l'asthme et la polyarthrite rhumatoïde [281, 282]. Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs de chimiokine CXC [283, 284]. Historiquement, CXCR4 a été dénommé LESTR (*Leukocyte-derived Seven-Transmembrane domain Receptor*) après son clonage à partir d'une banque d'ADNc de monocytes humains en 1994 [285]. Les noms alternatifs étaient cluster de différenciation 184

(CD184) et fusine, suite à son rôle de cofacteur dans la fusion et l'entrée du VIH-1 [286]. Le terme CXCR4 a été proposé par Oberlin et al. en 1996, qui ont été les premiers à décrire CXCL12 (SDF-1) comme un ligand de ce récepteur [287].

V.2.2.2.2 - Structure

CXCR4 est une protéine de 352 acides aminés (40 KDa), et qui appartient à la famille des RCPGs type rhodopsine. Semblable à d'autres RCPGs, CXCR4 a une extrémité N-terminale extracellulaire de 39 résidus, sept hélices alpha transmembranaires reliées par trois ECL et trois ICL, et une extrémité C-terminale cytoplasmique de 45 résidus (figure 23). Cependant, l'analyse de la structure cristalline de CXCR4 en complexe avec l'antagoniste IT1t et l'antagoniste peptidique cyclique CVX15 en 2010 a révélé des différences spécifiques dans l'orientation des hélices alpha par rapport aux autres structures disponibles des RCPGs, principalement du côté extracellulaire [288]. Une différence importante repose sur l'extension de l'extrémité extracellulaire de l'hélice VII, qui est plus longue de deux tours hélicoïdaux que dans les autres structures RCPGs permettant une liaison disulfure entre Cys274 dans l'hélice VII avec Cys28 dans la région N-terminale. Cette liaison disulfure est essentielle pour l'interaction avec le ligand CXCL12 [288]. Certaines différences sont aussi notées dans le domaine intracellulaire : la partie intracellulaire de l'hélice VII de CXCR4 est plus courte par rapport aux autres structures disponibles des RCPGs. En outre, la structure cristalline du CXCR4 est dépourvu de l'hélice alpha VIII présente dans de nombreux RCPGs, ainsi que du site de palmitoylation à son extrémité C-terminale [288].

Les études de cristallisation ont révélé que CXCR4 existe en tant qu'homodimère, mais laissé ouverte la possibilité de liaison de CXCL12 / CXCR4 dans une stœchiométrie ligand : récepteur 1 : 1 ou 1 : 2 [288]. Une combinaison de méthodes informatiques, fonctionnelles et biophysiques a soutenu la stœchiométrie de liaison 1: 1 par rapport à 1: 2 [289]. En plus de l'homodimérisation, CXCR4 peut également former des dimères avec ACKR3 (CXCR7) et d'autres récepteurs tels que le TCR [290, 291].

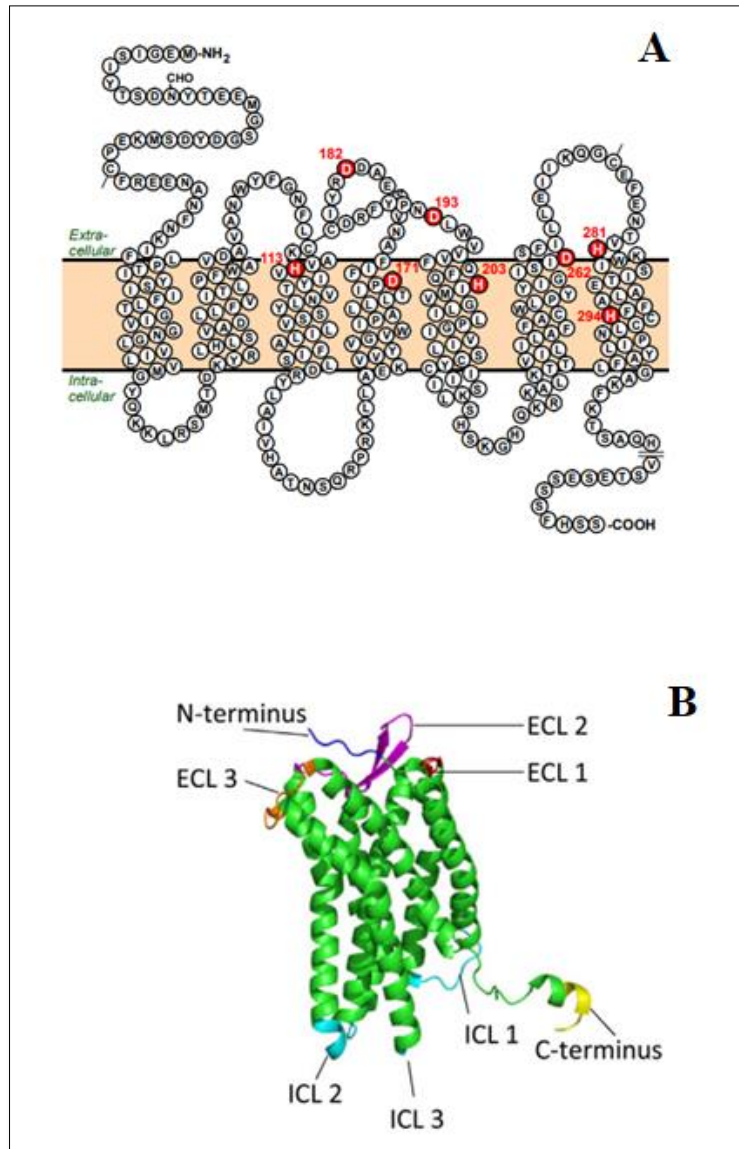


Figure 23: Structure de la protéine CXCR4 [292]. (A) Représentation schématique montrant la séquence d'acides aminés : en rouge figurent les acides aminés impliqués dans l'inhibition de CXCR4 par un analogue structural de SDF-1 : ces acides aminés interviendraient donc dans la liaison et l'activation de CXCR4 par SDF-1. (B) Structure cristalline du CXCR4 [288]

V.2.2.2.3 - Expression

Contrairement à la plupart des autres récepteurs de chimiokines, CXCR4 dispose d'un très vaste domaine d'expressions tissulaires et se retrouve non seulement sur tous les types leucocytaires (plaquettes incluses) mais également sur des cellules épithéliales, endothéliales et neuronales. Ontogénétiquement, ce récepteur est exprimé très tôt durant le développement embryonnaire, d'ailleurs le rôle qu'il exerce dans la migration de précurseurs pendant l'embryogenèse a été démontré. L'ablation du gène de CXCR4 dans des modèles murins mène à la mort périnatale

des souris suite à de multiples défauts d'organogenèse au niveau cérébral, cardiaque, vasculaire et immunitaire [293, 294].

Régulation de l'expression et de la fonction de CXCR4 :

- ***Contrôle transcriptionnel de CXCR4 :***

Afin de comprendre le rôle de CXCR4 dans la maladie, une compréhension fondamentale des facteurs régulant l'expression est essentielle. La région promotrice de CXCR4 contient un certain nombre de séquences consensus régulatrices prédites [284, 295, 296], cependant, la transcription basale est principalement contrôlée par les actions opposées de deux régulateurs transcriptionnels. Il a été démontré que le facteur respiratoire nucléaire-1 (NRF-1) est le principal facteur de transcription régulant positivement la transcription de CXCR4 [295, 296], bien qu'un rôle potentiel d'un facteur de transcription supplémentaire, SP-1, a également été suggéré [296]. Par ailleurs, une étude a révélé que la régulation négative peut se faire par le biais de YY1 (Ying Yang 1) [297].

En plus de la régulation basale de la transcription de CXCR4, il a également été démontré qu'un certain nombre de molécules de signalisation affectent la transcription de CXCR4. Par exemple, l'expression de CXCR4 peut être augmentée par des seconds messagers intracellulaires tels que le calcium [295] et l'AMP cyclique [298], ou par certaines cytokines comme l'IL-2 [295], l'IL-7 [299], l'IL-10 [300], l'IL-15 [299], le TGF- β [300], et également par des facteurs de croissance tels que le facteur de croissance basique des fibroblastes (β FGF) [301, 302], le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) [302], et le facteur de croissance épidermique (EGF) [303]. D'autre part, des cytokines inflammatoires telles que le TNF- α [301, 304], l'interféron- γ (INF- γ) [305] et l'IL-1 β [305] ont toutes été associées avec la diminution de l'expression de CXCR4.

Les facteurs qui régulent l'expression de CXCR4 et affectent la progression de la maladie présentent un intérêt supplémentaire. Des altérations de l'activité de NRF-1 ou de YY1 peuvent conduire à une augmentation ou une diminution de la transcription de CXCR4, respectivement, dont certains virus semblent avoir profité. La protéine Tax transactivatrice du virus T lymphotrope de type I humain (HTLV-1) favorise l'activité de NRF-1, ce qui peut être associé avec une augmentation de la susceptibilité au VIH-1, ainsi qu'avec la progression de la maladie chez les individus infectés [306]. En revanche, l'expression de surface cellulaire de CXCR4 est diminuée chez les individus infectés par l'herpès virus humain type 6 (HHV-6) [307].

- **Régulation de l'expression de la protéine CXCR4 :**

Un certain nombre de modifications post-traductionnelles contribuent à l'expression et à la fonction de CXCR4. Dans le domaine extracellulaire de CXCR4, il existe deux sites potentiels de glycosylation, Asn11 et Asn176 [308]. La mutation de Asn11 en glutamine ou en leucine modifie la fixation de CXCL12 sur CXCR4 et diminue les signaux de transduction habituellement induits [309, 310]. Ainsi, la glycosylation de CXCR4 est importante pour la liaison du SDF et aide à inhiber l'utilisation de CXCR4 en tant que corécepteur du VIH-1. Il a également été démontré que CXCR4 subit une sulfatation de la tyrosine, une modification catalysée par une tyrosylprotéine sulfotransférase au sein du réseau trans-golgi. Il existe trois tyrosines extracellulaires dans CXCR4 qui sont modifiées par sulfatation, Tyr7, Tyr12 et Tyr21 qui est la plus touchée par ce processus [311]. Farzan et al. ont démontré que la sulfatation des tyrosines de CXCR4 ne régule pas la fonction du corécepteur du VIH-1 [311], mais elle peut induire une modification de la fixation du ligand à son récepteur. Cela a été également observé avec CCR2b [312], CCR5 [313] et CX3CR1 [314]. En effet, la base structurale de l'interaction sulfotyrosine/SDF révèle que la sulfotyrosine 21 se lie à un site spécifique sur SDF1 qui comprend Arg47 [315].

V.2.2.2.4 - La chimiokine SDF1

V.2.2.2.4.1 - Structure

La chimiokine SDF1 ou facteur-1 dérivé des cellules stromales, est le ligand le plus connu de CXCR4, c'est-à-dire le ligand « cognat » de CXCR4. Cette protéine est hautement conservée entre la souris et l'homme : > 95% d'homologie de séquence [316]. Six isoformes de SDF1 humain ont été définies (SDF1 α à SDF1 ϕ) : SDF1- α et SDF1- β représentant les isoformes majeures « classiques », et SDF1- γ , SDF1- δ , SDF1- ϵ et SDF1- ϕ étant moins caractérisés.

La pro-protéine SDF1- α est une protéine de 89 aa, tandis que les autres isoformes ont des extensions à l'extrémité C-terminale avec 4 aa supplémentaires pour SDF1- β , 20 aa pour SDF1- γ , 51 aa pour SDF1- δ , 1 aa pour SDF1- ϵ , et 11 aa pour SDF1- ϕ [317].

La structure de la protéine SDF1 mature est caractérisée par un feuillet de 3 brins β et une hélice α (figure 24), structure commune des chimiokines. L'extrémité N-terminale de SDF1 mature, en particulier les deux premiers résidus Lys-1 et Pro-2 est essentielle pour l'activation de CXCR4. La perte de ces deux premiers résidus a complètement aboli l'activation de CXCR4, tandis que l'affinité de liaison de CXCR4 a été diminuée de 10 fois [318]. Le rapport de Crump

et al. [318] et des études ultérieures appuient l'idée d'un modèle de liaison des chimiokines à leurs récepteurs, dit «à deux sites» [319].

Le « Site 1 » est constitué du domaine central de la chimiokine et est responsable de la liaison de la chimiokine à son récepteur. Dans SDF1, le domaine central le plus important pour la liaison de CXCR4 est le soi-disant motif RFFESH (résidus 12 à 17 dans SDF1 mature). Le «Site 2» comprend l'extrémité N-terminale de SDF1, plus précisément Lys-1 et Pro-2, qui activent la voie de signalisation du CXCR4 [318]. Les extrémités C-terminales dans les différentes isoformes de SDF1 ne sont impliquées dans aucun de ces sites d'interaction avec le CXCR4. Le modèle «à deux sites» a longtemps été proposé comme mécanisme fonctionnel général des chimiokines [319, 320]. Une contribution importante à la liaison de SDF1 à son récepteur s'est avérée se produire par la sulfatation post-traductionnelle des résidus de tyrosine dans l'extrémité N-terminale du CXCR4 (Tyr-21, Tyr-12, Tyr-7). Cela augmente l'affinité de liaison de CXCR4 pour SDF1 par le biais d'interactions électrostatiques entre les résidus tyrosines sulfatés dans CXCR4 et les résidus basiques dans SDF1 [321, 322].

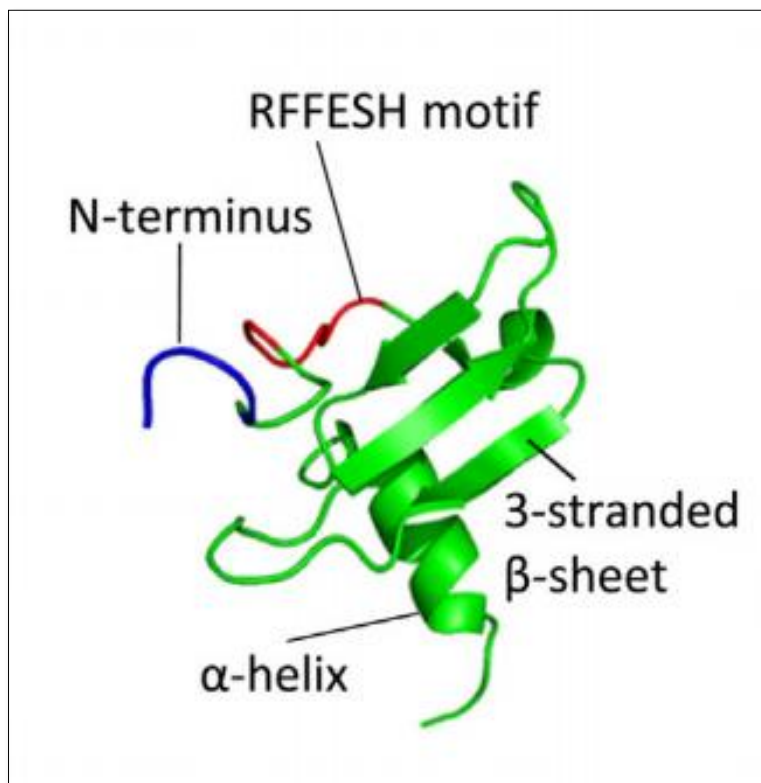


Figure 24: Structure cristalline de l'isoforme SDF1 α [323]. Le monomère du SDF1 est représenté avec le domaine N-terminal (aa 4–7 en bleu). Le motif RFFESH (aa 12–17), qui est le motif de liaison le plus important pour CXCR4, est représenté en rouge.

V.2.2.2.4.2 - Expression et régulation de l'activité du SDF1

La SDF1 étant une chimiokine cruciale dans de nombreux processus homéostatiques, tels que la neurogenèse, l'embryogenèse, l'angiogenèse et la lymphopoïèse, et joue un rôle dans les processus inflammatoires, son activité est étroitement contrôlée. L'activité du SDF1 est régulée à de nombreux niveaux : la transcription, l'épissage de l'ARNm, les modifications post-traductionnelles, et la disponibilité et la coopérativité de la protéine.

Transcription contrôlée des variants d'épissage :

SDF1 est une chimiokine importante dans l'homéostasie et donc produite en continu par différents types de cellules. De plus, des conditions telles que l'hypoxie et l'arrêt de la croissance peuvent induire une expression accrue de SDF1 [324]. Par exemple, une production accrue de SDF1 est nécessaire pour augmenter l'angiogenèse et aide à la cicatrisation des tissus et à la réparation des plaies. Dans ces situations, le facteur induit par l'hypoxie-1 (HIF-1 pour *Hypoxia Inducible Factor-1*) augmente la production de SDF1 par les cellules endothéliales, ce qui entraîne une attraction accrue des cellules progénitrices [325, 326]. Une régulation à la hausse de SDF1 par l'hypoxie se produit également pendant le développement du cancer pour favoriser l'angiogenèse, comme cela a été démontré pour le cancer de l'ovaire [327]. L'hypoxie induit également l'expression des récepteurs du SDF1, par exemple, CXCR4 sur les cellules endothéliales et de mélanome et ACKR3 sur les cellules de gliome [328-330]. Par exemple, le préconditionnement des cellules souches mésenchymateuses avec hypoxie avant la greffe augmente l'expression de CXCR4 et ACKR3 via HIF-1 et entraîne une augmentation de la migration, de l'adhésion et de la survie de ces cellules [331]. D'un autre côté, l'expression de SDF1 peut également être régulée à la baisse dans les cellules souches mésenchymateuses associées à la tumeur par interaction de ces cellules avec le TGF- β , un événement qui favorise la métastase lors du cancer du sein [332]. Comme mentionné précédemment, SDF1 existe en six variants d'épissage différents chez l'homme (CXCL12 α à ϕ). Ces variants d'épissage sont codés par le même gène *SDF1* et partagent les trois premiers exons. L'importance de ces variants d'épissage est démontrée par leurs différentes activités dans divers processus. Par exemple, SDF1 α , SDF1 β et SDF1 ϵ sont capables d'augmenter le taux de survie des cellules progénitrices hématopoïétiques in vitro, contrairement aux autres isoformes. Toutes les variants de SDF1 présentent une activité anti-VIH-1 mais avec des puissances variables, SDF1 γ étant la plus puissante [333]. Cette isoforme est, en revanche, plutôt faible pour induire un chimiotactisme in vitro par rapport à la forme SDF1 α la plus étudiée [334, 335]. En revanche,

SDF1 γ est la variante la plus active concernant la chimiotaxie in vivo, probablement en raison de la résistance accrue de cette isoforme à l'inactivation enzymatique [336]. En général, SDF1 α et dans une moindre mesure SDF1 β sont les plus abondants dans les tissus adultes et sont les seuls variants détectés dans la moelle osseuse. SDF1 γ est principalement présent dans le cœur, tandis que SDF1 δ , SDF1 ϵ et SDF1 ϕ sont abondamment exprimés dans le pancréas.

Fait remarquable : un changement dans l'expression des isoformes du SDF1 se produit des tissus fœtaux aux tissus adultes. SDF1 γ , par exemple, n'est pas exprimé dans les tissus fœtaux [317]. La distribution tissulaire différente des variants d'épissage du SDF1 suggère un épissage régulé d'ARNm ou une stabilité régulée de l'ARNm épissé. Il a été découvert que le micro-ARN miR-141 peut contrôler la stabilité de l'ARNm de SDF1 β [337].

Disponibilité et coopération de la protéine CXCL12 :

Un contrôle supplémentaire est exercé au niveau de la protéine. SDF1 peut être éliminé de l'environnement par l'activité de ses récepteurs CXCR4 et ACKR3.

CXCR4 n'est internalisé qu'après stimulation avec SDF1 et ensuite dégradé, conduisant à une régulation à la baisse de l'expression de CXCR4 sur la membrane cellulaire. Cependant, l'internalisation d'ACKR3 après l'activation de SDF1 ne conduit pas à sa dégradation. De plus, ACKR3 a une affinité de liaison plus élevée pour SDF1 que pour CXCR4 [338, 339]. De cette manière, ACKR3 participe activement au maintien des gradients SDF1, ce qui est d'une importance critique pour la migration des cellules cibles. Cela a été démontré par la perte de polarité et la migration directionnelle des cellules germinales primordiales chez les mutants de poisson zèbre surexprimant uniformément SDF1 [340]. Des concentrations élevées de SDF1 réduisent la présence de CXCR4 sur la membrane cellulaire cible et par conséquent entravent la migration directionnelle continue. Luker et ses collègues ont émis l'hypothèse que ACKR3 favorise la croissance tumorale et les métastases en éliminant SDF1 du microenvironnement tumoral : les cellules cancéreuses CXCR4+ restent sensibles au SDF1 et peuvent s'échapper de la tumeur primaire et former des métastases dans d'autres organes qui expriment le SDF1 [341]. L'activité d'ACKR3 est également importante lors de l'apparition de la sclérose en plaques. Il a été démontré que l'élimination de SDF1 du côté basolatéral de la barrière hémato-encéphalique par ACKR3 entraîne un changement de polarité membranaire et une infiltration de cellules mononucléées dans le système nerveux central [342]. En plus de la régulation de sa disponibilité, le pouvoir chimiotactique de SDF1 est affiné grâce à la coopération avec d'autres

chimiokines. La synergie entre les chimiokines est un phénomène intéressant qui se produit lorsque l'effet stimulant de deux chimiokines sur le même type cellulaire est supérieur à l'effet de stimulation de chaque ligand séparément. SDF1 peut donc renforcer l'effet d'autres chimiokines. Par exemple, SDF1, agit en synergie avec CXCL8, qui est une protéine de recrutement de neutrophiles pour augmenter la migration des ces dernières. SDF1 agit également en synergie avec les ligands CXCR3 CXCL9, CXCL10 et CXCL11 et plusieurs membres de la famille des chimiokines CC pour attirer de nombreux autres types de cellules, tels que les cellules B et T, les cellules dendritiques, les monocytes et les cellules progénitrices CD34 + [343, 344]. En outre, SDF1 peut former des hétérodimères avec la protéine HMGB1 (*High-Mobility Group Box 1*) pour attirer les monocytes vers les sites de lésion d'une manière dépendante de CXCR4 [345].

V.2.2.2.4.3 - Fonctions biologiques de l'axe SDF1 / CXCR4

L'axe SDF1/CXCR4 joue un rôle important dans l'homing des cellules souches /progénitrices hématopoïétiques (HSPC) à la moelle osseuse, et leur mobilisation vers la circulation périphérique en cas de blessure par exemple. L'homing des HSPC est médié par la sécrétion de SDF1 par les cellules endothéliales dans les sinusoides de la moelle osseuse ainsi que par les cellules stromales de la moelle osseuse. L'adhésion des HSPC positive pour CXCR4 à l'endothélium des sinusoides de la moelle osseuse est déclenchée par l'activation de l'intégrine induite par l'axe SDF1 / CXCR4 [346]. Ensuite, les HSPG migrent dans des « niches » spécialisées au niveau de la moelle osseuse. L'axe SDF1 / CXCR4 est également impliqué dans la survie et la prolifération des cellules progénitrices [347, 348].

Il a été rapporté que la signalisation SDF-1 / CXCR4 régule l'homéostasie des neutrophiles positives pour CXCR4 et médie leur retour « homing » à la moelle osseuse par l'expression constitutive de SDF1 par les cellules stromales de la moelle osseuse [349]. Puisque CXCR4 est crucial dans l'homéostasie des cellules souches, il n'est pas surprenant qu'il ait des fonctions essentielles dans le développement embryonnaire. Le SDF1 / CXCR4 joue également un rôle important dans l'angiogenèse dans le contexte de l'ischémie. Dans un modèle murin d'ischémie myocardique, la SDF1 a conduit à une augmentation des taux du VEGF et à une néo-angiogenèse améliorée, associée à une réduction de la taille de l'infarctus après un infarctus du myocarde [350]. De plus, la transplantation de cellules progénitrices endothéliales surexprimant SDF1 au cours d'un infarctus du myocarde chez le rat pourrait favoriser la néo-angiogenèse [351]. Dans le préconditionnement ischémique, qui exerce des effets cardioprotecteurs, les taux

d'ARNm de CXCR4 ont été augmentés dans les cardiomyocytes et les fibroblastes, suggérant également un effet protecteur de l'axe SDF1 / CXCR4. En effet, l'administration in vivo de SDF1 conduit à une diminution de la taille de l'infarctus du myocarde. Suite à son rôle dans l'angiogenèse, la chimiotaxie [352, 353] et la prolifération cellulaire [352], l'axe SDF1 / CXCR4 a également été liée à différentes pathologies, y compris la progression tumorale et les métastases.

V.2.2.2.4.4 - SDF1 et l'infection par le VIH-1

Après l'identification de la chimiokine SDF1 comme ligand naturel du CXCR4, les chercheurs ont démontré que cette chimiokine pourrait bloquer l'infection des cellules T par les souches X4 du VIH-1 qui utilisent le CXCR4 (LESTR / fusine) comme corécepteur [287, 354]. Cependant, le SDF1 ne parvient pas à prévenir l'infection des lymphocytes T activés par les souches utilisant le corécepteur CCR5 (souches R5) [287, 354].

Les travaux de Bleul et al. ont démontré que seul SDF1 comprenant un domaine N-terminal intact agissait comme facteur suppresseur de l'infection par les souches X4, indiquant que le domaine N-terminal de la protéine SDF-1 était nécessaire à la fois pour l'activation de CXCR4 et l'inhibition de ces souches [354]. Cette expérience a suggéré que le SDF1 pourrait inhiber l'infection par le VIH-1 par une entrave stérique entre la gp120 virale et le CXCR4. Arenzana-Seisdedos et al. ont démontré que le SDF1 bloquait l'infection par les souches X4 à un stade précoce sans affecter le reste du cycle de vie du VIH-1 en mettant en place deux expériences complémentaires [287]. Premièrement, ils ont démontré que le SDF1 a puissamment empêché l'accumulation d'ADN proviral du VIH-1 produit par une rétrotranscription de l'ARN viral génomique, un processus obligatoire pour une infection productive. Deuxièmement, en utilisant des particules de VIH-1 dont la glycoprotéine d'enveloppe a été remplacée par celle du virus de la stomatite vésiculaire (VSV), qui permet l'infection d'une manière indépendante des CD4 et des corécepteurs, ils ont prouvé que le SDF1 n'a pas réussi à inhiber la réplication virale (survenant après l'entrée virale).

De toute évidence, la chimiokine SDF1 est une excellente nouvelle cible pour le développement de nouveaux inhibiteurs de l'infection par les souches X4 [355]. L'activité anti-VIH-1 de SDF1 impliquait de manière critique la diminution de l'expression de CXCR4 à la surface cellulaire, un phénomène médié par la région intracellulaire C-terminale de CXCR4 de manière indépendante de la protéine G [356].

L'affinité de SDF1 pour CXCR4 est bien corrélée avec son activité inhibitrice du VIH-1 et sa capacité à induire l'internalisation de CXCR4. Cette propriété pourrait expliquer la régulation à la baisse de CXCR4 sur les lymphocytes au niveau des tissus intestinaux en réponse au SDF1 local produit de manière constitutive par l'épithélium intestinal [357]. Les épithéliums muqueux sont un site de réplication proéminente du VIH-1 et le SDF1 local pourrait en partie expliquer la prédominance observée des variants du VIH-1 à tropisme R5, qui ne sont pas affectés par SDF1.

V.2.3 - Les corécepteurs alternatifs

En plus des CCR5 et CXCR4, les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 (Env) peuvent engager une variété de corécepteurs alternatifs tels que CCR1, CCR2, CCR3, CCR8, CX3CR1, CXCR6 (STRL33), FPRL1, GPR1, GPR15, APJ, et D6 pour l'entrée dans les cellules transfectées [358-366]. Alors que les corécepteurs alternatifs ne semblent pas jouer un rôle important dans la médiation de l'entrée du VIH-1 dans les cellules primaires, un rapport a décrit une infection aiguë par le VIH-1 avec un variant incapable d'utiliser CCR5 ou CXCR4, et qui a utilisé uniquement GPR15 [367]. Ce résultat suggère un rôle potentiel plus important pour les corécepteurs alternatifs que ce qui est actuellement reconnu. Il a également été démontré que les polymorphismes génétiques de certains corécepteurs alternatifs sont associés à la progression de la maladie.

V.2.3.1 - Le récepteur CCR2

V.2.3.1.1 - Découverte et Structure

En 1994, Charo et al. ont découvert deux récepteurs spécifiques de la protéine chimioattractrice des monocytes de type 1 (MCP) -1 (appelée CCL2 dans la nomenclature systématique) sur la lignée monocyttaire humaine, et les ont nommé CCR2A et CCR2B [368, 369]. Quelques années plus-tard, il a été découvert que le CCR2 sert de corécepteur par une minorité de souches du VIH [239, 370].

Le CCR2 est l'un des 19 récepteurs des chimiokines fonctionnels répertoriés appartenant à la classe A des RCPG. Cette protéine se compose de sept domaines transmembranaires hydrophobes liés par trois boucles intracellulaires et trois extracellulaires, une extrémité N-terminale extracellulaire et une queue cytoplasmique (figure 25). La région extracellulaire N-terminale est la partie la plus importante responsable d'une liaison de haute affinité avec les ligands. Les trois autres régions extracellulaires sont également importantes pour déclencher d'autres réactions intracellulaires.

La différence entre CCR2A (374 acides aminés) et CCR2B (360 acides aminés) réside principalement dans le C-terminal de CCR2, qui est important pour le trafic des récepteurs vers la membrane cellulaire [369]. La queue C-terminale de CCR2A peut provoquer la rétention du récepteur CCR2 dans le cytoplasme [371]. Cette extrémité contient également des résidus sérine et thréonine sensibles à la phosphorylation. La phosphorylation de ces sites par la kinase GRK est importante pour l'internalisation et la désensibilisation du récepteur.

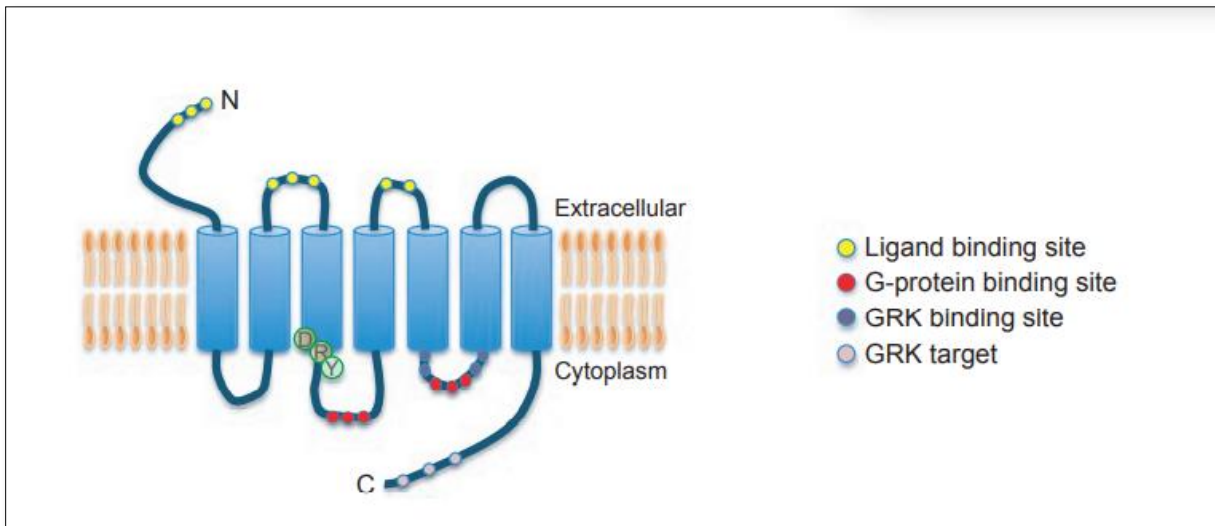


Figure 25: Structures de la protéine CCR2 [372]. Le motif DRY (Asp – Arg – Tyr), situé dans la région juxtamembranaire de la deuxième boucle intracellulaire est important pour la transduction du signal médiée par la protéine G

V.2.3.1.2 - Expression

Comme mentionné ci-dessus, il existe deux formes de CCR2 activant différentes voies de signalisation : CCR2A et CCR2B. La forme dominante est CCR2B, qui représente environ 90% de l'expression de CCR2 à la surface cellulaire [369, 371]. L'ARNm du CCR2A et CCR2B est détectable dans les monocytes, les cellules dendritiques, les cellules NK et les lymphocytes T, mais pas dans les neutrophiles ou les éosinophiles au repos [243]. De plus, l'ARNm de CCR2 a été détecté dans des cellules endothéliales (dans des conditions d'inflammation) [373] et dans des fibroblastes pulmonaires [373]. Par ailleurs, il a été rapporté que l'expression de la protéine CCR2 est plus restreinte que celle de l'ARNm.

L'expression du CCR2 à la surface cellulaire est régulée d'une manière stricte. À titre d'exemple, l'ARNm de CCR2 est régulé à la hausse par une stimulation avec l'IL-2 dans les monocytes [374], les cellules NK [375], et les cellules T [376]. L'IL-15, régule également à la hausse l'ARNm de CCR2 dans les lymphocytes T [377]. Les lipoprotéines de basse densité et le cholestérol libre induisent l'expression de la protéine CCR2 à la surface des monocytes [378].

L'IL-4 régule à la hausse l'expression de la protéine CCR2 dans des fibroblastes pulmonaires en culture *in vitro* [373]. Cependant, comme indiqué ci-dessus, l'ARNm de CCR2 n'est invariablement pas traduit en protéine. L'expression de CCR2 à la surface des monocytes et l'abondance de l'ARNm sont régulées à la baisse suite à une stimulation avec le lipopolysaccharide, sans affecter la transcription nucléaire mais avec une réduction de la demi-vie de l'ARNm [379] dans les monocytes / macrophages [380] et les cellules NK [374]. L'antioxydant Pyrrolidine Dithiocarbamate inhibe également l'expression de l'ARNm de CCR2 dans les monocytes humains en diminuant la stabilité du transcrit [381] alors que le Facteur de Nécrose Tumorale α régule à la baisse et l'ARNm du CCR2 et l'expression de la protéine à la surface des monocytes humains [382].

V.2.3.1.3 - Ligands associés et fonctions

Le ligand principal de CCR2 est CCL2 (MCP-1). D'autres chimiokines, telles que MCP-2 (CCL8) [383], MCP-3 (CCL7) [384], MCP-4 (CCL13) [385], HCC-4 (CCL16) [386], peuvent également se lier au CCR2.

Le CCR2 et ses ligands sont impliqués dans de nombreuses maladies inflammatoires et neurodégénératives [387], notamment l'athérosclérose, la sclérose en plaques, l'asthme, la douleur neuropathique et la néphropathie diabétique, ainsi que le cancer [388]. Cela a motivé les chercheurs pour mener des études précliniques et essais cliniques pour rechercher des thérapies ciblant l'axe chimiokine/CCR2 [389].

La liaison du CCL2 à son récepteur CCR2 sur les monocytes et les macrophages permet le recrutement et le trafic des monocytes Ly6Chigh au cours d'une infection ou une lésion inflammatoire [390]. Le CCR2 interagit également avec la β -défensine 6 [391]. En outre, le CCR2 régule l'expression des cytokines inflammatoires des cellules T et la différenciation des cellules T, en cellules T auxiliaires 17 (Th17) pendant l'inflammation [392]. De plus, il joue un rôle régulateur important dans l'exportation thymique [393].

Il a été également rapporté que le CCR2 Joue un rôle important dans la médiation de la douleur neuropathique après une lésion nerveuse périphérique, via la régulation de la fonction du récepteur NMDA (N-Methyl-D-Aspartic acid) médiée par la sous-unité NR2B dans les neurones contenant les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 [394].

V.2.3.1.4 - L'AXE CCL2 / CCR2 et l'infection par le VIH-1

CCL2, comme d'autres chimiokines inflammatoires, est rapidement exprimée après l'infection pour initier la migration et l'activation des leucocytes. Une régulation précise de l'expression des chimiokines, de l'interaction des récepteurs et des réponses cellulaires ultérieures est cruciale pour optimiser la protection et minimiser les effets délétères de la croissance microbienne incontrôlée et de l'invasion. Cependant, dans le contexte de l'infection par le VIH, cette chimiokine semble être plus délétère que protectrice. Ceci est principalement dû à son rôle dans le recrutement des leucocytes, contribuant ainsi à de nouvelles cibles d'infection dans un environnement favorable à la réplication virale. En outre, CCL2 pourrait également avoir des effets directs sur la réplication virale, au moins dans certains types de cellules.

Un certain nombre d'études ont rapporté une régulation à la hausse des niveaux des transcrits CCL2 dans les cellules infectées par le VIH. En particulier, une augmentation de l'ARNm de CCL2 a été décrite dans les Macrophages dérivés de Monocytes (MDM) et les PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) infectés in vitro avec différentes souches de VIH-1, à divers moments post-infection [395, 396], ainsi que dans les astrocytes et l'épithélium pigmentaire rétinien humain (en anglais *Human Retinal Pigment Epithelium* ou HRPE) après l'exposition au virus [397, 398].

La régulation à la hausse des transcrits CCL2 a également été trouvée in vivo, chez des individus infectés par le VIH [399-403]. Fait intéressant, dans certaines de ces études, la régulation à la hausse des transcrits CCL2 était en corrélation avec une charge virale élevée et un faible nombre de lymphocytes T CD4+. En plus de la régulation positive du gène *CCL2*, plusieurs études in vitro ont révélé des niveaux accrus de la protéine CCL2 dans les cellules exposées au VIH. En particulier, l'effet de l'infection par le VIH-1 sur l'expression de CCL2 a été étudié dans différents types de cellules, principalement les macrophages, les PBMC et les muqueuses [395, 396, 404-406]. Dans certaines études, une amélioration de l'expression de CCL2 était liée à des effets biologiques. En effet, l'infection des MDM par le VIH-1 a entraîné une augmentation de la sécrétion de CCL2 à divers moments après l'infection, et la neutralisation de cette chimiokine a inhibé la réplication virale [404]. Le même effet a également été rapporté dans les explants de tissu exocervical [406]. De plus, une expression accrue de CCR2 dans les PBMC était liée à la transmigration des leucocytes [407]. La régulation à la hausse de CCR2 a également été décrite dans les astrocytes [408], tandis que la modulation des niveaux de CCL2 a été rapportée dans les cellules étoilées hépatiques et les tissus urétraux [409, 410]. En plus de l'infection elle-

même, des protéines dérivées de virus telles que gp120 [396, 398, 411-413], Nef [414], protéine de matrice p17 [415] et la protéine transactivatrice Tat [395, 416-422] se sont révélées induire l'expression et la libération de CCL2 dans différents types de cellules. L'effet de l'exposition à la gp120 sur l'expression de CCL2 a été principalement étudié dans les macrophages. Dans ces cellules, l'exposition à la gp120 a entraîné une forte augmentation de la sécrétion de CCL2 qui était indépendante de l'interaction de la glycoprotéine virale avec le récepteur CD4 [423]. L'effet de Tat a été principalement étudié dans les cellules du système nerveux, en particulier les astrocytes, la microglie et les cellules endothéliales. Fait intéressant, l'expression améliorée de CCL2 provoquée par une exposition des cellules aux protéines du VIH-1 est corrélée avec la transmigration des monocytes et les cellules microgliales [413, 414, 419, 424].

En outre, plusieurs études *in vivo* ont révélé des niveaux accrus de la protéine CCL2 dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le sang d'individus infectés par le VH-1 [417, 425-429]. Des taux élevés de CCL2 dans le LCR des patients se sont avérés corrélés à un large éventail de complications neurologiques liées au VIH [425-427, 430-432], alors que l'augmentation de la concentration de cette chimiokine dans le sang et les lavages cervico-vaginaux était associée à des charges virales élevées [429, 433-435]. L'expression accrue de CCL2 et / ou CCR2 après l'infection par le VIH-1 peut être liée aux différentes complications.

Les mécanismes connus sous-tendant les effets de l'axe CCL2 / CCR2 dans les comorbidités associées au VIH-1 sont principalement liés au niveau élevé d'activation immunitaire et le maintien de l'état inflammatoire qui caractérise l'infection par le VIH, même chez les patients sous traitement antirétroviral.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que CCL2 peut représenter un facteur clé favorisant la propagation du VIH-1, en particulier dans les emplacements anatomiques où l'infection des macrophages joue un rôle prédominant. Les mécanismes sous-jacents de l'effet de CCL2 sur la réplication virale semblent dépendre du type de cellule. En particulier, Campbell et Spector ont rapporté que l'exposition des cellules T CD4 + au repos au CCL2 entraînait une régulation à la hausse, (dépendante de CCR2), de l'expression de CXCR4. Cela a augmenté la capacité de ces cellules à être attirées par la gp120 et les a rendu plus permissives à l'infection par les souches X4 du VIH-1 [436]. Ces résultats suggèrent que CCL2 a la capacité de rendre une grande population de lymphocytes plus susceptible au VIH-1 au cours de l'infection surtout aux stades avancés de la maladie lorsque les souches X4 sont présentes.

V.3 - Tropisme viral

Le tropisme du VIH-1 définit l'ensemble des cellules dites « cibles », cellules sensibles et permissives à l'infection par ce virus. L'étude du tropisme viral permet surtout d'avoir une idée claire sur la symptomatologie clinique et sa physiopathologie, et de connaître les voies d'entrée et d'excrétion virales.

V.3.1 - Classification et nomenclature

Les études menées, quelques années après la découverte du VIH, pour classer les isolats du VIH-1 par tropisme étaient basés sur la capacité des variants à induire la formation de syncytia dans les lignées de cellules T [437]. Ces études ont permis de classer les souches de VIH en virus ayant un phénotype inducteur de syncytia (Syncytium Inducing ou SI) ou non inducteur de syncytia (Non Syncytium Inducing ou NSI) [438].

Les variants SI infectent préférentiellement les lignées lymphocytaires T (T-tropiques) et émergent aux stades tardifs de l'infection et sont associés à la progression vers le stade SIDA [439].

Les souches NSI, infectant principalement les macrophages primaires (M-tropiques), sont présentes lors de la phase précoce de l'infection et à tous les stades de la maladie.

Il existe également des souches de VIH-1 dites « Dual-tropiques », infectant à la fois les macrophages primaires et les lignées de cellules T, et sont donc une population virale mixte de phénotypes NSI / SI.

La découverte ultérieure des corécepteurs CCR5 et CXCR4 du VIH-1 a permis l'élaboration, d'une nomenclature précisant le tropisme viral (figure 26) :

- Les souches dites « R5 » : des variants M-tropiques (ou NSI) utilisant principalement le corécepteur CCR5. Ces souches prédominantes pendant la phase asymptomatique de l'infection, sont responsables de la transmission virale d'une personne à l'autre ;
- Les souches « X4 » : des variants T-tropiques (ou SI), utilisant préférentiellement le CXCR4 comme corécepteur principal ;
- Les souches « R5X4 » ou (Dual-tropiques), qui sont capables de se fixer sur CCR5 ou CXCR4 [440].

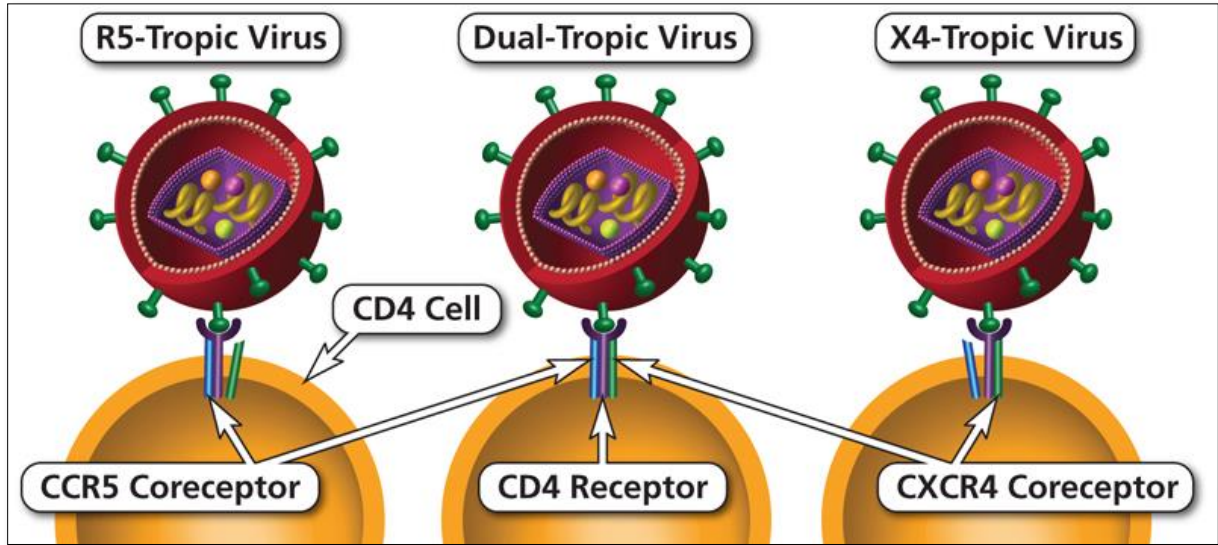


Figure 26 : Tropisme du VIH-1

V.3.2 - Conversion phénotypique R5-X4

Au cours de l'infection, l'utilisation des corécepteurs du VIH-1 passe d'une préférence pour CCR5 à une préférence pour CXCR4 chez 50% des individus infectés [441] (figure 27).

Le changement d'utilisation des corécepteurs est le résultat de l'interaction complexe de la population virale avec diverses populations cellulaires du système immunitaire. Ce changement est associé à une diminution accélérée du taux des lymphocytes T CD4⁺ et à une progression rapide vers le stade SIDA [441]. Par conséquent, la conversion phénotypique pourrait être un élément clé de la pathogenèse du VIH-1. Cependant les raisons du changement de corécepteurs restent encore controversées.

Il existe trois hypothèses principales pour expliquer la cause de la prédominance des variants R5 au stade précoce de l'infection, ainsi que les facteurs induisant la conversion phénotypique R5-X4 au cours des stades avancés de la maladie. Chacune de ces hypothèses propose une vision différente des pressions de sélection agissant sur la population virale et de l'interaction du virus avec le système immunitaire de l'hôte [442].

- **Hypothèse de transmission-mutation :**

Cette hypothèse propose que la prédominance de la souche R5 au début de l'infection s'explique par la sélection en faveur de cette souche lors de la transmission ou au cours des premiers stades de l'infection. Concernant le changement de corécepteur du VIH-1, il est supposé être le résultat de l'évolution des populations virales, suite aux nombreuses mutations, au cours de l'infection,

ce qui, dans certains cas, conduit à un changement du choix du corécepteur (de CCR5 à CXCR4). De plus, cette hypothèse suggère que l'émergence du virus X4 pourrait être un événement fortuit.

- **Hypothèse de contrôle immunitaire**

Cette hypothèse est basée sur le fait que les souches X4 sont mieux reconnus par le système immunitaire que les variants R5 [443, 444]. La sensibilité différentielle au contrôle immunitaire pourrait expliquer la prédominance de la souche R5 au début de l'infection.

L'émergence de variants X4 aux stades avancées de l'infection est supposée être la conséquence de l'affaiblissement du système immunitaire au cours de l'infection [439], ce qui conduirait à une diminution de la pression de sélection à médiation immunitaire contre les souches X4. Cependant, les variants X4 n'émergeraient que s'ils avaient une capacité répliquative plus élevée que les variants R5 [445].

- **Hypothèse basée sur les cellules cibles**

Cette hypothèse est basée sur les cellules cibles des variants R5 et X4. Les principales cellules cibles du VIH-1 in vivo sont les lymphocytes T CD4+ [446]. Une fraction élevée de cellules T CD4+ naïves exprime le CXCR4, tandis que des grandes proportions des cellules T CD4+ mémoires expriment à la fois le CCR5 et le CXCR4 [447, 448]. Cette hypothèse suggère que le changement de la population lymphocytaire au cours du temps augmentera la capacité répliquative des variants X4, et par conséquent, l'émergence de ces variants.

Le changement de la population lymphocytaire se produit comme suit :

Premièrement, la fréquence des lymphocytes T CD4+ mémoire augmente avec le temps, alors que la fréquence des lymphocytes T CD4+ naïfs diminue dans le sang périphérique [449]. Ce changement entraînera une augmentation de la pression de sélection en faveur des variants R5 car il augmente de manière disproportionnée les niveaux de cellules cibles de ces derniers.

Deuxièmement, la fréquence de prolifération des lymphocytes T CD4+ naïfs augmente pendant les stades avancés de l'infection. Cette augmentation relative du taux de cellules T CD4+ naïves induit une pression de sélection en faveur des variantes X4 car elle augmente la probabilité que l'infection des cellules T CD4+ naïves donne lieu à une infection productive.

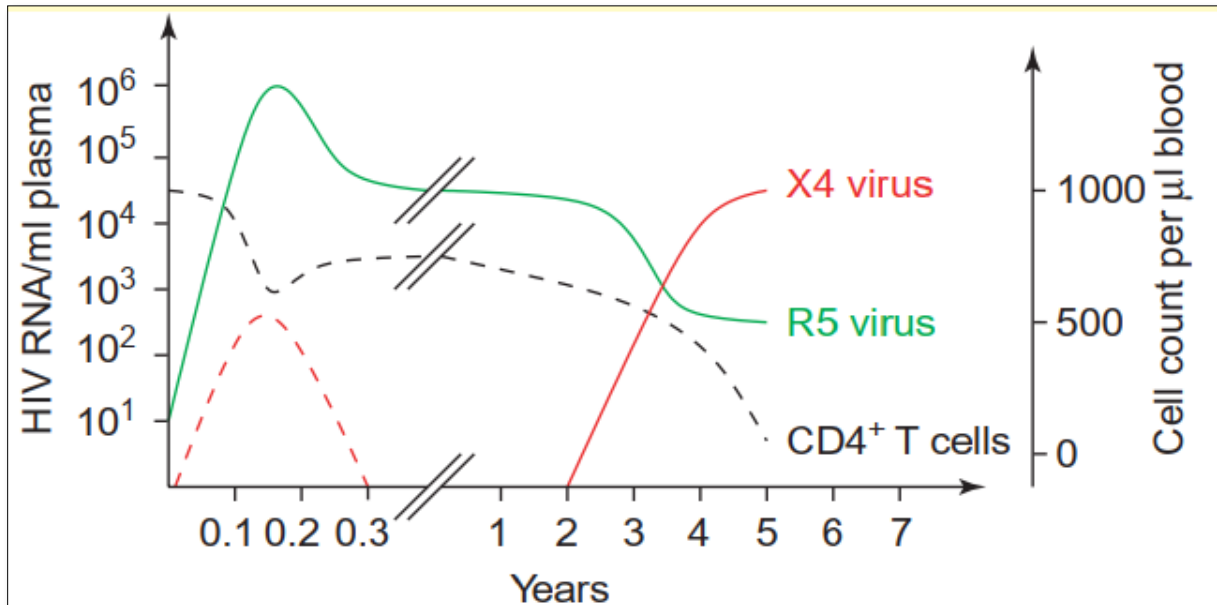


Figure 27 : Conversion phénotypique R5-X4 au cours de l'infection [442]. Les variants R5 sont présents tout au long de l'infection. Chez 50% des individus infectés, les souches X4 émergent, généralement plusieurs années après la séroconversion

V.4 - Réplication virale

Le cycle répliatif du VIH-1 peut être réparti en deux phases majeures durant lesquelles des mécanismes complexes sont mis en œuvre pour donner naissance à des particules virales infectieuses [450]:

- Une phase précoce, qui comprend les étapes de reconnaissance spécifique et l'entrée du virus dans la cellule cible, de transcription inverse permettant la synthèse d'ADN viral double brin, et d'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule infectée ;
- Une phase tardive, durant laquelle ont lieu la transcription et l'expression régulée des gènes viraux, permettant alors la production des protéines et des ARN viraux nécessaires à l'assemblage et au bourgeonnement de nouvelles particules virales matures. Les différentes étapes du cycle répliatif sont représentées dans la figure 28.

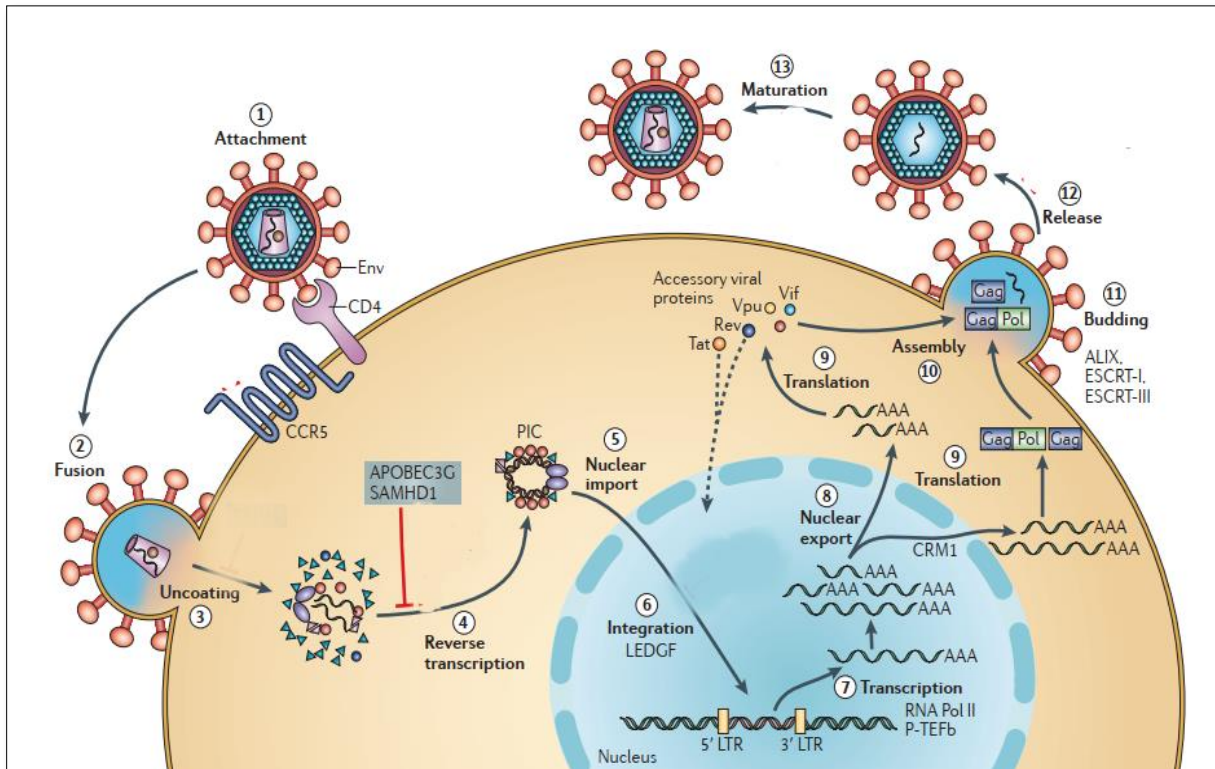


Figure 28 : Cycle réplcatif du VIH-1 (adapté de [451]). L'infection commence lorsque les glycoprotéines d'enveloppe (Env) se lient au récepteur CD4 et le corécepteur CCR5 (étape 1), conduisant à la fusion des membranes virale et cellulaire et à l'entrée du virus dans la cellule cible (étape 2). La décapsidation du noyau viral (étape 3) facilite la transcription inverse (étape 4), qui à son tour donne le complexe de pré-intégration (PIC). Après l'import dans le noyau de la cellule (étape 5), l'intégrase associée au PIC orchestre la formation du provirus intégré, aidée par le facteur de croissance LEDGF (étape 6). La transcription provirale (étape 7), médiée par l'ARN polymérase II de l'hôte (ARN Pol II) et le facteur d'élongation P-TEFb, donne des ARNm viraux de différentes tailles, dont le plus grand nécessite une exportation dépendante de l'énergie pour quitter le noyau via la protéine hôte CRM1 (étape 8). Les ARNm servent de modèles pour la production de protéines (étape 9) l'assemblage du génome et des différentes protéines virales a lieu au niveau de la membrane cellulaire (étape 10). Le bourgeonnement des particules virales (étape 11) et la libération (étape 12) de la cellule sont orchestrés par le complexe ESCRT et ALIX et sont suivis d'une maturation médiée par la protéase (étape 13) pour créer une particule virale infectieuse.

V.4.1 - La phase précoce

V.4.1.1 - L'entrée du VIH-1 dans la cellule cible

L'entrée du VIH-1 dans la cellule cible est la première phase du cycle de la réplication virale. C'est un processus actif qui implique le détournement de divers composants de la machinerie cellulaire. Cette phase commence par l'adhésion du virus à la surface de la cellule hôte et s'achève par la fusion des membranes cellulaire et virale avec la libération ultérieure de la capsid virale dans le cytoplasme (figure 29).

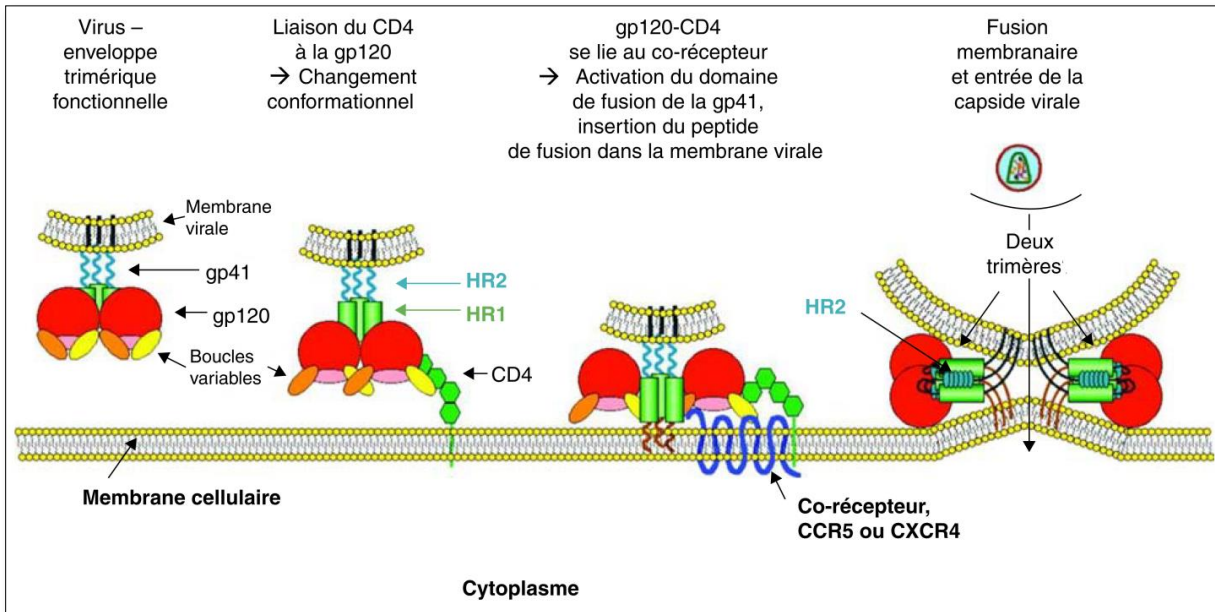


Figure 29: Modèle d'entrée du VIH-1 dans la cellule cible (adapté de [452]). La fixation de la gp120 au récepteur CD4 induit des modifications conformationnelles permettant l'exposition du site de fixation au corécepteur CXCR4 ou CCR5. Après fixation au corécepteur, le peptide de fusion de la gp41 est inséré à la membrane cellulaire. La fusion des membranes virale et cellulaire conduit enfin à l'entrée de la capside virale.

V.4.1.1.1 - L'adhésion du virus à la cellule hôte :

L'attachement du VIH-1 à la cellule cible peut être relativement non spécifique, avec l'interaction entre le complexe glycoprotéique d'enveloppe virale (Env) et les protéoglycanes à héparane sulfate chargés négativement, retrouvés à la surface cellulaire [453], ou peut résulter d'interactions plus spécifiques entre l'Env et l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ [454, 455] ou les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires tels que la molécule DC-SIGN exprimée à la surface des cellules dendritiques [456].

L'adhésion du VIH-1 à la cellule hôte via l'un de ces facteurs pourrait probablement rapprocher l'Env de son récepteur CD4 et de son corécepteur, favorisant ainsi l'infection [457]. Cependant, les facteurs d'attachement diffèrent des récepteurs qui sont plus essentiels, et bien qu'ils augmentent l'infection *in vitro*, leur rôle physiologique *in vivo* reste incertain.

V.4.1.1.2 - La liaison de l'ENV au récepteur CD4

La deuxième étape d'entrée du virus est la liaison de la glycoprotéine gp120 de l'Env à son récepteur principal, la glycoprotéine CD4 exprimée à la surface de la cellule hôte. La liaison du CD4 avec la gp120 a été étudiée par cristallographie aux rayons X, ainsi que par mutagenèse [458]. Cette liaison est établie suite à des interactions (type van der Waals et liaisons hydrogène) entre le premier domaine extracellulaire (D1) du CD4, notamment les 22 résidus concentrés

dans le segment 25-64 et 26 résidus de gp120, répartis sur six segments. Les résidus Phe43 et Arg59 de CD4 interagissent avec les résidus hautement conservés Asp368, Glu370 et Trp427 de gp120. Le résidu Phe43 s'insère dans une cavité hydrophobe de gp120, tandis que l'Arg59 interagit avec gp120 à l'extérieur de cette cavité [236].

Cet ensemble d'interactions provoque des réarrangements des régions V1 / V2 de la gp120 laissant le champ à un réarrangement et une exposition de V3, premier site de liaison du corécepteur. De plus, la liaison au CD4 conduit à la formation d'un feuillet intermédiaire (ou *bridging sheet*), un feuillet de 4 brins β composé de deux feuillets de deux brins β , qui sont normalement séparés à l'état non lié de la gp120 [236, 459]. Il a été démontré que cette conformation CD4-liée est plus stable que la forme libre de gp120 [460].

Le feuillet intermédiaire et la boucle V3 repositionnée ont un rôle essentiel dans l'étape suivante de l'entrée virale, l'engagement des corécepteurs.

V.4.1.1.3 - La liaison aux corécepteurs

La troisième étape de l'entrée virale, l'interaction gp120 – corécepteur, est le déclencheur le plus crucial qui active le potentiel fusogène de la gp41. Les changements conformationnels induit par la liaison de gp120 au CD4, impliquent l'exposition et / ou la formation d'un site de liaison, CD4i (*CD4-induced*), pour les corécepteurs [236]. Ces corécepteurs, principalement CCR5 et CXCR4 pour le VIH-1, servent de deuxième récepteur obligatoire pour l'entrée du virus dans la cellule cible [280, 461]. Principalement, le site de liaison au corécepteur est constitué du feuillet intermédiaire, hautement conservée, et la boucle V3 [462-464].

Les corécepteurs prennent différentes conformations sur la surface des cellules et sur différents types de cellules [465, 466], influençant leur capacité à faciliter l'infection par le VIH-1 en favorisant l'insertion du virus dans la membrane de la cellule cible. De telles conformations peuvent résulter de la formation de dimères, comme indiqué pour CCR5 [467].

Les sites impliqués dans l'entrée du VIH-1 dans la cellule hôte sont situés sur l'extrémité N-terminale et l'ECL2 du corécepteur. Une structure de CXCR4, obtenue par RMN, impliquait l'extrémité N-terminale contenant la sulfotyrosine, dans la liaison à la gp120 du VIH-1, ce qui s'est avéré être analogue à la reconnaissance de SDF1 [468]. À l'appui de cela, des études de mutagenèse ont indiqué que le domaine N-terminal du CXCR4 jouait un rôle important dans la fusion et l'entrée du VIH-1 [469, 470]. De plus, différentes souches de VIH-1 ont présenté différents modèles d'interaction avec CXCR4 au cours de l'infection [469-471]. Les ECLs ainsi

que les régions transmembranaires de CXCR4 semblent être nécessaires pour l'activité du corécepteur du VIH-1 [472]. Des mutations ponctuelles à la position des acides aminés 193 (D193A) au niveau de la région ECL2; à la position 262 (D262A) au niveau de la région ECL3; ou à la position 97 (D97N), au niveau de la région transmembranaire, ont provoqué la diminution des infections par les virus HIV- NDK et LAI, suggérant que ces acides aminés soient impliqués dans l'interaction entre CXCR4 et la gp120 virale [470].

L'extrémité N-terminale, ECL2 et ECL3 de CXCR4 sont donc impliquées dans l'entrée du VIH-1 dans la cellule cible. En outre, il a été démontré que l'ECL2 est limitée à des souches particulières de VIH-1 telles que les souches à tropisme X4 ou à tropisme double [473].

Expérimentalement, la préparation d'échantillons stables et homogènes de CCR5 ou de CXCR4 purifiés s'est avérée techniquement difficile, et c'est pour cela que divers essais ont donc été menés pour mesurer l'affinité de liaison des interactions Env-corécepteur en présence de CD4 soluble (<10 nM pour CCR5 ; 200-500 nM pour CXCR4 [474-477]). Une étude récente de Shaik et al. [478] a révélé la première structure d'un monomère de gp120 (pleine longueur) en complexe avec un 4D-CD4 soluble et un CCR5 humain non modifié, par la technique de Cryo-tomographie électronique (figure 30).

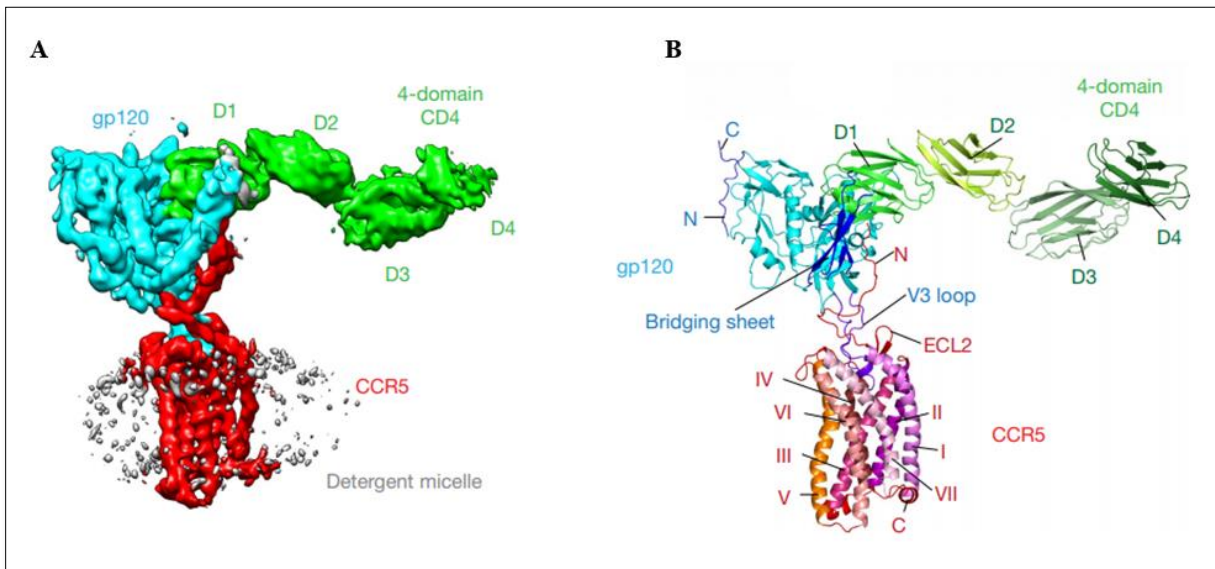


Figure 30: Cryo-tomographie électronique du complexe CD4 – gp120 – CCR5 [478]. (A) Cryo-EM map du complexe contenant la gp120 du VIH-1 (cyan), le CCR5 (rouge), le CD4 à quatre domaines en vert ; D1-D4, domaine 1-domaine 4). (B) Structure globale du complexe CD4 – gp120 – CCR5 illustré dans le diagramme en ruban. Les extrémités N. et C. terminales, l'ECL2, et les hélices transmembranaires I, II, III, IV, V, VI, VII, sont indiquées.

Shaik et ses collègues ont pu déterminer les détails des interactions entre la gp120 et le CCR5, largement en accord avec les prédictions basées sur les données mutationnelles précédentes [462, 479]. Il existe deux interfaces de contact principales entre le CCR5 et la gp120 (figure 31) [478, 480] :

- La boucle V3 de la gp120 s'insère dans le CRS2 (*Chemokine Recognition Site 2*) du CCR5 et entre en contact avec tous les sept segments transmembranaires. L'ECL2 du CCR5 s'enroule autour de V3 et établit des contacts avec des résidus dans la tige et la couronne de V3 ;
- L'extrémité N-terminale du CCR5 adopte une conformation étendue et entre en contact avec le feuillet intermédiaire de la gp120, qui se forme seulement après la liaison au CD4 [236, 481].

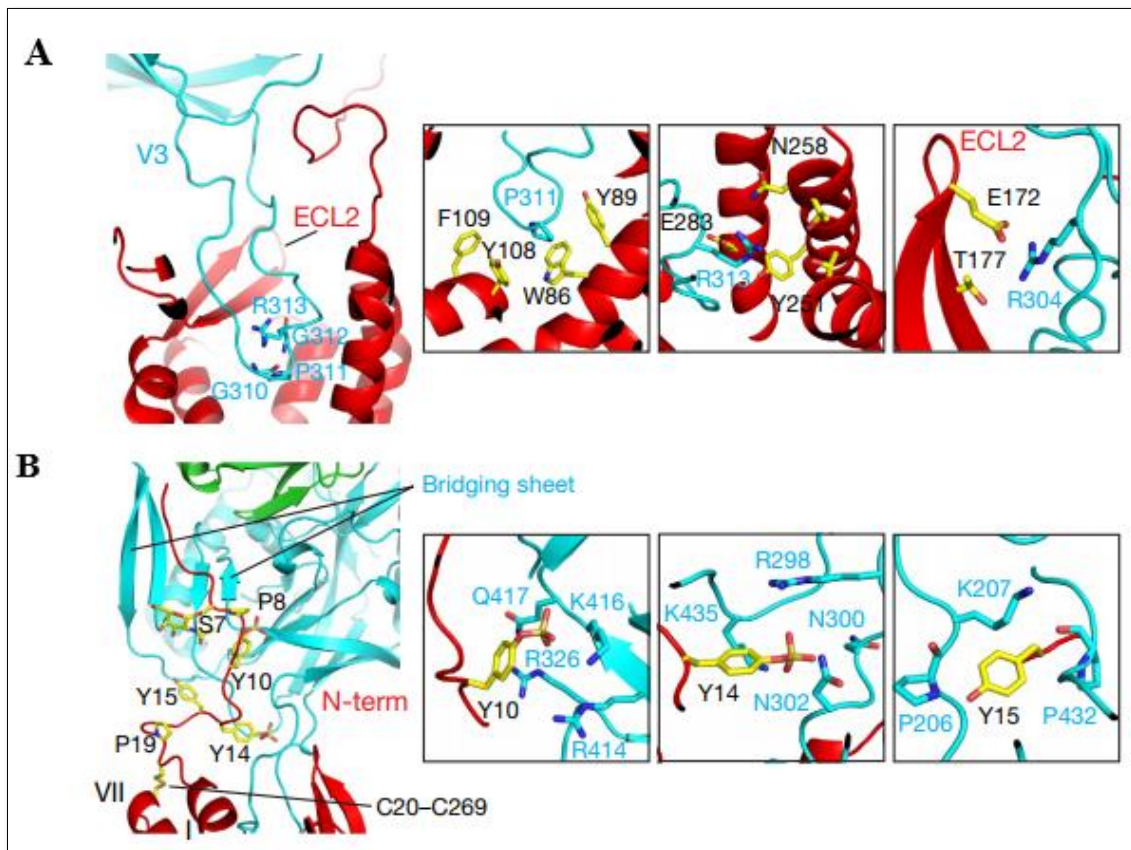


Figure 31 : Interfaces entre gp120 et CCR5. (A) Interactions entre la boucle V3 de gp120 (cyan) et le CRS2 de CCR5 (rouge). À gauche, diagramme en ruban de l'insertion de V3 dans le CRS2. Le motif GPGR de V3 est en modèle de bâton. A droite, les contacts majeurs entre les résidus P311, R313 et R304 de gp120 (représentés en cyan) et les résidus de CCR5. (B) Interactions entre l'extrémité N-terminale de CCR5 (rouge) et le feuillet intermédiaire (*bridging sheet*) de la gp120 (cyan). À gauche, vue d'ensemble de l'extrémité N-terminale de CCR5 attachée au *bridging sheet*. À droite, contacts majeurs entre Y10 et Y14 sulfatés, ainsi que Y15, du CCR5 et des résidus de gp120.

Il a été démontré que les interactions électrostatiques sont susceptibles d'améliorer les interactions gp120 – corécepteur. L'extrémité N-terminale de CCR5 (et souvent d'autres corécepteurs) est chargée négativement en raison de trois acides aminés acides et de quatre tyrosines potentiellement sulfatées, qui sont importantes pour la fonction des corécepteurs [482]. Ces résidus négatifs peuvent faciliter les interactions avec les acides aminés positifs dans et autour du feuillet intermédiaire de la gp120 [236]. De plus, la boucle V3 de la souche X4 est chargée positivement, ce qui permet son interaction avec l'ECL2 de CXCR4 qui contient cinq résidus négatifs. Les anticorps dirigés contre le site de liaison au corécepteur sur gp120 (impliquant le feuillet intermédiaire et la boucle V3) bloquent les interactions gp120 – corécepteur [483, 484].

La boucle V3 est connue depuis longtemps comme un déterminant du tropisme en jouant un rôle dans le choix et l'utilisation des corécepteurs. L'utilisation des corécepteurs du VIH joue un rôle majeur dans la transmission virale et la progression de la maladie. Dans un grand nombre d'isolats primaires du VIH-1, l'analyse de la séquence de V3 a révélé que les souches X4 à réplication rapide contenaient des séquences de V3 avec une charge positive significativement plus élevée que celles des souches R5 à réplication lente [485]. Ces différences de charge pouvaient être attribuées à des résidus d'acides aminés très variables situés de part et d'autre de la boucle V3 [485].

Expérimentalement, des substitutions à ces positions entraînent des changements dans la séquence protéique de la boucle V3 permettant la transition du tropisme R5 au tropisme X4. Le changement du phénotype viral est lié à une augmentation de la charge positive globale de la région V3 [485, 486]. Par conséquent, pour la souche R5, elle varie ainsi de +2 à +10 contre +7 à +10 pour les souches X4. Plus précisément, la présence d'acides aminés chargés positivement (arginine ou lysine) en position 11 et/ou 25 est associée à l'utilisation préférentielle du corécepteur CXCR4 pour l'entrée du virus dans la cellule cible, alors que la présence à ces mêmes positions d'acides aminés neutres ou chargés négativement (acide aspartique ou glutamique) est liée à l'utilisation de CCR5 [485, 487, 488]. Basé sur ces caractéristiques moléculaires, des algorithmes de prédiction génotypique du tropisme viral ont pu être suggérés [489, 490].

En résumé, les diverses souches du VIH-1 varient dans les sites et les acides aminés spécifiques des corécepteurs qu'elles exploitent pour la reconnaissance et le déclenchement de la fusion. La

capacité du VIH-1 à faire varier les résidus d'Env impliqués dans l'interaction avec les corécepteurs est un mécanisme majeur d'évasion immunitaire.

En ce qui concerne les modifications conformationnelles induites par l'interaction gp120-corécepteur, l'étude menée par Shaik et al. a dévoilé un aspect inattendu de la structure du complexe CD4 – gp120 – CCR5, qui est l'absence de modifications allostériques évidentes de la gp120 pouvant affecter la gp41, comme supposé précédemment. Une comparaison entre la structure de la gp120 dans le complexe gp120-CD4 et dans le complexe CD4 – gp120 – CCR5 n'a montré aucune différence majeure dans la région centrale de la gp120 (figure 32) [478]. En particulier, une zone d'environ 50 Å entre le site de liaison au CCR5 et l'interface gp120 – gp41 (y compris les domaines interne et externe et le feuillet intermédiaire) reste presque invariante, ce qui suggère que CCR5 n'induit aucun changement structural majeur affectant la gp41 [478].

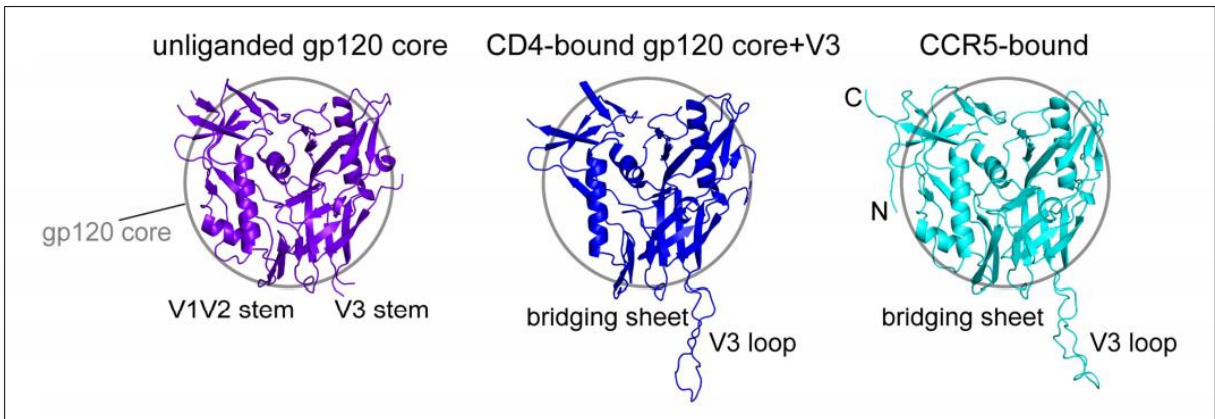


Figure 32: Comparaison des différentes conformations de la gp120 [478]. Structures du core de la gp120 non-ligandé (violet), core de gp120 lié au CD4 avec la boucle V3 (bleu), et gp120 en complexe avec CD4 et CCR5 (cyan). La région centrale gp120 est marquée par un cercle. Les extrémités N. et C. terminales, la tige V1/V2, la boucle V3 et le feuillet intermédiaire (bridging sheet) sont indiquées.

Puisque la liaison du CCR5 ne semble pas induire de modifications allostériques qui peuvent libérer la gp41 et déclencher le processus de fusion membranaire, il est intéressant de savoir comment le CCR5 pourrait fonctionner comme un corécepteur essentiel. Sur la base des structures connues du trimère Env du VIH-1, la gp41 sous conformation pré-fusion n'est plus stable et est susceptible d'entrer dans un processus de repliement irréversible une fois que la gp120 se dissocie du complexe [481, 491-494]. Ainsi, la dissociation de la gp120 peut être le déclencheur crucial qui initie les événements de repliement de la gp41, y compris l'insertion du peptide de fusion de la gp41 dans la membrane cible et la formation de la conformation post-fusion. En effet, la séparation de gp120 à partir des trimères Env, spontanée ou induite par CD4, est bien documentée pour de nombreux isolats de VIH-1 [495], ce qui indique que la gp120 est

sujette à la dissociation de la gp41 même en l'absence d'un corécepteur. L'étude de Shaik et al. a prouvé que la dissociation prématurée de la gp120 serait - en l'absence d'un corécepteur - non productive : pour un virion attaché à la surface de la cellule cible uniquement par le contact trimère d'Env – CD4, la distance entre le peptide de fusion et la surface de la membrane peut être d'environ 160 Å [478]. Si la gp120 se dissocie, le peptide de fusion serait trop éloigné pour atteindre la membrane cible [478]. La liaison de gp120 à CCR5 peut amener le peptide de fusion de gp41 à moins de 70 Å de la surface de la membrane, ce qui est cohérent avec la distance nécessaire pour que le peptide de fusion se transloque et atteigne la membrane cible [493].

L'association gp120– CD4 est instable et rapidement réversible en l'absence de CCR5 [496, 497]. CCR5 est donc nécessaire pour stabiliser les changements conformationnels induits par CD4, qui favorisent la fusion membranaire. En particulier, l'interaction entre la boucle V3 et le CCR5 empêcherait le trimère d'Env de revenir à la conformation de pré-fusion [478]. La structure du complexe CD4 – gp120 – CCR5 proposée par Shaik et ses collègues montre donc comment un corécepteur peut être essentiel pour la fusion membranaire, malgré le fait qu'il n'induit pas activement le repliement de la gp41. Ces résultats font progresser notre compréhension du mécanisme de l'entrée du VIH-1 dans les cellules hôtes et peuvent être impliqués dans le développement de vaccins et d'agents thérapeutiques.

V.4.1.1.4 - La fusion membranaire

La quatrième et la dernière étape de l'entrée virale est la fusion membranaire. Cette étape nécessite tout d'abord le mouvement de la particule virale vers le site où se produit une fusion membranaire productive. Des études ont montré que le VIH-1 pourrait utiliser la machinerie de la cellule hôte pour atteindre des sites de fusion membranaire [498, 499]. De plus, le VIH-1 peut avoir besoin d'être internalisé par la machinerie endocyttaire cellulaire pour que la fusion membranaire se produise [500].

L'interaction gp120-corécepteur induit l'exposition du peptide de fusion hydrophobe de la protéine gp41, et son insertion dans la membrane de la cellule hôte. Cela attache les membranes virale et cellulaire, permettant au peptide de fusion de chaque gp41 dans le trimère de se plier dans une région charnière, assemblant la région NHR et la région CHR de chaque gp41 pour former un faisceau à six hélices [501]. La formation de ce faisceau est la force motrice qui ramène les deux membranes en apposition étroite, ce qui entraîne la formation et la stabilisation du pore de fusion [502]. Ce pore de fusion va permettre par la suite la libération de la capsid virale dans le cytoplasme de la cellule cible.

V.4.1.2 - La décapsidation

La décapsidation est une étape obligatoire de l'infection précoce par le VIH-1. Elle est définie comme la destruction et la perte de capsid virale, libérant ainsi le complexe de transcription inverse. Ce complexe est composé de l'ARN viral, d'un ARN de transfert lysine 3 (l'ARN_tLys₃) qui sert d'amorce à la transcription inverse du génome du VIH-1, de protéines virales et cellulaires [503].

L'endroit exact et le moment de déroulement de la décapsidation est un sujet controversé. Pendant plusieurs décennies, on a pensé que la décapsidation se produisait dans le cytoplasme, immédiatement après l'entrée du virus dans la cellule, en coordination avec la transcription inverse [504-506]. Cependant, quelques études récentes ont suggéré que la capsid reste intacte jusqu'à ce que les complexes VIH-1 atteignent la membrane nucléaire et que la décapsidation se produit plusieurs heures plus tard, au niveau de l'enveloppe nucléaire pendant l'importation nucléaire [505, 507, 508]. Cela signifie que la capsid a un rôle essentiel dans la cellule infectée : pour le transport vers le noyau, la transcription inverse et l'importation nucléaire.

Le maintien d'une capsid intègre plusieurs heures dans le cytoplasme permet la protection du génome viral, en empêchant sa reconnaissance par les récepteurs cytosoliques de l'immunité innée [507]. Pendant ce temps, l'ARN viral subit une rétrotranscription en ADN double brin et la capsid est modifiée structurellement pour qu'elle puisse traverser le NPC (*nuclear pore complexes*). Une autre étude récente a démontré que le noyau viral reste en grande partie intact au sein du noyau de la cellule infectée, et que son décapsidation se produit près du site d'intégration et juste avant l'intégration [509].

Ces découvertes inattendues vont modifier fondamentalement notre compréhension des événements de réplication post-entrée du VIH-1.

V.4.1.3 - La transcription inverse

La transcription inverse est une étape essentielle du cycle répliatif du VIH-1. Elle implique la transition de l'ARN viral simple brin en ADN proviral double brin, qui est ensuite intégré dans le génome de la cellule hôte. C'est un processus discontinu qui se déroule dans le RTC (Reverse Transcription Complex) en étant catalysée par l'enzyme virale RT possédant plusieurs sites actifs.

Le processus de transcription inverse peut être réparti en plusieurs étapes comme suit :

Elle est initiée au niveau de l'extrémité 5' de la matrice d'ARN (+), (figure 33) : un ARNtLys3, qui a été incorporé dans le virion au cycle de réplication précédent, va se fixer au primer binding site (PBS), situé dans la région U5 en 5' du génome viral ARN (Figure 33a). Il sert d'amorce et les régions U5 et R, situées à l'extrémité 5' du génome viral, sont transcrites à partir de l'extrémité 3' de cet ARNtLys [510] (figure 33b). Ensuite le brin d'ADN (-) néosynthétisé est apparié au niveau de la région R de l'extrémité 3' de la matrice d'ARN (+), ce qui conduit à un transfert intra ou intermoléculaire (figure 33c). L'ADN (-) sert alors d'amorce pour poursuivre sa propre synthèse (figure 33d). L'ARN viral déjà transcrit, situé 15 à 20 nucléotides en amont du site catalytique de polymérisation, est dégradé par l'activité ARNaseH de la RT (figure 33e). Les régions 3'PPT et cPPT échappent en revanche à cette dégradation. Ces deux régions vont servir d'amorce lors de la synthèse de l'ADN (+) (figure 33f). La synthèse du deuxième brin d'ADN nécessite un deuxième saut de brin et conduit à la formation de deux segments de taille identique, se chevauchant partiellement (figure 33g). Ce court chevauchement de brins nommé triplex central ou « DNA flap » est un élément essentiel de l'étape d'import nucléaire [511].

Après l'étape de transcription inverse, le génome viral d'ADN est bordé à ses deux extrémités par les LTR, qui portent des signaux d'intégration (figure 33h). Le LTR contient le promoteur qui contrôle l'expression du génome viral. L'ADN proviral associé à l'IN dans le complexe de pré-intégration PIC (*Pre-Integration Complex*), va être importé dans le noyau de la cellule, où il va s'intégrer dans le génome cellulaire.

La transcription inverse est connue pour être un mécanisme sujet aux erreurs, conduisant à l'apparition de nombreuses mutations virales, responsables de l'échappement du système immunitaire de la résistance au traitement antirétroviral.

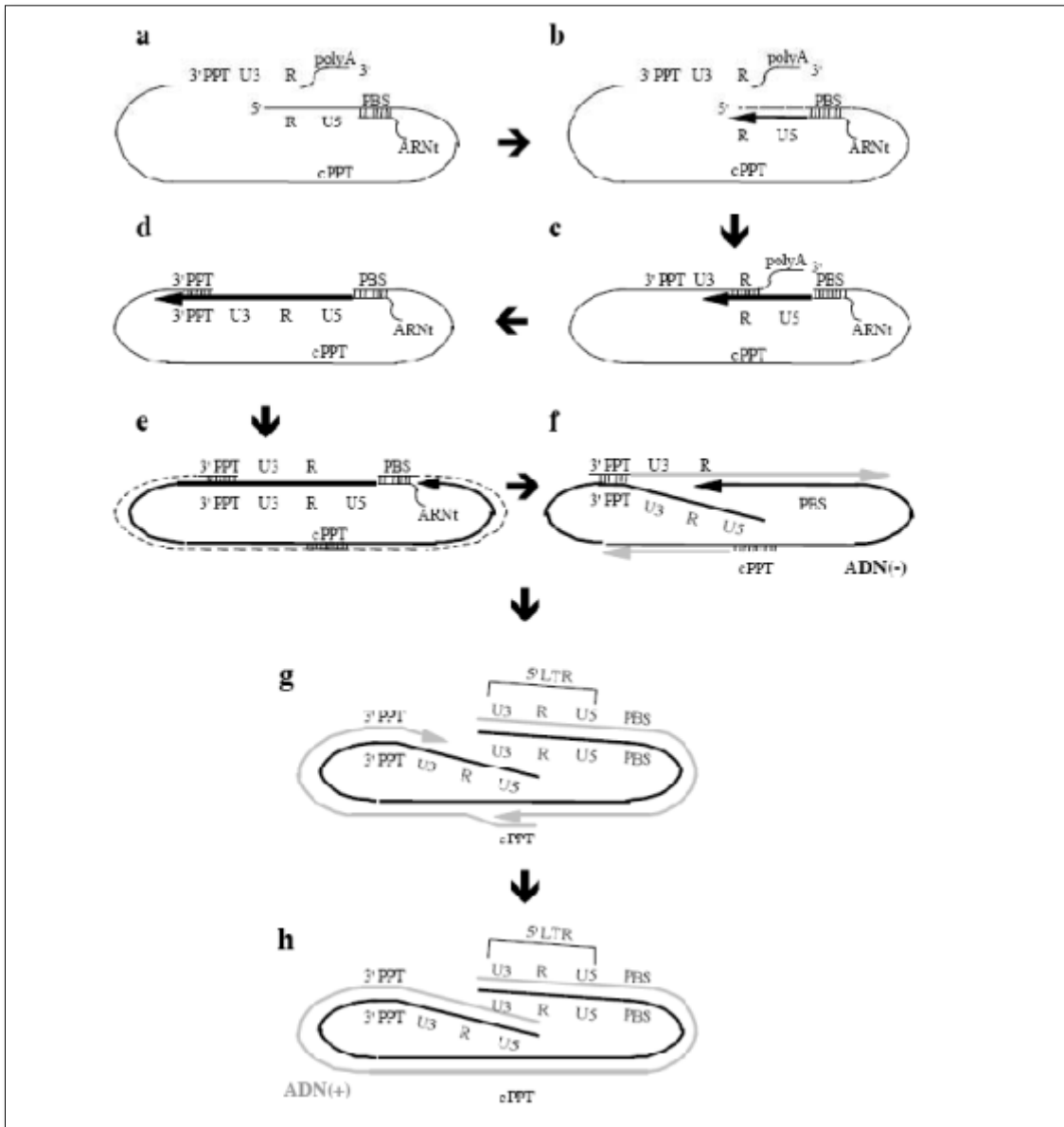


Figure 33. Représentation schématique des différentes étapes de la transcription inverse

V.4.1.4 - L'import nucléaire et l'intégration

Après la synthèse de l'ADN viral, il s'associe à l'intégrase virale et à d'autres protéines telles que la MA, la NC et la Vpr et de protéines cellulaires, dont les importines. Ce produit de haut poids moléculaire, appelé complexe de pré-intégration (PIC), est ensuite transporté, via vers le noyau pour une intégration ultérieure. Les étapes catalytiques initiales de la réaction d'intégration sont réalisées par l'intégrase virale (IN). Celle-ci va cliver les deux extrémités 3' de l'ADN viral au niveau de la séquence consensus CAGT, entre le A et le G, libérant le dinucléotide GT. L'ADN viral ainsi mûri présentera alors des extrémités cohésives nécessaires pour s'intégrer à l'ADN de la cellule hôte [512]. Cette étape est appelée le *3'processing* (figure 34).

Au niveau chromosomique, l'intégration du VIH-1 est fortement favorisée dans les unités de transcription active, ce qui améliore l'expression des gènes viraux après l'intégration [513]. L'IN se lie au facteur cellulaire LEDGF / p75, qui favorise l'infection et attache l'IN à des sites cibles privilégiés [514]. La machinerie d'intégration du VIH-1 doit également interagir avec de nombreux facteurs supplémentaires de la cellule hôte pendant l'infection, y compris les protéines des pores nucléaires lors de l'entrée nucléaire, les histones lors de la capture initiale de la cible et les protéines de réparation de l'ADN pendant l'achèvement des étapes de jonction de l'ADN [512].

Une fois intégré, l'ADN proviral est répliqué avec l'ADN cellulaire pendant les cycles de division cellulaire, comme n'importe quel gène cellulaire. Cependant, selon l'état d'activation des cellules cibles, l'ADN proviral intégré peut soit rester latent, dans un état d'infection réversiblement non productive, ou bien subir une production virale active.

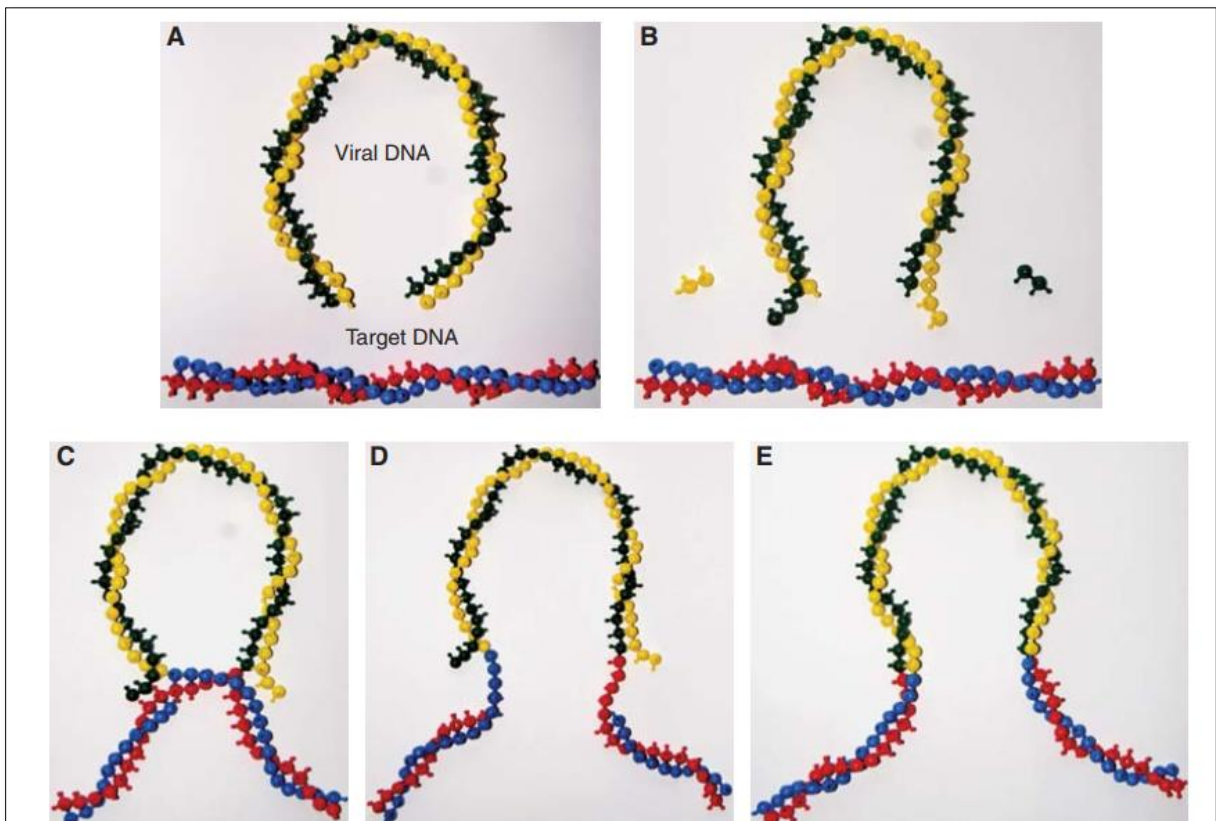


Figure 34 : Intégration de l'ADN viral dans l'ADN de la cellule hôte [512]. (A) L'ADN viral (vert et jaune) et l'ADN cible (bleu et rouge). (B) *3' processing*. (C) Les extrémités 3'OH générées par la réaction de 3' processing « attaquent » la liaison phosphodiester dans l'ADN cible. Les extrémités 3'OH de l'ADN viral sont jointes aux extrémités 5' de l'ADN cible au site d'intégration. (D) L'achèvement de la formation du provirus nécessite l'élimination des deux bases non appariées aux extrémités 5' de l'ADN viral, en réparant les espaces (gaps) à la jonction de l'ADN cible et de l'ADN viral. Cette réparation est probablement réalisée par les enzymes cellulaires. (E) Le provirus intégré.

V.4.2 - La phase tardive

V.4.2.1 - La transcription et la traduction

Le provirus intégré agit comme un modèle de transcription. Juste après l'infection, la machinerie cellulaire produit des transcrits entièrement épissés codant pour les protéines accessoires du VIH-1 : Tat et Rev [515, 516]. Tat qui est une protéine régulatrice essentielle pour la réplication virale, se lie à l'ARN TAR du VIH-1, induisant la transcription. De concert, Rev favorise l'export nucléaire de l'ARN du VIH-1 par une liaison à son élément de réponse RRE présent dans l'ARN non ou partiellement épissé. Ainsi, l'augmentation des niveaux des protéines Tat et Rev favorise l'export des ARN partiellement épissés. De cette manière, d'autres protéines accessoires, en plus de celles de l'enveloppe virale (Env), sont produites. Enfin, les ARNm non épissés sont exportés vers le cytoplasme de telle sorte que Gag et Pol soient également traduites et les particules virales produites.

En outre, il existe plusieurs niveaux de régulation post-transcriptionnelle qui peuvent avoir un impact sur l'expression des ARNm et des protéines viraux. Il s'agit notamment de l'épissage de l'ARNm, de la régulation de l'ARN par les micro-ARN et l'export nucléaire, ainsi qu'un contrôle au niveau de la traduction [515, 517].

V.4.2.2 - L'assemblage et le bourgeonnement

Le VIH-1 s'assemble en virions morphologiquement distincts immatures et matures. Il s'assemble et bourgeonne initialement des cellules sous la forme d'une particule sphérique non infectieuse et immature qui est organisée par une couche de protéines Gag associées à la membrane virale interne (figure 35). L'assemblage des virions est initié au niveau de la membrane plasmique et est orchestré par le précurseur Gag, l'acteur majeur de ce processus [518]. Les domaines fonctionnels de Gag permettent de :

- Cibler les molécules Gag vers des sites d'assemblage au niveau de la membrane plasmique ;
- Encapsider le génome viral dimérique ;
- Recruter et incorporer tous les autres composants du virus dans la particule ;
- Recruter les facteurs cellulaires et les chaperons nécessaires, tels que la machinerie de bourgeonnement ESCRT.

Le processus de bourgeonnement se produit principalement au niveau des endosomes tardifs pour les macrophages [519, 520] et au niveau de la membrane plasmique pour les lymphocytes

[521]. Dans les deux cas, le VIH-1 recrute la machinerie cellulaire ESCRT pour libérer les particules virales.

La libération du virion passe par la formation des courbures positives et négatives dans la bicouche lipidique (figure 35). La courbure de la membrane pendant le bourgeonnement est médiée par Gag et également par des protéines cellulaires et lipides membranaires [522]. L'abscission de la membrane d'assemblage et la libération du virion naissant nécessitent une fission de la membrane, qui est facilitée par la machinerie cellulaire qui fonctionne normalement dans la voie ESCRT (figure 35). Cette voie comprend des complexes protéiques, appelés ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III et une AAA ATPase dodécamérique appelée VPS4, qui circulent entre le cytoplasme et les membranes des endosomes tardifs.

Le VIH-1 a deux domaines tardifs bien caractérisés qui sont contenus dans la région p6 de Gag. Il s'agit des séquences peptidiques Pro-Thr / Ser-Ala-Pro (PTAP) et Tyr-Pro-Xn-Leu (YPXL), qui se lient respectivement aux protéines TSG101 (un composant du complexe ESCRT-I) [523] ou ALIX (qui se lie aux protéines ESCRT-I et ESCRT-III) [524]. Le VIH-1 recrute également des membres de la famille d'ubiquitine ligase NEDD4 [525]. Ces interactions des domaines tardifs induisent le recrutement de la machinerie principale de fission, composée du complexe ESCRT-III et de l'enzyme VPS4 [526], ce qui facilite alors le bourgeonnement de nouveaux virions à partir de la surface cellulaire.

Après la libération du virion, l'enzyme VPS4 démonte le « dôme » ESCRT-III en utilisant l'énergie dérivée de l'hydrolyse de l'ATP, et réinitialise ainsi le système pour un autre cycle de fission membranaire [526].

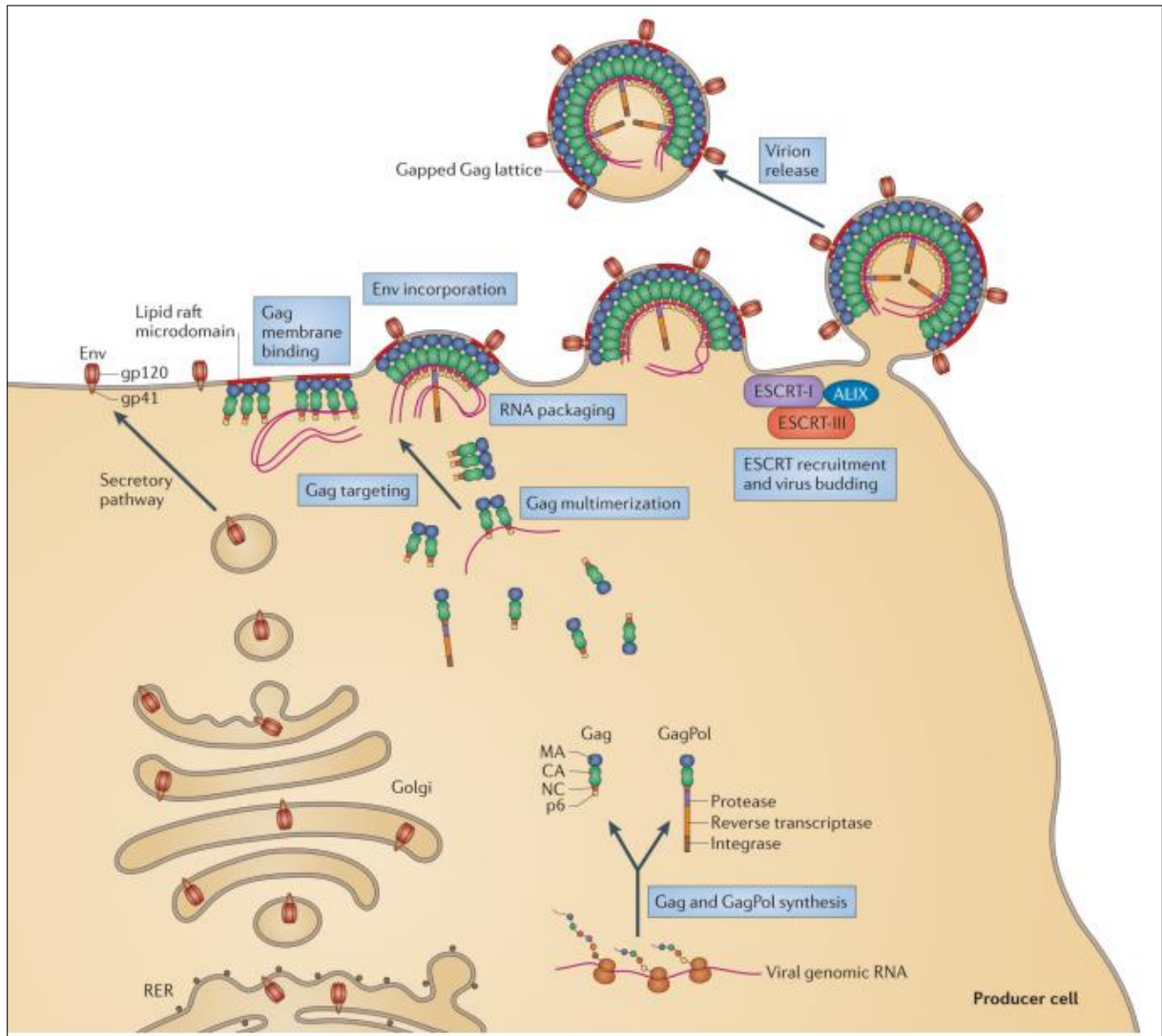


Figure 35 : Assemblage et bourgeonnement de la particule virale [527].

V.4.2.3 - La maturation virale

Les premiers détails concernant le processus de maturation proviennent d'images obtenues à partir des études de microscopie électronique montrant qu'il existe deux types de particules virales (figure 36). Les virions immatures présentent une couche dense juste en dessous de l'enveloppe, alors que les virions matures contiennent un noyau structurellement organisé en forme de cône. Les particules de VIH-1 sont initialement libérées de la cellule productrice sous forme de virions immatures non infectieux contenant des précurseurs non clivés. Lors de la phase de maturation, ces précurseurs subissent un clivage protéolytique, et les protéines structurelles sont réorganisées pour transformer les virions immatures en virus matures capables d'infecter de nouvelles cellules cibles.

Le clivage des précurseurs Gag et Gag-Pol est assuré par l'activité de la protéase rétrovirale (PR), une protéine de 99 acides aminés qui appartient à la famille des aspartyl protéases cellulaires. A l'étape initiale, un signal inconnu, probablement basé sur la concentration locale de précurseurs de Gag-Pol favorise la dimérisation du PR et l'autoclivage de l'enzyme active [528].

Le clivage de Gag par la protéase rétrovirale se produit à cinq sites spécifiques [529, 530] : la jonction SP1-NC est clivée avec une plus grande efficacité. Ensuite, les régions SP2-p6 et MA-CA sont clivées, permettant la libération de MA et de p6 ensemble avec p25 (CA-SP1) et NC-SP2. La séparation des peptides espaceurs est l'étape finale de maturation qui transforme la p25 en protéine de capsid p24 mature et permet la libération de la NC mature. Le clivage des protéines structurales du VIH-1 s'accompagne d'un changement morphologique du VIH-1.

Ce changement a été étudié en microscopie électronique qui a révélé une conversion de l'anneau dense en polyprotéines Gag, assemblées sous la bicouche lipidique en une capsid de forme conique résultant de l'assemblage de CA mature [518] (figure 36). L'assemblage de cette capsid, ainsi que sa stabilité et sa capacité à se désassembler au moment opportun, régulent l'infection virale en permettant au stade précoce de l'infection de se produire dans une nouvelle cellule cible.

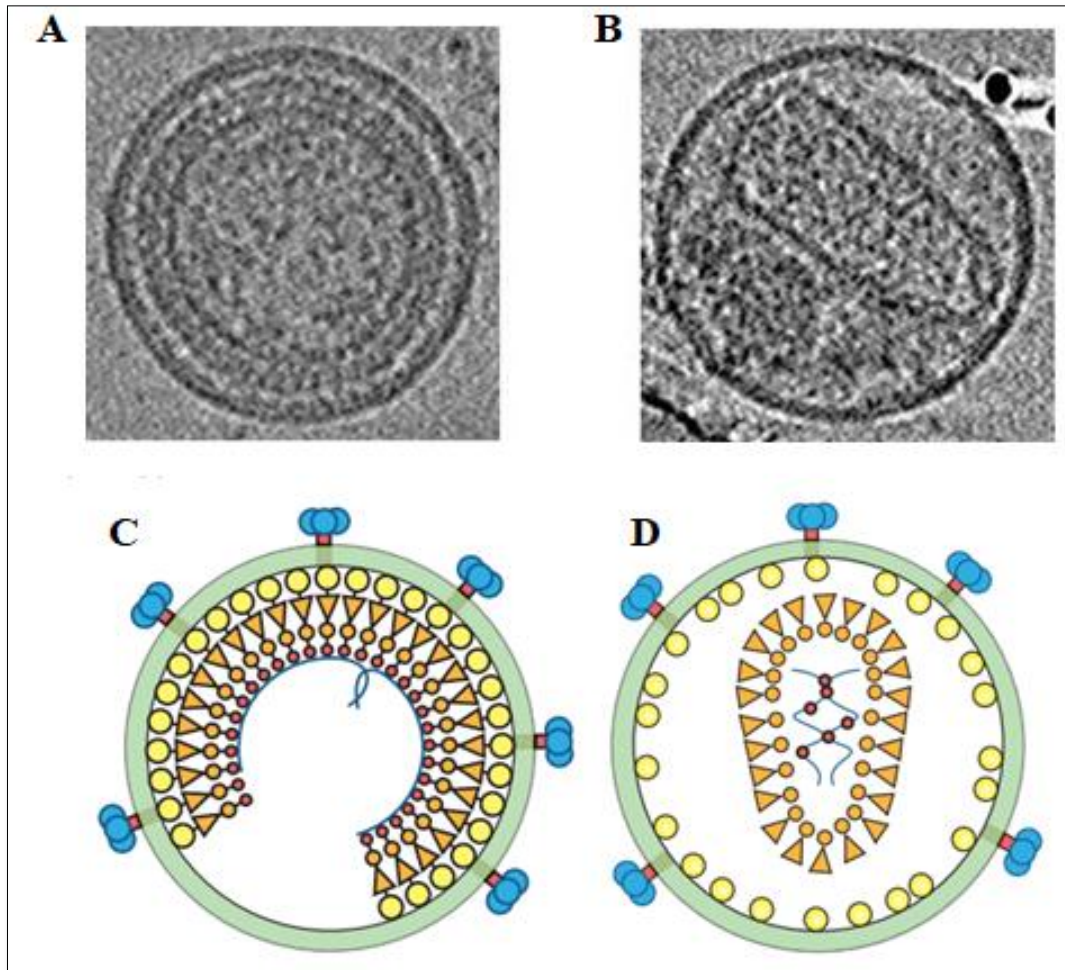


Figure 36 : Particule virale du VIH-1 [531]. (A) et (B), Cryo-tomographie électronique des particules virales mature et immature. (C) et (D), Représentation schématique montrant l'organisation du virion immature et mature

VI - VARIABILITE GENETIQUE DU VIH-1

Le VIH-1 est caractérisé par une vaste diversité génétique. Les mutations d'échappement se traduisent par une variabilité importante du VIH-1 et par son adaptation à la fois à l'activité immunitaire et à la thérapie antirétrovirale. Cependant, certaines mutations d'échappement peuvent gravement affecter la capacité répliquative du VIH-1 (*fitness*) [532, 533].

VI.1 - Origine du VIH-1 et de sa diversité génétique

Sur la base de l'étude des séquences génétiques, le VIH-1 est classé actuellement en quatre groupes : M (pour *major group*), groupe O (pour *outlier group*), groupe N (pour *non-M, non-O group*) et le groupe P [534-536]. Le groupe M se divise en 9 sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J, et K) [537], ainsi qu'au moins 58 formes recombinantes circulantes et de multiples formes recombinantes uniques (URF). En général, la variation génétique est de 25 à 35% entre les sous-

types et de 15 à 20% au sein des sous-types. Les sous-types des groupes N et O du VIH-1 ne sont pas encore clairement identifiés.

Le groupe M, qui est aujourd'hui, à l'origine de la pandémie mondiale, a une distribution quasi mondiale, alors que les groupes N et O sont limités aux individus d'origine ouest-africaine. Le groupe P a été identifié chez deux individus originaires du Cameroun. Les groupes M et N VIH-1 ont un ancêtre commun, qui est la souche SIV trouvée chez les chimpanzés (*SIVcpz ; Pan troglodytes troglodytes*) [23, 538] qui vivent principalement au Gabon, au Cameroun et en République du Congo. Cet ancêtre a probablement été transmis des chimpanzés aux pêcheurs humains par voie sanguine [539, 540]. Pour les groupes O et P, des études suggèrent qu'ils peuvent provenir de gorilles sauvages [541].

L'analyse phylogénétique du VIH-1 et des virus apparentés provenant de primates non humains suggère que trois événements de transmission indépendants, qui se sont produits au début du 20e siècle, ont engendré les groupes M, N et O du VIH-1. En particulier, la première preuve d'infection par le VIH chez l'homme a été retrouvée à Kinshasa en République démocratique du Congo, dans un échantillon de sérum et dans un échantillon de biopsie ganglionnaire stockés en 1959 et 1960, respectivement [542]. Ces échantillons ont joué un rôle déterminant dans l'estimation de l'âge de l'épidémie de VIH chez l'homme, et également le taux d'évolution de diverses lignées du VIH [543]. La date de l'ancêtre commun le plus récent (MRCA) du groupe M du VIH-1 M est estimée être dans les années 1908 (1884–1924), tandis que la date de MRCA partagé entre le groupe M et le SIVcpz est estimée à 1853 (1799–1904) [544]. On suppose donc que le transfert inter-espèces a eu lieu entre 1853 et le début des années 1900, bien qu'il y ait une certaine incertitude, étant donné la taille des intervalles de confiance.

L'apparition des sous-types du groupe M est le résultat du taux d'erreur élevé de l'enzyme RT pendant la réplication du virus et de la pression sélective exercée par le système immunitaire. Ces sous-types se sont rapidement développés en Afrique de l'Ouest et centrale et ont créé de multiples épidémies dans le monde.

L'émergence rapide de sous-types spécifiques est due aux modes et de voies de transmission spécifiques. Par exemple, l'usage de drogues par voie intraveineuse en Asie du Sud-Est au milieu des années 80 et en Europe de l'Est et en Russie au début des années 90 a conduit à une propagation rapide du CRF01_AE et du sous-type A, respectivement [545, 546]. Une expansion similaire de la transmission du sous-type B du VIH-1 s'est produite chez les hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes en Amérique du Nord et en Europe au début des années

1980. Cependant, le sous-type C du VIH-1 (le sous-type le plus dominant au monde, responsable de plus de 50% de l'ensemble des infections) semble avoir lentement émergé dans le monde au cours des 10 à 15 dernières années.

VI.1.1 - Mécanismes générant la variabilité génétique

Parmi les mécanismes les plus importants, responsables de la variabilité génétique remarquable du VIH-1, on distingue :

- **Erreurs de la transcriptase inverse et le taux de réplication élevé** : La RT est une enzyme très sujette aux erreurs [547]. Comme on l'a vu précédemment, la RT est essentielle à la réplication virale car elle permet la conversion de l'ARN génomique simple brin en ADN viral double brin, qui est ensuite intégré dans l'ADN génomique de la cellule hôte. Pour cette raison, les inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH-1 sont de puissants inhibiteurs de la réplication du VIH-1 et représentent une classe importante d'agents antirétroviraux [548].

Contrairement à d'autres ADN polymérases, la RT du VIH-1 n'a pas de fonction de réparation des erreurs de transcription et, par conséquent, sa fidélité est réduite. Le taux de mutation a été estimé à 1 pour 10 000 ou 100 000 bases par cycle de réplication.

Le VIH-1 a un taux élevé de production virale : On estime qu'environ 10^9 virions sont générés par jour chez un individu infecté. Ce renouvellement viral rapide associé à un taux de mutations élevé est un facteur principal derrière l'émergence de nouveaux variants viraux qui développent une résistance aux antirétroviraux [549] ;

- **La recombinaison génétique**: La recombinaison génétique est une autre stratégie importante par laquelle le VIH-1 génère une diversité génétique [550]. Ce processus généré pendant la transcription inverse, engendre le développement d'une résistance multiple aux médicaments de haut niveau [551, 552]. De plus, la recombinaison peut conduire à l'acquisition des mutations qui compensent la perte de la capacité répliquative.

VI.1.2 - Distribution géographique des sous-types, des CRF et des URF du VIH-1

Une enquête mondiale récente a analysé la distribution mondiale et régionale des sous-types et des formes recombinantes du VIH-1 durant la période 1990–2015 [553]. Cette étude a démontré qu'à l'échelle mondiale, le sous-type C représentait 46,6% de toutes les infections à VIH-1 en 2010-2015. Le sous-type B était responsable de 12,1% des infections, suivi du sous-type A

(10,3%), CRF02_AG (7,7%), CRF01_AE (5,3%), sous-type G (4,6%) et sous-type D (2,7%). Les sous-types F, H, J et K combinés représentaient 0,9% des infections. Les autres CRF représentaient 3,7%, rendant la proportion de l'ensemble des CRF : 16,7%. Les URF constituaient 6,1%, ce qui donnait aux recombinaux un pourcentage de 22,8 de toutes les infections globales au VIH-1.

La distribution mondiale globale des sous-types et des recombinaux du VIH-1 a changé au fil du temps. Durant la période comprise entre 2005 et 2015, l'étude a détecté une augmentation du sous-type B, et une diminution des proportions des sous-types C et G ainsi que du CRF02_AG. Tandis que les proportions des sous-types A et D sont restées stables. De plus, les proportions des CRF01_AE, d'autres CRF et URF ont augmenté, conduisant à une augmentation constante de la proportion globale de recombinaux au fil du temps.

Au niveau régional, les proportions des sous-types de VIH-1, des CRF et des URF différaient d'une région à l'autre et changeaient au fil du temps (figure 37). En Afrique centrale, la diversité était la plus grande car tous les sous-types de VIH-1 et de nombreux CRF et URF ont été trouvés, et à toutes les périodes. Au fil du temps, les diminutions des proportions des sous-types A, D, G et H ont été accompagnées par des augmentations des proportions du sous-type C, d'autres CRF et des URF.

En 2010-2015, l'Afrique centrale présentait la plus grande proportion d'URF (21,3%) de toutes les régions, contribuant à une proportion totale de recombinaux de 46,8%.

L'Afrique de l'Ouest avait le taux le plus élevé de CRF02_AG (46,2% en 2010–2015) et le sous-type G 26,8%).

En Afrique de l'Est, 53,4% de toutes les infections étaient causées par le sous-type A en 2010-2015, qui est resté globalement stable dans le temps, avec des contributions du sous-type C (14,8%), sous-type D (16,8%) et URF (12,6%).

Le sous-type C est responsable de 89 % d'infections détectées en Afrique australe, en Éthiopie et en Asie du Sud (Inde) durant la période 1990–2015. Il est donc le sous-type dominant au niveau de ces régions.

Le sous-type B était dominant en Europe occidentale et centrale et en Amérique du Nord, dans les Caraïbes, en Amérique latine et en Océanie, où il représentait au moins 75% des infections enregistrées entre 2010 et 2015. La proportion de sous-type B a généralement diminué avec le

temps en Europe occidentale et centrale, en Amérique du Nord et en Amérique latine, avec des augmentations concomitantes des CRF et des URF.

Le sous-type A était la cause de plus de 50% des infections détectées en Europe orientale et en Asie centrale, durant toutes les périodes. Le sous-type B et d'autres CRF ont été aussi trouvés dans ces régions.

Au Moyen-Orient et en Afrique du Nord, les infections enregistrées entre 2010 et 2015 ont été causées par une proportion décroissante de sous-type B et une proportion croissante d'autres CRF (principalement CRF35_AD), qui représentait 59,8% du total des infections.

Durant la même période, les infections en Asie du Sud-Est et en Asie de l'Est ont été dominées par CRF01_AE, avec une proportion globale de recombinants d'environ 80% dans chaque région.

L'Asie du Sud-Est a toujours eu la plus forte proportion d'infections à CRF01_AE de toutes les régions durant toutes les périodes. En Asie de l'Est, le CRF01_AE a augmenté de façon constante au fil du temps pour atteindre 47,2% en 2010-2015, avec la contribution des CRF07_BC et CRF08_BC.

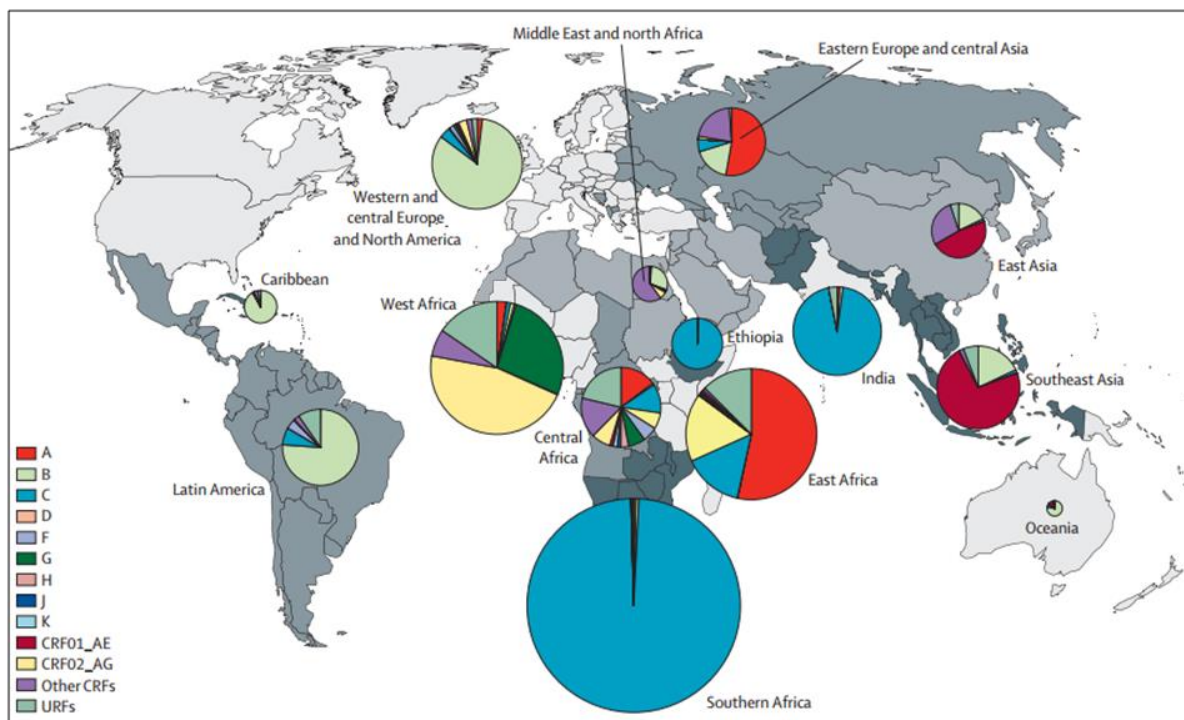


Figure 37 : Répartition régionale des différents sous-types, CRFs et URFs du VIH-1 durant la période 2010-2015 [553]

VI.1.3 - Conséquences de la variabilité génétique

La propagation mondiale et la prévalence croissante des sous-types non-B du VIH-1 pourrait avoir plusieurs implications non seulement pour le développement de la résistance, mais aussi pour la réponse au traitement antirétroviral, la transmission et la progression de la maladie.

Impact des sous-types de VIH-1 sur la résistance aux médicaments :

Il a été prouvé que le type et le degré de résistance du VIH-1 aux INTI (Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse), aux INNTI (les Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse) et aux IP (Inhibiteurs de la Protéase) varient entre les différents sous-types [554, 555]. Le développement de la résistance au nelfinavir dans les sous-types B et G représente un exemple classique de ce phénomène. Un niveau différent de résistance a été observé parmi différents sous-types. En effet, la forme recombinante CRF02_AG est plus sensible au nelfinavir et au ritonavir que les sous-types C et F. Le sous-type G est plus sensible au tipranavir et au lopinavir que les autres sous-types [556], et le sous-type C a accéléré le risque de développer une résistance au ténofovir [557].

La grande variabilité des sous-types du VIH-1 dans la réponse aux antirétroviraux peut être expliquée par la présence de certains polymorphismes qui peuvent influencer à la fois l'émergence de mutations de résistance aux médicaments et la réponse aux médicaments.

En raison du degré élevé de polymorphisme du gène de la protéase, les patients naïfs de traitement antirétroviral, infectés par des sous-types non B, présentent un certain degré de résistance aux IP. Cependant, certaines études ont montré des résultats contradictoires [558, 559].

Une recherche continue sur le rôle des polymorphismes génétiques dans le développement de la résistance aux médicaments est donc nécessaire. De plus, l'évaluation des génotypes avant et après le traitement dans le contexte des associations possibles entre les polymorphismes et résistance aux médicaments s'avère également nécessaire. Ces informations pourraient améliorer l'efficacité de certaines combinaisons de médicaments par rapport à d'autres dans le cadre de stratégies thérapeutiques de deuxième ou troisième ligne.

Il est intéressant de noter que les IP sont des médicaments avec une barrière génétique élevée. Cela signifie que la résistance aux IP nécessite généralement la présence d'un grand nombre de mutations de résistance. Pour cette raison, il est préférable d'utiliser les IP pour éviter le

développement précoce d'une résistance. Par conséquent, les différences entre les sous-types en ce qui concerne la résistance aux médicaments sont probablement plus importantes pour les INTI, les INNTI et les INI (Inhibiteurs d'Intégrase) que pour les IP.

Impact des sous-types de VIH-1 sur la réponse au traitement antirétroviral :

Les différentes études menées jusqu'à présent montrent une efficacité comparable du traitement antirétroviral sur les souches appartenant au groupe M du VIH-1, avec les traitements initiés au cours de la primo-infection ou chez des patients au stade chronique de l'infection [560-562]. La majorité de ces études n'ont pas détecté une différence significative entre les sous-types B et non B, en termes de la proportion de patients atteignant une charge virale indétectable à 24 et/ou 48 semaines ou de délai d'obtention de l'indétectabilité après un premier traitement antirétroviral.

Dans une étude, les auteurs suggèrent que l'augmentation du taux lymphocytes T CD4+ chez les patients sous traitement, infectés par une souche de sous-type non B et particulièrement de sous-type A, est plus lente par rapport aux patients infectés par des sous-types B [563]. Néanmoins, d'autres études à grande échelle sont nécessaires pour confirmer ce résultat.

Un argument indirect plaide en faveur d'une réponse au traitement équivalente en fonction des sous-types du VIH-1 : la réponse au traitement antirétroviral dans les pays où la diversité génétique est importante comme le Cameroun est similaire à celle trouvée dans les pays du Nord, utilisant les mêmes molécules [564-566].

Toutefois, même si la réponse à une première ligne de traitement semble identique quel que soit le sous-type viral, il s'avère nécessaire de surveiller les profils de résistance chez les patients en échec thérapeutique. Cela permettra de déterminer si l'évolution vers la résistance est plus rapide en raison du grand polymorphisme des virus non-B associé aux mutations sélectionnées lors de l'échec thérapeutique.

Par ailleurs, l'évaluation des performances des tests de résistance et des algorithmes d'interprétation du génotype doit prendre en compte la diversité génétique du VIH, notamment dans le contexte d'un accès élargi aux antirétroviraux pour les pays du Sud.

Impact des sous-types de VIH-1 sur la progression de la maladie et la transmission virale :

Plusieurs études analysant la progression de la maladie ont prouvé que les sous-types C et D, sont les plus agressifs parmi les sous-types non B, suivis par G, AE, AG et A, le moins agressif de tous les sous-types de VIH-1 [567-572].

Du fait que la distribution des différents sous-types de VIH-1 varie d'une région à l'autre, des facteurs de confusion potentiels, tels que des facteurs ethniques, socio-économiques et épidémiologiques entrave les comparaisons de virulence et de transmissibilité. Le rapport de Kiwanuka et al. [571] concernant ce sujet a fourni une bonne opportunité de comparer le taux de progression de la maladie associé à ces différents sous-types, grâce à la cocirculation des sous-types A et D du VIH-1, et de plusieurs recombinaisons inter-sous-types dans le district de Rakai en Ouganda.

En particulier, Kiwanuka et al. ont comparé le taux de progression chez 350 patients (après une séroconversion VIH-1), qui ont été identifiés entre 1997 et 2002 et suivis jusqu'en 2004. Cette étude a montré que la progression vers un taux de cellules CD4 \leq 250 cellules / mm³ était significativement moins fréquente chez les sujets infectés par le VIH-1 sous-type A (18.9%), comparée aux sujets infectés par le sous-type D (39.6%) ou les formes recombinantes (40%) ($P = 0,03$). Le décès lié au SIDA était également moins fréquent chez les sujets infectés par le sous-type A du VIH-1. La progression vers le stade SIDA est donc plus lente chez les sujets infectés par le VIH-1 sous-type A (8.05 ans) par rapport à ceux infectés par des sous-types non-A (D = 6.49 ans ; formes recombinantes = 5.57 ans).

Une étude européenne a montré également qu'en absence de traitement antirétroviral, le taux de diminution du nombre des cellules CD4+ était quatre fois plus élevé chez les patients infectés par le sous-type D, par rapport aux ceux infectés par les autres sous-types étudiés (A, B, C et CRF02 AG, qui présentaient des taux similaires de perte des cellules CD4+) [573].

Le sous-type D était également associé à des taux plus élevés de démence chez les individus présentant une immunosuppression avancée par rapport au sous-type A [574].

Une autre étude portant sur 3364 individus (après séroconversion) dont le sous-type est connu, a démontré un déclin plus lent des lymphocytes T CD4+ chez les individus infectés par les sous-types A, C et CRF02 par rapport à ceux infectés par le sous-type B [575]. Cependant, dans une analyse ajustée pour tenir compte des facteurs démographiques, il n'y avait pas de différence

significative entre les individus infectés par différents sous-types en ce qui concerne la vitesse de progression vers le SIDA ou la charge virale médiane [575].

Concernant la transmission, une étude de Kiwanuka et al. a montré qu'en Ouganda, les virus de sous-type A ont un taux de transmission hétérosexuelle significativement plus élevé que les virus de sous-type D [576].

La réponse immunitaire selon différents sous-types du VIH-1 :

Des études génomiques récentes ont montré que les facteurs génétiques de l'hôte jouent également un rôle crucial dans la détermination du taux de progression de l'infection au VIH-1. Les déterminants génétiques qui influencent la susceptibilité au VIH-1 et limitent la progression vers le stade SIDA varient selon les populations et les individus. En sus, plusieurs variantes génétiques qui régulent l'entrée du VIH-1 dans la cellule hôte (en particulier les corécepteurs du VIH-1 et leurs ligands), ainsi que l'immunité acquise et innée (le CMH, les récepteurs KIR, et cytokines) et d'autres (TRIM5- α et APOBEC3G) qui influencent l'issue de l'infection par le VIH-1 ont été identifiés [3, 577].

L'évaluation de l'interaction entre les facteurs génétiques du virus et de l'hôte dans le contrôle de la réplication du VIH-1, chez diverses populations humaines infectées par divers sous-types du VIH-1 est nécessaire afin de bien comprendre la pathogenèse de l'infection par le VIH-1.

Impact sur le développement du vaccin contre le VIH :

Le contrôle ultime de la pandémie de VIH-1 dépend de la mise au point d'un vaccin préventif efficace [578]. Le défi le plus important pour atteindre cet objectif, est la grande variabilité du VIH-1, reflétée par la présence de différents sous-types, de CRF et de l'évolution virale continue au sein des populations. Après l'infection, l'individu infecté par le VIH-1 développe une réponse immunitaire cellulaire et humorale contre la souche infectante. Cependant, des recherches ont prouvé que le VIH-1 est capable d'échapper aux lymphocytes T cytotoxiques CD8 + et aux anticorps neutralisants au fil du temps [579, 580].

Sur la base du succès des vaccins antérieurs contre de nombreuses maladies infectieuses, dont beaucoup agissent en induisant des anticorps neutralisants, un vaccin à base d'Env qui déclenche des bNAb (*broadly neutralizing antibodies*) capables de prévenir l'infection par le VIH-1, serait probablement l'arme la plus efficace pour contrôler la pandémie mondiale.

Normalement, un vaccin efficace contre le VIH-1 devrait induire une réponse immunitaire humorale et cellulaire, inhibant à la fois l'infection des individus exposés non infectés et réduisant la réplication et la charge virale chez les individus infectés. Jusqu'à présent, plus de 250 essais ont été menés pour tester des vaccins contre le VIH-1, dont six seulement ont atteint une efficacité clinique.

Dans deux grands essais de phase 3 d'une forme monomérique de la gp120, menés aux États-Unis [581] et en Thaïlande [582], la protéine n'a pas réussi à protéger les sujets sains de l'infection par le VIH. Certaines approches actuelles de la conception d'un immunogène neutralisant consistent à imiter les trimères d'enveloppe gp120-gp41 sur la surface du virion, de produire des molécules d'enveloppe avec une expression améliorée d'épitopes neutralisants, d'éliminer ou de masquer les régions variables et exposer des épitopes conservés pour focaliser la réponse immunitaire.

Le champ des vaccins a été orienté également vers les vaccins stimulant l'immunité cellulaire T. En 2004, l'essai STEP a été mené pour évaluer une nouvelle approche vaccinale : Adénovirus de type 5 défectif pour la réplication (rAd5) exprimant communément les gènes *gag* et *pol* du sous-type B, le gène *env* des sous-types A, B et C et le gène *nef* du sous-type B a été testé dans une population à haut risque [583-585]. Aucune protection contre l'infection ou la progression de la maladie n'a été détectée.

L'essai RV144 a été mené en Thaïlande et a recruté plus de 16 000 hommes et femmes présentant un risque accru d'infection [586, 587]. Cet essai a combiné 2 vaccins : un vecteur viral canarypox (ALVAC-HIV) recombinant non répliquatif exprimant le gène *env* du CRF01-AE et les gènes *gag* et *pol* du sous-type B. Le rappel était constitué du virus recombinant contenant la sous unité gp120 des sous types B et CRF01_AE (AIDSVAX B/E). Une efficacité modeste de 31,2% dans la protection contre l'infection a été observée à 42 mois de suivi, bien que l'effet du vaccin n'ait été que transitoire [586].



Chapitre II : L'infection au VIH-1/SIDA

I - MODALITES DE TRANSMISSION

Le VIH-1 est transmis par contact sexuel à travers les surfaces muqueuses, par l'exposition mère-enfant et par voie percutanée. La contamination peut donc avoir lieu via les fluides corporels tels que le sang, le sperme, le liquide pré-séminal, les liquides rectaux, les liquides vaginaux et le lait maternel. Pour des raisons encore mal comprises, les souches R5 du VIH-1 sont préférentiellement transmises par toutes les voies.

La transmission sexuelle reste la principale voie de transmission du VIH, représentant 80% des nouvelles infections dans le monde [588, 589]. Le reste est attribué aux hommes qui ont des relations sexuelles avec d'autres hommes (HSH), à l'infection materno-fœtale et à l'utilisation de drogues injectables. Il a été démontré dans les études analysant la transmission hétérosexuelle que la transmission homme-femme est 2 à 3 fois plus élevée que la transmission femme-homme [590]. Le sperme est donc le principal vecteur de la dissémination du VIH.

Les facteurs socio-économiques peuvent également influencer d'une manière indirecte la transmission du VIH-1. Une étude réalisée aux États-Unis, a suggéré que le risque de contracter l'infection par le VIH-1 est associé surtout au «réseau sexuel» de l'individu [591]. À l'échelle mondiale, les estimations de la transmission du VIH-1 par acte sexuel varient considérablement entre les pays à revenu élevé, et les pays à faible revenu [592, 593]. Cette différence peut refléter en partie la fréquence relative des couples sérodiscordants dans les deux cas.

La charge virale chez le partenaire émetteur joue aussi un rôle majeur dans la détermination du risque de transmission du VIH-1 d'un individu à l'autre. Bien que la charge virale affecte probablement tous les modes de transmission, elle a été mieux caractérisée dans les couples discordants pour le VIH-1 [594].

Le stade clinique de l'infection chez le partenaire infecté transmetteur peut également influencer la transmission. Le risque d'infection provenant d'individus atteints d'une infection aiguë est plus élevé que celui d'une infection installée [595].

La transmission du VIH-1 peut encore être influencée par d'autres facteurs :

- Les maladies sexuellement transmissibles, en particulier celles qui entraînent une inflammation génitale et des ulcères, qui peuvent augmenter l'excrétion du VIH dans le tractus génital et peuvent multiplier par 2 à 11 la sensibilité à l'infection [596] ;

- La grossesse, au cours de laquelle le risque d'acquisition du VIH devient important [597] ;
- La circoncision, qui, dans une série d'essais cliniques, a réduit de 60% le risque de transmission chez le partenaire masculin [598-602].

II - EPIDEMIOLOGIE : SITUATION ACTUELLE

II.1 - Au niveau mondial

Le VIH/SIDA reste l'un des principaux problèmes de santé publique dans le monde, particulièrement dans les pays à revenu faible ou intermédiaire. Le rapport de l'ONUSIDA [1] de 2020 estime que 38,0 millions [31,6 millions–44,5 millions] de personnes vivaient avec le VIH dans le monde en 2019. L'Afrique de l'Est et du Sud présentait le taux le plus élevé avec 20,7 millions [18,4 millions – 23,0 millions] suivi par l'Asie et le Pacifique avec 5,8 millions [4,3 millions – 7,2 millions] de personnes vivant avec le VIH (PVVIH). Le rapport a estimé également qu'en 2019, 1,7 millions [1,2 millions–2,2 millions] de personnes sont devenues nouvellement infectées par le VIH dans le monde. Cela signifie une baisse de 23% des nouvelles infections à VIH depuis 2010. Il s'agit du plus faible nombre annuel de nouvelles infections depuis 1989. Cependant, les progrès en matière de prévention de la transmission du VIH restent bien trop lents, car le nombre total estimé de nouvelles infections en 2019 était plus de trois fois supérieur au seuil de 500 000 fixé pour 2020. Actuellement, plusieurs pays font des progrès remarquables, mais beaucoup d'autres n'adoptent pas de méthodes éprouvées pour prévenir l'infection par le VIH.

À l'échelle mondiale, le nombre annuel de nouvelles infections diminue plus rapidement chez les femmes et les filles (une diminution de 27% depuis 2010) que chez les hommes et les garçons (une diminution de 18%). Il y a eu moins de nouvelles infections dans le monde en 2019 chez les femmes et les filles (48% du total des infections) que chez les hommes et les garçons (52%). Les enfants (âgés de 0 à 14 ans) représentaient 9% des nouvelles infections en 2019 (84% des infections infantiles se produisant en Afrique subsaharienne) [1].

La diminution mondiale des nouvelles infections est due à des réductions substantielles des nouvelles infections en Afrique orientale et australe (une réduction de 38% depuis 2010).

Des réductions ont également été détectées dans les Caraïbes (29%), en Afrique occidentale et centrale (25%), en Europe occidentale et centrale et en Amérique du Nord (15%) et en Asie et

Pacifique (12%). En revanche, l'épidémie a continué de croître en Europe de l'Est et en Asie centrale, avec une augmentation des nouvelles infections à VIH (72% entre 2010 et 2019). Des augmentations ont également été enregistrées au Moyen-Orient et en Afrique du Nord (22%) et en Amérique latine (21%).

La majorité (62%) des nouvelles infections au VIH chez les adultes dans le monde en 2019 concernaient des populations-clés et leurs partenaires sexuels. Ces populations, qui comprennent les professionnels du sexe, les personnes qui s'injectent des drogues, les prisonniers, les transgenres, les homosexuels et les autres hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes, constituent de petites proportions de la population générale, mais elles courent un risque élevé de contracter le VIH en raison de la discrimination et de l'exclusion sociale.

Parmi les 38 millions de PVVIH, 26,0 millions [25,1 millions – 26,2 millions] bénéficiaient de la thérapie antirétrovirale (fin juin 2020).

Le nombre de personnes décédées de maladies liées au SIDA a été réduit de plus de 60 % depuis le pic de 2004 en 2019 et de 39% depuis 2010 : En 2019, 690 000 [500 000–970 000] sont décédées dans le monde à cause du SIDA, contre 1,7 millions [1,2 millions - 2,4 millions] en 2004 et 1,1 millions [830 000 – 1.6 millions] en 2010 [1].

II.2 - Au Maroc

Selon le ministère de la santé, la prévalence du VIH au Maroc reste faible et stable dans la population générale (environ 0,08%). L'épidémie est plus concentrée chez les populations clés. Deux tiers des nouvelles infections se produisent parmi les populations clés les plus exposées au risque d'infection et leurs partenaires. A noter que la prévalence du VIH est estimée à 1,3% chez les prostituées, 4,5% pour les homosexuels et 7,1% chez les consommateurs de drogues injectables. Des prévalences élevées ont aussi été enregistrées parmi les détenus (0,5 à 1%), les ouvrières saisonnières (0,4 à 1%) et les migrants (3%) [2].

En fin 2020, le nombre des PVVIH au Maroc est estimé à 22 000 [18 000–29 000], dont 9100 [7500–12 000] femmes (41%). Le nombre d'enfants de moins de 15 ans est estimé à 530 [<500–710] [1].

Les nouvelles infections VIH ont connu une diminution de 1200 [920–1700] en 2010 à 740 [540–1100] en 2020, soit une baisse de 39% [1].

Les décès, ont connu une baisse de 50% passant de 530 [$<500-810$] en 2010 à <500 [$<200-500$] en 2020. Concernant le nombre total de PVVIH notifiées entre 1986 et 2019, il est à 17.000 en fin 2019. Le nombre de cas notifiés en 2019 était de 1385 [1].

La tranche d'âge la plus touchée se situe entre 15 et 44 ans. Les femmes représentent 50% du total cumulé des cas signalés. La transmission de l'infection à VIH est principalement sexuelle (90%). La transmission verticale (mère-enfant) représente 3% et par usage de drogues injectables 2%. Les régions les plus touchées par l'épidémie au Maroc avec 65% des cas notifiés de tout le pays sont : la région de Souss-Massa (25%), la région de Marrakech-Safi (21%) et la région de Casablanca (20%). La grande majorité (90%) des PVVIH proviennent des zones urbaines [2].

En ce qui concerne le diagnostic et la prise en charge, le nombre de PVVIH qui a bénéficié du traitement antirétroviral est passé de 3.205 à 15 000 entre 2010 et 2019, ce qui signifie que la couverture a augmenté de 19 à 70% en 2019.

Grace à la prévention de la transmission mère-enfant, la couverture des femmes enceintes vivant avec le VIH a augmenté de 48% en 2010 à 73% en 2019. Le taux de ce mode de transmission est en baisse constante. (de 20% en 2008 à 11.77% en 2019) [1].

III - PHYSIOPATHOLOGIE

III.1 - Progression de l'infection in vivo

L'infection au VIH-1 est une maladie chronique caractérisée par un déclin progressif des lymphocytes T $CD4^+$, une activation immunitaire chronique et une perte ultérieure de compétence immunologique, aboutissant finalement au stade SIDA. En moyenne, la durée de l'évolution naturelle de l'infection par le VIH-1 prend de 8 à 10 ans avant que les manifestations cliniques du SIDA ne se produisent. Toutefois, cette durée varie d'un patient à un autre. Dans certains cas le SIDA peut se manifester 2 à 3 ans après l'infection, alors que pour certains, l'apparition du SIDA peut être retardée au-delà de 10 ans.

En l'absence de traitement antirétroviral, la progression de la maladie se déroule en trois phases : une primo-infection, une infection chronique asymptomatique et une infection symptomatique ou phase SIDA (figure 38). Le rythme de progression d'une phase à l'autre est très variable.

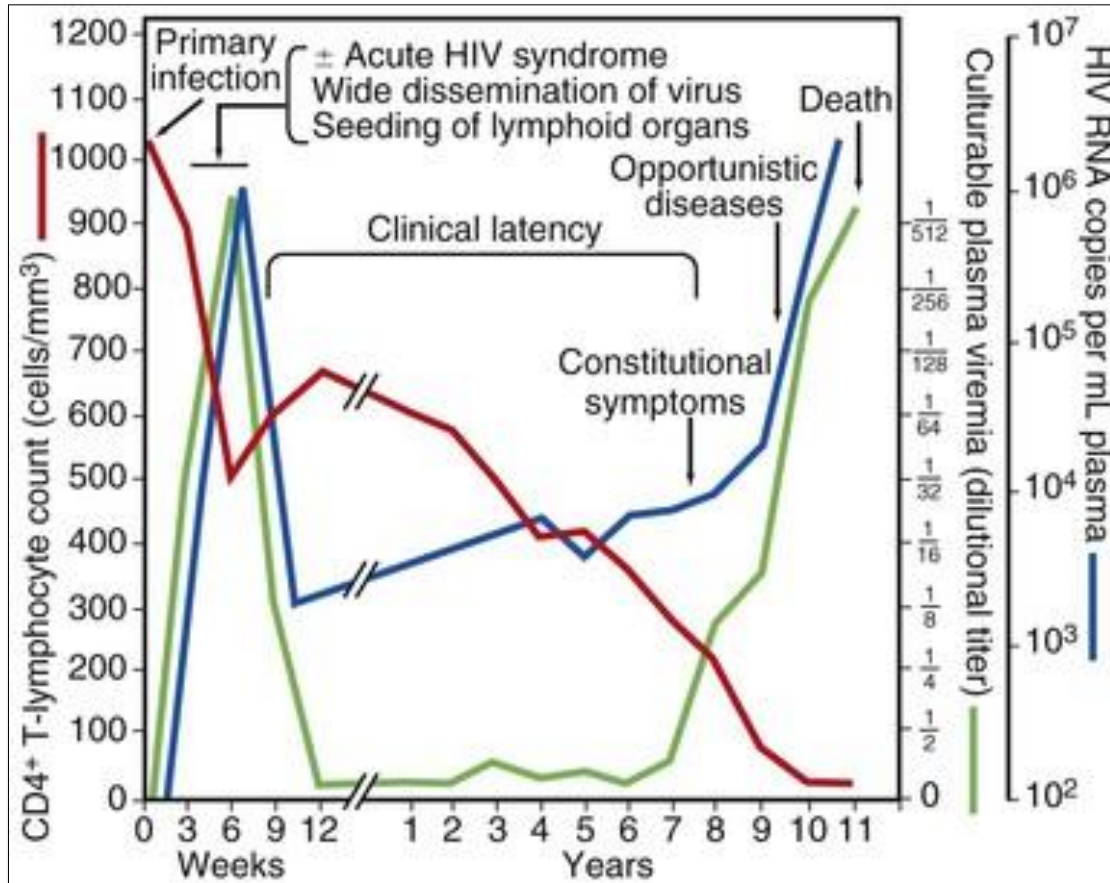


Figure 38 : Histoire naturelle de l'infection à VIH en l'absence de traitement chez un patient hypothétique [603]

La primo-infection :

La primo-infection peut être définie comme durée entre l'acquisition du VIH-1 et la séroconversion. Cette phase dure de 2 à 6 semaines après l'exposition et l'infection, jusqu'à ce que les anticorps anti-VIH-1 soient détectables. Au cours de cette phase, le VIH-1 se réplique rapidement dans les ganglions lymphatiques régionaux. Il en résulte une élévation rapide du taux d'ARN plasmatique du VIH-1 à des niveaux supérieurs à un million de copies / mL, tandis qu'une déplétion massive des lymphocytes T CD4+ se produit. Cette phase s'accompagne d'une dissémination du VIH-1 vers les cellules d'autres tissus lymphoïdes [604].

Les premières manifestations cliniques de l'infection sont généralement non spécifiques et apparentées à un syndrome pseudo-grippal. Les symptômes principaux, y compris la fièvre, les arthralgies, les myalgies, et la fatigue, sont courants. Des troubles gastro-intestinaux, (y compris

des douleurs abdominales et de la diarrhée), et des manifestations de dysfonctionnement neurologique, telles que méningisme et convulsions, peuvent également survenir [605].

L'examen clinique peut être normal sans particularité ou révéler une lymphadénopathie régionale ou généralisée, une éruption maculopapuleuse, une hépatomégalie sensible ou des signes d'irritation méningée.

Le diagnostic différentiel comprend la mononucléose infectieuse, CMV et d'autres infections virales systémiques, et la syphilis secondaire.

L'infection chronique ou la phase asymptomatique :

La phase asymptomatique, également appelée phase de latence clinique, est la deuxième étape de la progression de l'infection au VIH-1. Au cours de cette étape, le virus continue de se multiplier dans les tissus lymphoïdes et le système immunitaire s'affaiblit lentement suite à une diminution du taux des lymphocytes T CD4+ de l'ordre de 60 à 100 cellules/an [606]. Toutefois, le patient ne présente aucun symptôme.

En l'absence de traitement antirétroviral, certains patients peuvent passer 10 ans ou plus sans symptômes. D'autres peuvent présenter des symptômes et une détérioration de la fonction immunitaire quelques années après la primo-infection [607].

Même si le sujet est toujours immunocompétent, certaines pathologies peuvent avoir lieu au fur et à mesure de la déplétion en CD4+. On cite par exemple :

- Le syndrome de lymphadénopathie persistante ;
- La candidose buccale ;
- Les infections ORL ;
- Le zona ;
- La tuberculose.

Ces pathologies sont plus fréquentes chez les patients dont le système immunitaire est altéré.

L'infection symptomatique ou phase SIDA :

Cette phase est caractérisée par une diminution du taux des cellules T CD4+ qui devient inférieur à 200 cellules/ μ L, une augmentation rapide de la charge virale, et l'apparition des infections opportunistes telles que la pneumonie à *Pneumocystis carinii*. Des cancers associés

au VIH-1, comme le sarcome de Kaposi ou le lymphome de Burkitt peuvent également survenir, ce qui provoque finalement la mort du patient [608].

Actuellement, il n'existe pas de remède ni de vaccin efficace contre le SIDA. Néanmoins, la thérapie antirétrovirale hautement active (HAART) a modifié l'histoire naturelle de l'infection par le VIH-1, et a augmenté l'espérance de vie du patient infecté. Cette thérapie permet la suppression virale et l'augmentation du taux de lymphocytes T CD4+. De plus, le traitement antiviral est également associé à une régulation à la baisse de l'activation immunitaire, et à une diminution du risque d'apparition des infections opportunistes et des tumeurs liées au VIH-1 [609].

III.2 - Classification clinique de l'infection

L'infection par le VIH est une infection chronique qui passe par différentes phases, jusqu'au stade de l'immunodépression avancée. Ces différents stades cliniques peuvent être corrélés au taux des cellules CD4+, à la charge virale et à l'apparition de certaines pathologies.

Depuis 1981, plusieurs classifications de l'infection par le VIH ont été adoptées, pour déterminer l'état clinique et même immuno-clinique des patients infectés par le VIH-1. En fait, ces classifications reposent principalement sur des critères cliniques, ainsi que sur le degré d'immunodépression indiqué par la numération des cellules CD4+. La classification varie selon qu'il s'agisse d'un adulte, d'un adolescent ou d'un enfant.

Les principales classifications, actuellement utilisées ont été proposées par :

- Les *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC);
- L'Organisation mondiale de la Santé (OMS).

En 1993, les CDC d'Atlanta aux États-Unis ont présenté une classification modifiée de l'infection par le VIH, pour les adultes et adolescents et en 1994 pour les enfants de moins de 13 ans. Cette classification est à la fois clinique et biologique, car elle est basée sur la numération des lymphocytes T CD4+ ainsi que sur les manifestations cliniques de l'histoire naturelle de l'infection.

Par conséquent, l'infection par le VIH est donc classée en 3 catégories de manifestations cliniques A, B, et C, qui sont ensuite subdivisées en 3 catégories selon le taux des lymphocytes T CD4+ (tableau I). La catégorie A correspond à la primo-infection et à la période

asymptomatique. La catégorie B correspond aux infections mineures. La catégorie C définit le SIDA caractérisé par des infections opportunistes, des tumeurs liées au VIH et autres pathologies. Cependant, la définition du stade SIDA varie en fonction de la classification adoptée par le pays. Aux Etats-Unis, le stade SIDA correspond à l'entrée du patient dans une catégorie A3, B3 ou C, tandis qu'en Europe, seule la catégorie C est considérée comme répondant à la définition du SIDA.

Tableau I : Classification de l'infection par le VIH chez les adultes et chez les adolescents (1993) [610]

Catégories cliniques			
Nombre de lymphocytes T CD4+	A <i>Asymptomatique Primo-infection Lymphadénopathie généralisée persistante</i>	B <i>Symptomatique (sans critères A ou C)</i>	C <i>SIDA</i>
500/mm ³	A1	B1	C1
200 à 499/mm ³	A2	B2	C2
< 200/mm ³	A3	B3	C3

Cette classification des CDC est devenue la référence internationale. Le patient ne peut pas appartenir à deux stades en même temps et ne peut jamais revenir à un stade précoce de la maladie.

L'OMS a proposé une classification différente, qui comporte quatre stades cliniques (tableau II) :

- Stade I : asymptomatique ou lymphadénopathie ;
- Stade II : infection modérée ;
- Stade III : infection avancée,
- Stade IV : infection sévère.

Tableau II : Classification de l'infection à VIH chez l'adulte et l'adolescent (OMS) [611]

Stades cliniques	Critères
I	<ul style="list-style-type: none"> - Asymptomatique / Lymphadénopathie généralisée persistante, - Et/ou degré d'activité 1 : patient asymptomatique, activité normale
II	<ul style="list-style-type: none"> - Perte de poids modérée inexpliquée (< 10 % du poids estimé ou mesuré) / Infections récurrentes de voies respiratoires supérieures (sinusite, amygdalite, otite moyenne et pharyngite) / Zona/Chéilite angulaire / Ulcérations buccales récurrentes / Prurigo / Dermite séborrhéique / Infections fongiques de l'ongle - Et/ou degré d'activité 2 : patient symptomatique, activité normale
III	<ul style="list-style-type: none"> - Perte de poids supérieure à 10 % du poids corporel / Diarrhée chronique inexpliquée depuis plus d'un mois / Fièvre persistante inexpliquée (plus de 37,5 °C, intermittente ou constante, depuis plus d'un mois)/ Candidose buccale persistante/ Leucoplasie chevelue de la cavité buccale / Tuberculose pulmonaire (actuelle)/ Infections bactériennes graves (par exemple pneumonie, empyème, pyomyosite, infection ostéoarticulaire, méningite ou bactériémie)/ Anémie (< 8 g/dl), neutropénie (< 0,5 × 10⁹ par litre) et/ou thrombocytopenie chronique (< 50 × 10⁹ par litre) inexpliquées, - Et/ou grade 3 de l'échelle d'activité : alitement < 50% de la journée au cours du dernier mois.
IV	<ul style="list-style-type: none"> - Syndrome cachectique dû au VIH / Pneumonie à Pneumocystis / Pneumonie bactérienne récurrente - herpès cutanéomuqueux > 1mois ou viscéral / candidose œsophage, trachée, bronche poumon / mycobactériose atypique généralisée / septicémie à salmonelles non typhiques / tuberculose extrapulmonaire / lymphome / Sarcome de Kaposi / encéphalite à VIH, - Et/ou degré d'activité 4 : patient alité plus de la moitié de la journée pendant le dernier mois.

IV - DIAGNOSTIC

Le diagnostic de l'infection à VIH contribue à évaluer la progression de la maladie, à surveiller l'efficacité de la thérapie antirétrovirale (TAR) et à prévenir et contrôler le VIH / SIDA [612]. La détection précoce de l'infection à VIH est associée à une diminution des comportements à risque, à une réduction de la transmission du VIH et à une amélioration de la survie liée à la prise en charge précoce des patients.

IV.1 - Les marqueurs biologiques de l'infection par le VIH-1

Plusieurs marqueurs sanguins immunologiques et virologiques peuvent être surveillés au cours de l'infection par le VIH. Ces marqueurs semblent très cohérents entre les différents individus dans un ordre chronologique, et permettent de classer l'infection à VIH en étapes distinctes, y compris la période d'éclipse, la période de fenêtre de séroconversion, l'infection aiguë et l'infection établie (figure 39) [613, 614].

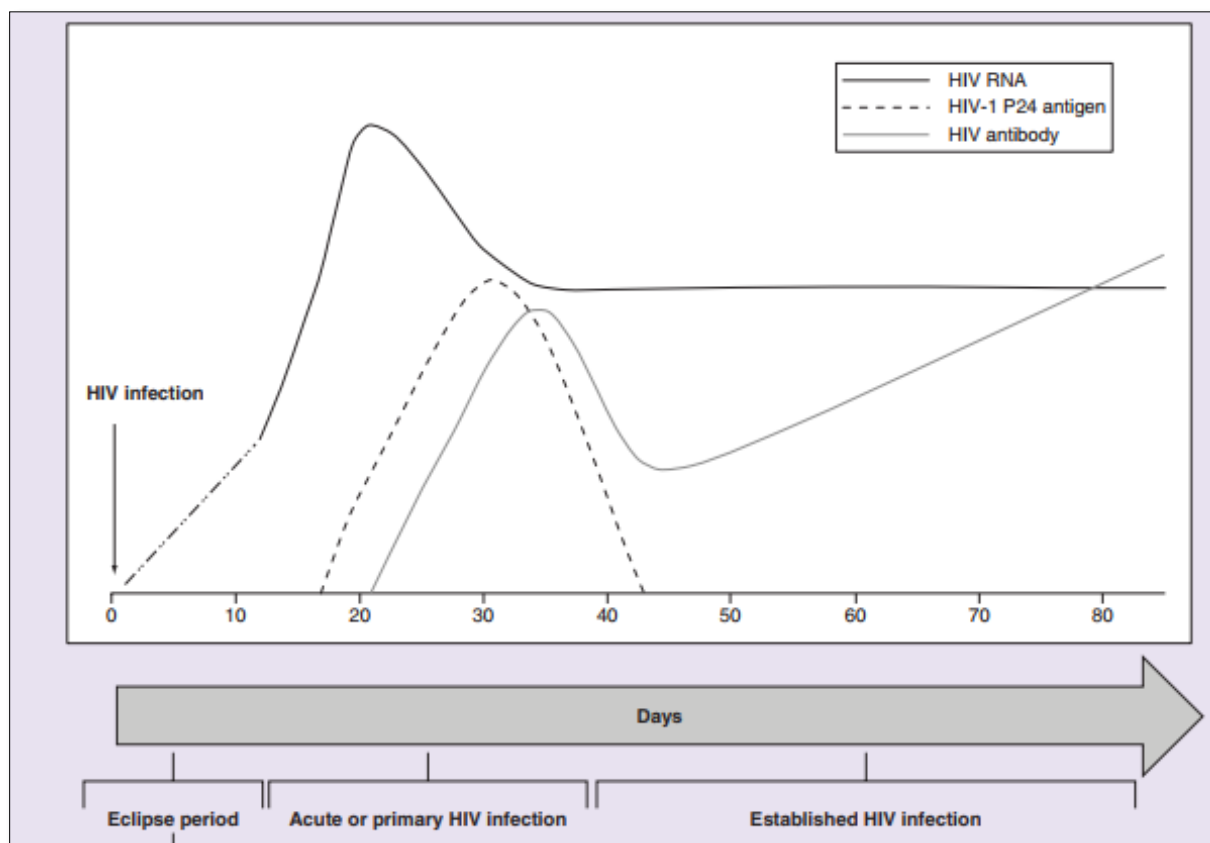


Figure 39 : Cinétique d'apparition des marqueurs biologiques de l'infection à VIH-1. Adapté de [615]

Peu de temps après l'exposition au VIH-1, aucun marqueur viral n'est systématiquement détectable dans le plasma, mais de faibles niveaux d'ARN du VIH-1 peuvent être trouvés par intermittence. Cette période est appelée la phase d'éclipse. Environ 10 jours après l'infection, l'ARN du VIH-1 devient détectable par un test à base d'acide nucléique dans le plasma et les quantités atteignent des niveaux très élevés, qui diminuent ensuite rapidement jusqu'à l'atteinte d'un point de consigne, un niveau stable qui peut persister pendant des années.

Ce niveau stable d'ARN du VIH-1 représente un équilibre entre le virus et les réponses immunitaires de l'hôte et est un indicateur important de la progression ultérieure de la maladie et de la transmission potentielle du VIH-1 [616]. Il a été montré que le taux plasmatique élevé d'ARN du VIH-1 est associé à une progression plus rapide vers le SIDA [617]. Le niveau d'ARN du VIH-1 dans le plasma peut être un outil clinique utile pour déterminer le moment de l'initiation du traitement antirétroviral chez les patients séropositifs pour le VIH-1.

L'antigène p24 du VIH-1 est exprimé et les quantités atteignent des niveaux qui peuvent être mesurés par des dosages immunologiques de quatrième génération dans les 17 jours suivant

l'infection [614]. En raison des titres élevés d'antigène p24 présents dans les sérums des patients gravement infectés pendant l'intervalle qui précède la séroconversion, le test de détection de l'antigène p24 peut être utilisé pour diagnostiquer l'infection primaire par le VIH-1 [615].

L'intervalle de temps entre l'infection par le VIH et la première détection d'anticorps est appelé période de fenêtre sérologique. La détection des anticorps spécifiques du VIH indique la fin de la fenêtre et l'individu est dit séropositif. La longueur de cette période dépend de la conception et de la sensibilité du dosage immunologique. L'expression des anticorps IgM peut être détectée par des dosages immunologiques dans les 10 à 13 jours suivant l'apparition de l'ARN viral, 3 à 5 jours après la détection de l'antigène p24 et un pic entre la 4^{ème} et la 5^{ème} semaine [614, 618].

Par la suite, l'émergence des anticorps IgG se produit environ 3 à 4 semaines après l'infection et persiste tout au long de l'infection par le VIH. Néanmoins, les réponses immunitaires dépendent fortement de la capacité du système immunitaire de l'individu à produire des anticorps. Environ 50% des patients dans les 3 à 4 semaines et environ 100% d'entre eux dans les 6 mois ont des anticorps détectables, bien que certains rapports indiquent qu'un petit pourcentage de patients peut nécessiter jusqu'à 6 mois pour l'apparition d'anticorps [615].

IV.2 - Tests de dépistage

Le diagnostic initial de l'infection par les VIH-1 et VIH-2 repose sur une méthode sérologique indirecte fondée sur la détection des anticorps dirigés contre les antigènes viraux grâce à un test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) qui reste la méthode la plus courante.

La détection du virus ou de ces composants par une méthode directe, peut être réalisée soit par la mise en évidence des antigènes viraux, par la détection du génome viral ou encore par multiplication virale en culture cellulaire. En cas de l'échec du diagnostic indirect, le diagnostic direct est indiqué, notamment lors de la fenêtre sérologique de la primo-infection. Le schéma d'un dépistage biologique du VIH se déroule généralement en trois étapes :

- Un test de dépistage ELISA combiné ;
- Si positif : un test de confirmation VIH-1 et VIH-2 (western-blot ou immuno-blot) ;
- Si positif : un test de dépistage sur un second prélèvement (une deuxième prise de sang) pour éviter les erreurs d'identification de la personne.

IV.2.1 - Détection des anticorps

Le test ELISA :

Les tests de dépistage des anticorps anti-VIH sont utilisés pour le diagnostic primaire suivi d'un test de confirmation dans le cas d'un résultat réactif dans le test de dépistage. En plus du test ELISA ou des variantes de ce type de test, des tests d'agglutination des particules sont utilisés. Les tests ELISA approuvés contiennent des antigènes du groupe M du VIH-1. En fonction de la réponse immunitaire et du titre d'anticorps, une infection peut être détectée sérologiquement après 3 semaines, mais généralement après 4 à 5 semaines [619]. Dans de rares cas, les personnes infectées par le VIH avec une immunosuppression complète peuvent être séronégatives pour les anticorps anti-VIH, mais elles présentent des symptômes cliniques typiques du VIH et des titres viraux mesurables dans le sang.

Le test rapide d'orientation diagnostique (TROD) :

Ces tests unitaires dits rapides permettent de détecter les anticorps anti-VIH 1 et 2 dans le sang total, le sérum ou le plasma. Ces tests sont faciles à réaliser, mais les résultats peuvent être lus subjectivement. Ces tests sont utilisés dans des situations d'urgence [620], telles que :

- Accident professionnel d'exposition au sang ;
- Accident d'exposition sexuelle ;
- Accouchement ;
- Urgence diagnostique.

Toutefois, ces tests n'offrent pas le même niveau de sensibilité que les tests ELISA au cours de la primo-infection : ils risquent alors d'être négatifs et donc de retarder voire d'exclure le diagnostic d'infection à VIH.

En cas de résultat positif, la confirmation par un test de dépistage ELISA combiné puis par Western-blot reste indispensable pour affirmer le diagnostic.

Test de confirmation (Western blot, Immunoblot):

Étant donné que les tests ELISA ont également été développés pour la détection de faibles taux d'anticorps avec la sensibilité la plus élevée, des résultats faussement positifs se produisent, en particulier lorsque des complexes immuns sont présents dans le sérum, par exemple, si la personne est infectée par d'autres agents pathogènes au moment de la collecte du sérum, ou a

été récemment vaccinée ou a eu une forte stimulation du système immunitaire. En outre, des résultats faussement positifs ont été signalés pour les personnes souffrant de maladies auto-immunes ou d'allergies et pour les femmes enceintes.

Le test Immunoblot / Western blot a été introduit en Allemagne en tant que tests sérologiques de confirmation, mais ces systèmes de test ont une sensibilité plus faible dans la phase précoce de l'infection par le VIH que les tests de dépistage d'anticorps ou les systèmes de détection d'antigène p24 [621].

Il est intéressant de noter que jusqu'à 15% des sérums non infectés auront une certaine réactivité sur le Western blot, généralement aux protéines Gag. Un résultat positif a été défini comme une réactivité à deux ou plusieurs des éléments suivants: p24, p41, gp120 / 160 [622].

La réactivité à d'autres bandes est interprétée comme un résultat indéterminé. Un résultat négatif est défini comme une absence de réactivité à l'un des antigènes. Les tests positifs doivent être répétés sur un deuxième échantillon pour confirmer l'infection chez un patient particulier ou être confirmés par un test de charge virale positif [622].

IV.2.2 - Détection de virus

Détection de l'antigène viral p24 :

La détection de l'antigène p24 est réalisée à l'aide d'une combinaison d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux, suivant le principe de la technique ELISA sandwich. Ces dosages permettent la détection du VIH p24 avec une sensibilité de 10 pg/mL (correspondant à environ 105 particules virales / mL de sang). Les tests de détection de l'antigène p24 ou les systèmes de test combinés antigène / anticorps (appelés tests de 4^e génération) sont approuvés et disponibles dans le commerce [619].

Environ 60 à 80% des séroconversions se déroulent sans que l'antigène p24 soit détectable. Au cours de l'infection, le p24 libre ou lié à des particules peut être trouvé dans le plasma. Chez certains patients atteints du SIDA, des niveaux élevés d'antigène p24 peuvent être observés. Un résultat positif au test de l'antigène p24 doit également être confirmé [621].

Détection des acides nucléiques viraux :

L'amplification génique de type PCR ou l'amplification de type isotherme NASBA (*Nucleic Acid Sequence-based Amplification*) permettent de détecter l'ADN proviral (intégré dans le

génomique cellulaire) après l'étape de transcription inverse de l'ARN génomique viral. Les kits commercialisés actuellement sont « Abbott Molecular Diagnostic », « Roche Diagnostics » et « bioMérieux ».

Une technique de biologie moléculaire appelée ADN branché (bdNA) peut également être utilisée pour déterminer la charge virale [623]. Cette technique n'implique pas d'amplification génique, elle est basée sur l'utilisation de sondes ramifiées. Elle repose sur un branchement successif de sondes, ce qui multiplie les signaux émis et facilite la détection d'une séquence cible. Le signal émis est directement proportionnel à la quantité de la cible génique. La sensibilité de cette technique est proche de celle d'amplification génique, et ses avantages sont une meilleure reproductibilité et une moindre sensibilité à la variabilité génétique des virus.

L'amplification génique et l'hybridation amplifiée permettent la détection de l'ARN viral plasmatique ou de l'ADN proviral cellulaire. Il existe des tests de PCR pour la détection qualitative de l'ADN du VIH-1 commercialisés par Roche Diagnostics, et par Biocentric depuis janvier 2008.

La technique de l'ANRS basée sur l'amplification du gène du LTR par RT-PCR en temps réel, est un test académique de référence qui permet la détection de nombreux génotypes de VIH-1 et qui utilise une référence de quantification internationale stable. Un test ANRS-ADN du VIH-1 a aussi été développé. Ces tests « domestiques » peuvent être réalisés à l'aide de différents types de thermocycleurs de PCR en temps réel.

Isolement du VIH en culture :

Isoler le virus à partir du sang d'une personne infectée est une méthode longue et coûteuse qui nécessite un laboratoire de confinement L3 hautement sécurisé. L'isolement est réalisé directement à partir de cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) ou du plasma par mise en culture des échantillons en présence de cellules mononucléées du sang d'un donneur sain, qui servent de support pour la multiplication virale. La multiplication virale est mise en évidence par dosage dans le milieu de culture de l'antigène p24. Actuellement, cette méthode peut être intéressante lorsque les techniques de biologie moléculaire est incapable d'identifier des variants ou des recombinants [620].

V - SUIVI DES PATIENTS

Outre la surveillance clinique, le suivi des patients repose également sur une évaluation régulière des indicateurs pronostiques biologiques. Cette surveillance biologique joue un rôle essentiel dans la prise en charge de l'infection à VIH-1 car il permet de :

- Déterminer le moment propice pour initier un traitement antirétroviral ou prévenir certaines infections opportunistes chez le patient non traité ;
- Vérifier l'efficacité (en mesurant la charge virale et le nombre de cellules T CD4+) et la tolérance (paramètres biochimiques et hématologiques) du traitement chez le patient traité.

Bilan de surveillance :

- **En l'absence de traitement**

Un bilan comportant une numération formule sanguine (NFS), plaquettes, un typage lymphocytaire CD4/CD8 et une mesure de la charge virale plasmatique est réalisé tous les 6 mois si les cellules T CD4+ sont supérieures à 500/mm³, et tous les 3 mois s'ils sont compris entre 350 et 500/mm³ ou si la charge virale plasmatique est élevée (supérieure à 20 000 copies/mL).

Il est recommandé de surveiller systématiquement chaque année les sérologies de la toxoplasmose et du CMV qui étaient auparavant négatives. Bien entendu, le contrôle des sérologies des hépatites B et C et de la syphilis, sont nécessaires dans le cas d'une exposition récente ou de manifestations cliniques et/ou biologiques compatibles avec une infection [624].

Indication d'un traitement antirétroviral : Une indication pour l'initiation du traitement doit inclure les données cliniques, le taux et l'évolution des lymphocytes T CD4+, ainsi que le niveau et l'évolution de la charge virale.

Les patients symptomatiques (infection opportuniste, autre affection de la catégorie C ou symptômes marqués ou récidivants de la catégorie B de la classification CDC 1993) et les patients asymptomatiques avec un nombre des lymphocytes T CD4+ inférieurs à 200 /mm³ (ou un pourcentage de lymphocytes T CD4+ inférieur à 15 % des lymphocytes totaux), doivent nécessairement commencer le traitement antirétroviral [624].

Le traitement est également recommandé chez des patients ayant un nombre de lymphocytes T CD4+ compris entre 350 et 500/mm³, en particulier si la charge virale plasmatique est supérieure à 100 000 copies/mL. Par ailleurs, le traitement est généralement recommandé chez les couples séropositifs pour le VIH, les femmes séropositives enceintes ou qui allaitent, les personnes coinfectées par l'hépatite B et pour tous les enfants séropositifs de moins de 5 ans, quel que soit l'état de la maladie.

- **Sous traitement antirétroviral**

Surveillance de l'efficacité du traitement : cellules T CD4+ et charge virale

Ces mesures doivent être réalisées un mois après l'instauration du traitement, puis à trois mois, et tous les trois mois la première année. Ensuite, si la charge virale est devenue indétectable, la surveillance aura lieu tous les trois à quatre mois si les cellules T CD4+ sont inférieurs à 500 /mm³, et tous les quatre à six mois, si les cellules T CD4+ sont supérieurs à 500 /mm³ [625].

Surveillance de la bonne tolérance biologique :

Les contrôles à réaliser varient selon les molécules utilisées. La tolérance biologique est surveillée sur la NFS-plaquettes, les transaminases, la glycémie, la cholestérolémie, la triglycéridémie. Une surveillance de l'amylasémie et (ou) de la créatininémie peut être également indiquée [625].

VI - TRAITEMENT ANTIRETROVIRAL

Lorsque le premier cas de VIH / SIDA a été signalé en 1981, le principal obstacle était le manque de traitements efficaces contre l'infection à VIH. Il a fallu près de 6 ans pour que le premier médicament destiné à traiter le VIH / SIDA soit approuvé par *US Food and Drug Administration (USFDA ou FDA)*, Maryland, États-Unis. En 1987, L'USFDA a approuvé l'utilisation de l'azidothymidine (AZT) comme premier médicament pour le traitement du VIH / SIDA. Les médicaments utilisés pour traiter l'infection par le VIH sont communément appelés médicaments antirétroviraux (ARV) ou médicaments anti-VIH.

L'augmentation de la morbidité et de la mortalité associées à l'infection par le VIH est une réelle préoccupation de tous les secteurs de la société. Ces sérieuses préoccupations ont permis de

développer de nouveaux médicaments qui peuvent traiter les patients infectés par le VIH. Une meilleure compréhension de la réplication du VIH a aidé à identifier des cibles pour de nouveaux médicaments qui peuvent bloquer ou inhiber la réplication de ce virus. Le blocage ou l'inhibition de la réplication du VIH peut être l'un des moyens de guérir le VIH, peut-être dans le futur, mais pas à l'heure actuelle.

VI.1 - Principe et objectifs

L'objectif principal de la thérapie antirétrovirale est de prévenir la progression vers le stade SIDA en restaurant le nombre de lymphocytes T CD4+ à plus de 500 / mm³. Afin d'atteindre cet objectif, le traitement antirétroviral doit rendre la charge virale plasmatique indétectable (<20 copies / mL), ce qui permet la meilleure restauration immunitaire et la prévention de l'émergence de variants viraux résistants.

Bien que l'efficacité immunovirologique de la thérapie antirétrovirale soit cruciale, d'autres objectifs doivent également être recherchés :

- La meilleure tolérance possible, à court, moyen et long terme ;
- L'amélioration ou le maintien de la qualité de vie ;
- La réduction du risque de transmission mère-enfant du VIH.

Les facteurs prédictifs d'une réponse virologique soutenue, après l'instauration d'un premier traitement antirétroviral, sont le niveau de charge virale et le taux des lymphocytes T CD4+ à l'initiation du traitement, l'observance thérapeutique et la vitesse de réduction de la charge virale après l'instauration du traitement [626-628].

VI.2 - Classes thérapeutiques

La connaissance des différentes étapes cruciales du cycle de réplication du VIH a été utile dans le développement de différentes classes thérapeutiques, à savoir les de la transcriptase inverse, les inhibiteurs de la protéase et les inhibiteurs de l'intégrase, les inhibiteurs de fusion et les inhibiteurs d'entrée.

Jusqu'à présent, il existe plus de 20 molécules antirétrovirales approuvées, et différentes combinaisons qui ont prouvé leurs efficacités. Ces combinaisons appelées Thérapies Antirétrovirales Hautement Actives (*Highly Active Antiretroviral Therapy* ou HAART)

permettent de contrôler la charge virale, retarder ou prévenir l'apparition des symptômes ou la progression vers le SIDA, prolongeant ainsi la survie des personnes infectées par le VIH.

VI.2.1 - Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

Dans la classe des inhibiteurs de la transcriptase inverse, il existe deux sous-classes de médicaments. La première classe est constituée des inhibiteurs nucléosidiques / nucléotidiques de la transcriptase inverse et la seconde classe comprend les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse.

Les inhibiteurs nucléosidiques / nucléotidiques de la transcriptase inverse (INTI) :

Les INTI constituaient la première classe de médicaments antirétroviraux à être approuvée par la FDA. Les INTI sont pris comme promédicaments et doivent être introduits dans la cellule hôte et phosphorylés avant qu'ils ne deviennent actifs. Une fois à l'intérieur de la cellule hôte, les kinases cellulaires activeront le médicament. Le médicament exerce son effet à travers sa structure. Les INTI sont dépourvus du groupement hydroxyl en 3' et auront soit un nucléoside soit un nucléotide comme base. En raison du groupement hydroxyl manquant, l'INTI empêche la formation d'une liaison 3'-5'-phosphodiester dans les chaînes d'ADN en croissance et peut ainsi empêcher la réplication du virus [629].

Les INTI les plus courants sont l'Abacavir (ABC), l'Emtricitabine (FTC), le Didanosine (ddI), la Lamivudine (3TC) et la Zidovudine (AZT) pour les analogues nucléosidiques et le Ténofovir Disoproxyl Fumarate (TDF) et le Ténofovir Alafenamide Fumarate (TAF) pour les analogues nucléotidiques.

La découverte des INTI a été très bénéfique pour le traitement des patients infectés par le VIH, tandis que la résistance aux médicaments s'est avérée être un obstacle majeur pour l'efficacité de cette classe thérapeutique.

Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) :

Les INNTI constituent la deuxième classe des inhibiteurs de la transcriptase inverse. Le principal mécanisme d'action est la liaison du INNTI à la transcriptase inverse du VIH-1 et la création d'une poche hydrophobe à proximité du site actif. Cette poche crée une nouvelle configuration spatiale du site de liaison au substrat pour réduire l'activité polymérase globale. En créant une configuration différente, la synthèse de l'ADN est globalement ralentie [630].

Cette classe est représentée par quatre molécules : Efavirenz et Nevirapine qui sont des molécules de première génération et Etravirine et Rilpivirine qui elles, sont de la deuxième génération.

VI.2.2 - Inhibiteurs de l'Intégrase (INI)

L'intégration de l'ADN proviral dans le génome des cellules infectées se produit en raison de l'activité de l'enzyme intégrase. Cette enzyme a été étudiée comme l'une des cibles médicamenteuses potentielles pour contrôler la réplication du VIH. L'USFDA a approuvé un médicament de cette catégorie en 2007. Le raltégravir est le seul médicament de ce groupe qui est disponible sous le nom d'Isentress [631].

VI.2.3 - Inhibiteurs de la Protéase (IP)

Comme son nom l'indique, ce groupe de médicaments inhibe l'activité de l'enzyme protéase. Les IP inhibent l'activité de la protéase virale en bloquant le site actif de l'enzyme. Une protéase virale non fonctionnelle produit des virions immatures et non infectieux. Les IP sont donc capables d'inhiber ou réduire la production de nouveaux virions à partir de cellules infectieuses. Le VIH peut encore se répliquer en présence de l'IP mais ne pourra pas former un virus mature. Les IP sont des composants essentiels de la thérapie combinée, c'est-à-dire le HAART. Leur utilisation a réduit le problème de la résistance aux médicaments. La toxicité et les effets secondaires sont courants avec cette classe thérapeutique. Certains IP courants sont l'indinavir, le lopinavir, le nelfinavir et le ritonavir [632].

VI.2.4 - Inhibiteurs d'entrée

Les inhibiteurs d'entrée constituent une classe thérapeutique qui empêche le VIH de pénétrer dans la cellule hôte. On distingue :

Les Inhibiteurs de Fusion (IF) :

L'étape de fusion des membranes virale et cellulaire est une bonne cible pour prévenir les infections à VIH. Un médicament comme inhibiteur de fusion (IF) a été approuvé par l'USFDA en 2003. Le nom de marque du médicament est Fuzeon qui est également appelé T-20. Fuzeon est un polypeptide comprenant 36 acides aminés. La biodisponibilité est l'un des principaux inconvénients associés aux IF. Ce médicament peut être injecté par voie parentérale (sous-cutanée), deux fois par jour provoquant des réactions cutanées assez fréquentes au point d'injection [631].

Antagonistes du CCR5 :

Cette sous-classe contient deux molécules, dont le maraviroc qui a obtenu sa première autorisation de mise sur le marché en Europe en 2007 et utilisé en clinique, et le vicriviroc dont le développement clinique a échoué. Le maraviroc se lie au CCR5 et empêche les variants R5 de pénétrer dans les la cellule cible. Ce médicament nécessite un test hautement technique pour s'assurer que le patient ne présente pas de variants X4, et le médicament doit être administré deux fois par jour. Le maraviroc est actuellement utilisé pour le traitement des patients présentant des résistances à de multiples molécules antirétrovirales [633].



Chapitre III : Résistance naturelle à l'infection au VIH-1

Depuis la découverte du VIH, des études ont montré l'existence des personnes complètement résistantes à l'infection par le VIH et d'autres qui ont progressé plus lentement vers le stade SIDA.

Les individus complètement résistants à l'infection restent séronégatifs malgré les multiples expositions au VIH [634]. On les appelle également des personnes séronégatives fortement exposées. Par exemple, les personnes qui ont des contacts sexuels non protégés avec plusieurs partenaires, mais qui restent encore séronégatives.

Il existe également, certaines mères séropositives qui donnent naissance à des nourrissons séronégatifs. En fait, la probabilité de transmission du VIH est faible par rapport à d'autres virus humains. Il est donc difficile de trancher si la séronégativité de ces personnes exposées au VIH à plusieurs reprises est due vraiment à une résistance naturelle ou simplement à cause d'une faible probabilité de transmission du virus.

L'évolution clinique de l'infection et la progression vers le stade SIDA varient selon les individus. On distingue trois types principaux de progression [635] :

- Les progresseurs lents (*Slow Progressor* ou *SP*) caractérisés par une évolution lente vers le stade SIDA : entre 3 et 10 ans après la séroconversion ;
- Les non progresseurs à long terme (*Long Term Non Progressors* ou *LTNP*) ou « *elite controllers* » qui sont des patients asymptomatiques caractérisés par des niveaux indétectables de charge virale (< 50 copies / mL) pendant plus de 10 ans ;
- Les progresseurs rapides (*Rapid Progressor* ou *RP*) : le SIDA apparaît dans les 2 à 3 ans qui suivent l'infection.

I - FACTEURS INFLUENÇANT LA SUSCEPTIBILITE AU VIH-1 ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE

Le risque variable d'être infecté par le même niveau d'exposition au VIH, ainsi que la vitesse variable de progression de la maladie chez les personnes infectées par le VIH, dépendent d'une combinaison de différents facteurs qu'on peut regrouper en deux catégories principales :

- Les facteurs viraux déterminant les propriétés répliquatives du virus ou sa capacité à échapper au système immunitaire ;
- Les facteurs de l'hôte modulant la réponse immunitaire à l'infection, et régissant la capacité du virus à se répliquer dans les cellules humaines.

I.1 - Les facteurs viraux

I.1.1 - Impact de la variabilité du VIH-1

De multiples facteurs affectant la structure et la fonction du VIH ont été associés à la vitesse de progression vers le SIDA, y compris les délétions dans certains gènes viraux, l'utilisation du corécepteur, le sous-type viral et la capacité de réplication. Une progression plus lente de la maladie a été observée chez les personnes infectées par le VIH-1 portant des délétions dans le gène *nef* [636].

Les personnes infectées par des souches R5X4 peuvent développer le SIDA environ 4 fois plus rapidement, indépendamment du nombre de lymphocytes T CD4 + et de la charge virale du VIH-1, que celles infectées par les variants R5 [637]. En effet, les souches qui utilisent le corécepteur CXCR4 sont plus pathogènes que les autres souches. La transmission (rare) des souches X4 est associée à une progression accélérée de la maladie. L'utilisation des corécepteurs viraux passe de R5 à X4 chez environ 40% des patients au cours de l'infection, conduisant à une accélération de la perte de lymphocytes T CD4 + et de la progression de la maladie [638]. Les sujets infectés par des variants X4 sont sept fois plus susceptibles de progresser vers le SIDA sur une période de 30 mois.

Comme mentionné auparavant, la progression de la maladie et la transmission du VIH-1 peuvent également être influencées par le sous-type viral [639].

Par ailleurs, dans une autre étude portant sur 8483 patients britanniques (avant la thérapie antirétrovirale), la diversité génétique du gène de la polymérase expliquait environ 5,7% de la variance dans le « *set point* » de la charge virale (*HIV set-point viral load* ou *spVL*) chez les individus infectés par le sous-type B [640]. Des études récentes ont suggéré que le génome viral peut expliquer jusqu'à 30% de la variation observée dans le *spVL* [641, 642].

Bien que la variabilité du VIH puisse avoir un impact direct sur la progression de la maladie entraînant une augmentation ou une diminution de la charge virale, cela peut refléter la pression génétique de l'hôte sur la *spVL*, car la variation des séquences virales peut être due à des mutations d'échappement.

L'impact de la variation de la séquence du VIH sur la progression de la maladie et la transmission virale peut être un facteur important pour déterminer le pronostic de la maladie et pour le développement de thérapies.

I.1.2 - Impact de la coïnfection avec le virus GB-C

Le virus GB-C (*GB virus C* ou *GBV-C*, appelé auparavant *hepatitis G virus* ou *HGV*) est un flavivirus qui est principalement transmis par des aiguilles contaminées, mais qui peut également être transmis sexuellement. Il n'a aucun effet pathogène connu. Le GBV-C est présent dans les populations du monde entier. Sa virémie a été retrouvée chez 1,8% des donneurs de sang aux États-Unis, 4% en France et 1,3% au Japon [643]. Le GBV-C a été associé à une réduction de la mortalité et à une prolongation de survie chez les patients infectés par le VIH-1 [644, 645]. Les individus coïnfectés par le VIH-1 / GBV-C sont caractérisés aussi par un nombre plus élevé de lymphocytes T CD4+ par rapport aux personnes non infectées par le GBV-C [646].

Des études *in vitro* ont indiqué que la sécrétion de la chimiokine RANTES, de la protéine inflammatoire des macrophages MIP-1 α , MIP-1 β et la chimiokine SDF-1 était augmentée dans les cellules infectées par le GBV-C par rapport aux cellules non infectées par ce virus. De plus, l'expression de CCR5 sur les surfaces des cellules était significativement plus faible dans les cellules infectées par le GBV-C [647]. Ces facteurs peuvent réduire la susceptibilité au VIH-1.

I.2 - Facteurs de l'hôte

I.2.1 - Les facteurs génétiques

La variabilité génétique de l'hôte joue un rôle majeur dans la détermination de la susceptibilité ou de la résistance aux infections potentiellement pathogènes. Plusieurs rapports ont démontré la présence d'une association des gènes spécifiques de l'hôte avec des taux variables de progression vers le SIDA.

Les gènes de l'hôte soupçonnés d'influencer la susceptibilité au VIH-1 et la progression de la maladie peuvent être divisés en trois catégories :

- Les gènes codant pour des récepteurs de surface cellulaire ou de ses ligands ;
- Les gènes des antigènes des leucocytes humains (*Human leukocyte Antigen* ou *HLA*) qui régulent la réponse immunitaire à l'infection ;
- Et d'autres gènes liés à l'immunité.

I.2.1.1 - Gènes codant pour des récepteurs de surface cellulaire et de ses ligands

Ces gènes participent directement à l'entrée du VIH-1 à l'intérieur de la cellule cible et influencent ainsi l'infection et le taux de progression de la maladie.

I.2.1.1.1 - Le gène *CCR5*

Le gène *CCR5* est localisé sur le chromosome 3p21 [648], dans un cluster de gènes codant pour d'autres récepteurs de chimiokine qui comprend les *CCR1*, *CCR2*, *CCR3*, *XCR1* et *CCBP2* [248, 649]. Le gène *CCR5* est composé de trois exons, deux introns et deux promoteurs [648] (figure 40). Le promoteur en amont, désigné Pu ou PR2, est constitué d'une région de 1,9 kb précédant l'exon 1 qui est d'une longueur de 57 pb. L'exon 1, qui présente le début de la région codante, est suivi du premier intron d'une longueur de 501 pb. L'exon 2 peut être trouvé sous forme d'exon 2a (235 pb) et d'exon 2b (54 pb). Le second promoteur, désigné Pd ou PR1, englobe les régions intron 1 et exon 2 [650]. Un intron de 1,9 kb est situé entre l'exon 2 et l'exon 3. L'exon 3 contient l'ORF entier du gène *CCR5*, 11 pb de la région 5'-UTR et la région 3'-UTR complète [648].

Le gène *CCR5* possède plusieurs sites d'initiation de la transcription (ATG), avant le codon d'initiation de l'exon 3, conduisant à la génération de différents transcrits de *CCR5*, qui varient dans leurs régions 5'UTR [648]. Ces sites d'initiation de transcription sont généralement annulés par des codons stop précédant l'exon 3.

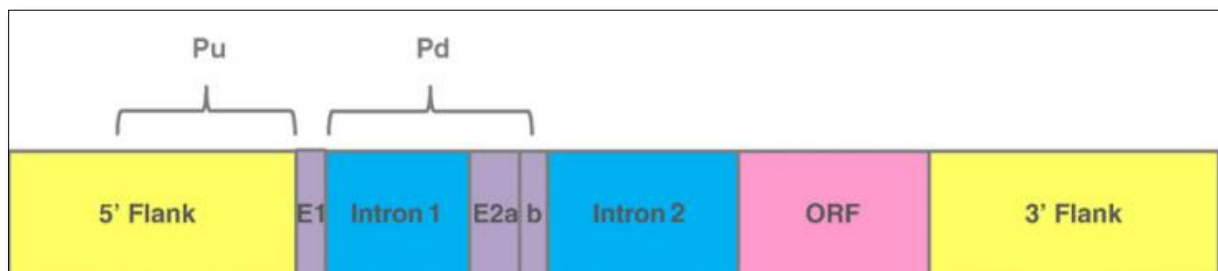


Figure 40 : Structure du gène *CCR5* [651]

I.2.1.1.1.1 - Le polymorphisme génétique *CCR5-Δ32*

L'identification du *CCR5* comme principal corécepteur des souches M-tropiques du VIH-1 a stimulé la recherche des mutations génétiques susceptibles d'altérer la fonction du récepteur, et représenter une base moléculaire pour la résistance à l'infection par le VIH qui caractérise certains individus. Le séquençage de la région codante du *CCR5* chez des individus sélectionnés au hasard ou exposés non infectés a permis d'identifier un premier allèle mutant du gène *CCR5*

portant une délétion de 32 pb (nucléotides 794 à 825), dans une région correspondante à la seconde boucle extracellulaire du récepteur [652, 653].

La délétion induit un décalage du cadre de lecture avec l'inclusion de sept nouveaux acides aminés après l'acide aminé 174, et un codon-stop au niveau de l'acide aminé 182 (figure 41).

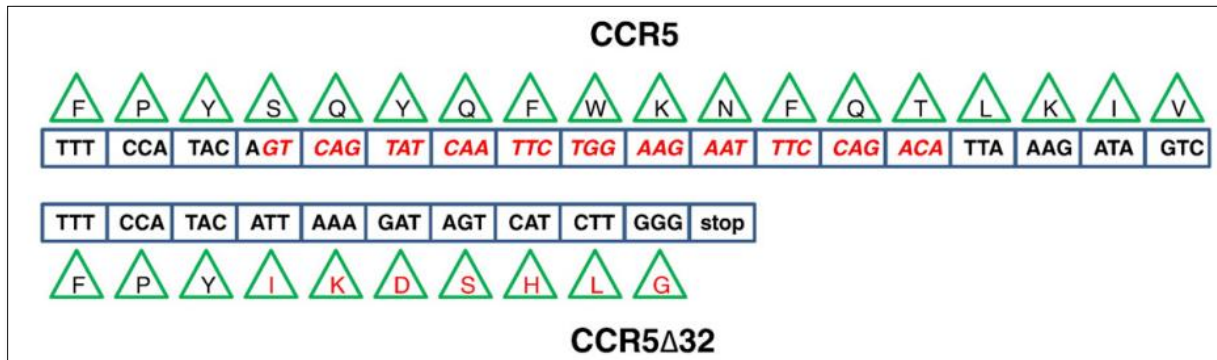


Figure 41 : Différence entre le CCR5 et le CCR5-Δ32 [651]. La section supérieure correspond à la traduction de la protéine CCR5 de type sauvage tandis que la section inférieure démontre la traduction de la protéine mutante. La région surlignée en rouge dans la séquence du CCR5 se réfère à la région délétée dans Δ32. La région surlignée en rouge dans la séquence protéique mutante fait référence aux nouveaux acides aminés insérés suivis du codon stop.

L'allèle muté code pour une protéine de 215 acides aminés (le récepteur de type sauvage est de 352 acides aminés). Il en résulte donc un récepteur CCR5 de quatre segments transmembranaires uniquement. Cette forme tronquée affecte la fonctionnalité du récepteur CCR5 : il n'est pas exprimé à la surface cellulaire, ni dans les populations de leucocytes naturels, ni sur les lignées cellulaires transfectées (figure 42). Le récepteur tronqué mal replié est retenu dans le réticulum endoplasmique, où il peut être détecté par des anticorps monoclonaux [654].

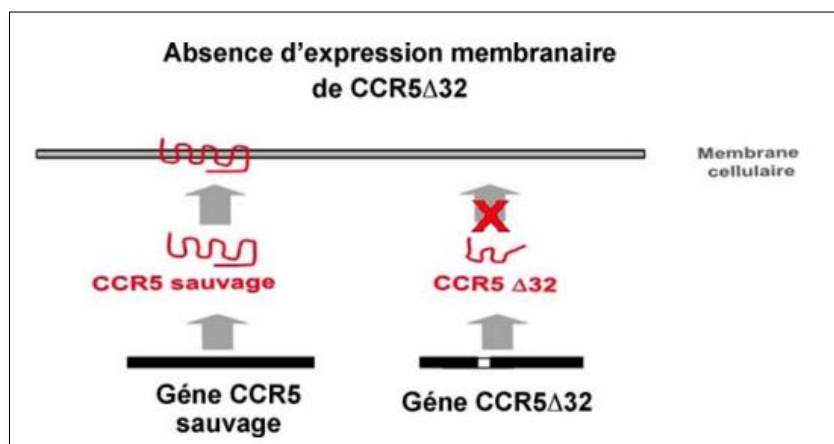


Figure 42 : Expression du CCR5 à la surface de la cellule [655]. Le gène de type sauvage avec expression membranaire normale du récepteur est représenté à gauche. À droite, le gène *CCR5-Δ32* muté code pour un récepteur tronqué qui n'est pas exprimé à la surface cellulaire.

Le mutant *CCR5-Δ32* est également un corécepteur défectueux. Les homozygotes pour la mutation $\Delta 32$ sont hautement protégés contre l'infection par le VIH-1 [652, 656, 657], et les cellules mononucléées du sang périphérique (*PBMC*) d'individus homozygotes ne sont pas infectables par les souches M-tropiques du VIH-1. Cependant, l'entrée et l'infection par les souches T-tropiques n'est pas affecté [652, 654].

Cette résistance au VIH-1 a grandement contribué à la démonstration du rôle principal du CCR5 en tant que corécepteur pour les souches M-tropiques du VIH-1. L'effet protecteur de la mutation $\Delta 32$ chez les individus homozygotes a été confirmé dans des études ultérieures, y compris dans des situations de contact parentéral avec le virus [658]. Cependant, d'autres études ont rapporté la présence de certains individus homozygotes pour cette mutation mais séropositifs, démontrant que la protection est incomplète [659-668].

Dans certains cas, la souche du VIH a été caractérisée comme utilisant exclusivement le CXCR4 comme corécepteur [661, 664, 665]. Ces cas rares de transmission et de propagation des souches X4 soulignent encore le rôle prépondérant joué par le corécepteur CCR5 et les souches R5 dans l'initiation de l'infection et le paradoxe de la faible probabilité de transmission ou de l'évolution des souches X4, malgré l'expression constitutive de CXCR4 à la surface des cellules exprimant le CD4 et l'abondance de ces cellules cibles du VIH-1 [669].

Par ailleurs, il a été suggéré que les individus homozygotes infectés par le VIH-1 n'expriment pas de manière stable la protéine CCR5- $\Delta 32$, et sont dépourvus du mécanisme moléculaire de protection [670]. L'expression stable de la protéine mutante peut être affectée par des polymorphismes au niveau de la région promotrice du gène [671]. Les individus homozygotes pour la mutation *CCR5-Δ32* et portant également la mutation 59537-A / A du promoteur avaient une expression réduite de la protéine mutée CCR5- $\Delta 32$ par rapport à ceux portant l'allèle de type sauvage 59537-G / G.

Les individus hétérozygotes pour la mutation $\Delta 32$ ont montré une progression plus lente vers le stades clinique du SIDA [657]. Cette association a été prouvée par plusieurs cohortes [13, 672-680], mais pas toutes [681-683]. Certaines études suggèrent que les hétérozygotes pourraient être partiellement protégés contre l'infection par le VIH-1 [679, 680, 684], mais cela n'a pas été confirmé dans de nombreuses autres études, et cet effet protecteur doit être considéré comme faible. Puisque les hétérozygotes pour l'allèle $\Delta 32$ représentent jusqu'à 30% dans certaines populations, cela peut avoir un impact significatif sur la progression vers le stade

SIDA dans ces populations. L'hétérozygotie était également associée à un taux plus faible de développement du lymphome non hodgkinien chez les patients atteints du SIDA [685, 686], bien que le mécanisme ne soit pas encore clair. Le *CCR5-Δ32* a également été associé à un risque réduit de démence liée au VIH [687].

Les niveaux d'expression du CCR5 à la surface des leucocytes sont réduits chez les individus hétérozygotes par rapport aux homozygotes pour l'allèle de type sauvage (*CCR5*), affectant ainsi l'infection des lymphocytes par les souches M-tropiques du VIH-1 ex vivo [270]. Il a également été suggéré que l'expression de CCR5 chez les hétérozygotes diminuerait de plus de 50 %, ce qui suggère que le variant du récepteur pourrait avoir un effet dominant négatif. En effet, le CCR5 forme des homodimères, ainsi que des hétérodimères avec le CCR2 [688]. La dimérisation du récepteur muté avec le récepteur de type sauvage a donc été proposée comme mécanisme potentiel empêchant le trafic normal du récepteur de type sauvage vers la surface cellulaire, et sa rétention dans le réticulum endoplasmique [689].

La fréquence de la mutation *CCR5-Δ32* a été étudiée chez la majorité des populations au monde. La mutation est fréquente dans les populations européennes, avec un gradient décroissant du nord vers le sud [14, 690, 691]. Les fréquences alléliques les plus élevées (15–16%) se trouvent dans le nord de la Russie, en Finlande, en Suède et en Islande. Des fréquences alléliques d'environ 10% se trouvent dans la plupart des pays d'Europe occidentale et centrale, tandis que les fréquences les plus basses (4–6%) se trouvent dans les pays du Sud comme le Portugal et la Grèce [14, 692, 693].

Les fréquences alléliques sont d'environ 2% en Afrique du Nord. En Afrique centrale et occidentale, aucune étude n'a prouvé la présence de l'allèle *CCR5-Δ32*. Les fréquences baissent également vers l'Est. Des basses fréquences ont été trouvées au Moyen-Orient et en Inde. Dans d'autres parties du monde, par exemple chez les Afro-Américains, la mutation $\Delta 32$ est trouvée suite à l'immigration et /ou au mélange avec des populations d'origine européenne [694].

La distribution restreinte de l'allèle *CCR5-Δ32* suggère que cette mutation ne s'est produite qu'une seule fois dans l'histoire des populations humaines. Les estimations de l'âge de cette mutation, basées sur l'analyse des microsatellites ou STR (*Short Tandem Repeats*), vont de 750 à 2500 ans, bien qu'une date précise ne soit pas encore généralement acceptée [690, 695].

I.2.1.1.1.2 - Autres mutations de *CCR5*

Autres mutations dans les régions codantes et promotrices du gène *CCR5* ont été également associées avec l'infection au VIH et la progression de la maladie. Les mutations de la région codante affectent la structure de la protéine *CCR5*, et par conséquent, elles affectent la production, le transport, la liaison aux chimiokines, la signalisation et l'expression du récepteur *CCR5*. Des mutations dans la région promotrice peuvent affecter la production de l'ARNm codant pour le *CCR5*.

Les mutations des régions codantes :

Les mutants *C101X* [696] et *FS299* [697] entraînent une interruption prématurée de la traduction. Le mutant *C101X* découvert chez un homme homosexuel séronégatif, fréquemment exposé au VIH-1, entraîne la substitution de la cystéine en position 101 de la protéine *CCR5* par un codon-stop. Par conséquent, cette terminaison prématurée de la traduction forme une protéine qui ne contient que deux domaines transmembranaires. Une fréquence allélique élevée de cette mutation a été observée en Afrique centrale [696]. Des études réalisées *in vitro* indiquent que cette protéine n'est pas exprimée à la surface cellulaire, ne fonctionne pas comme un corécepteur du VIH-1, et mal repliée.

Le variant *FS299*, dont la fréquence allélique est de 3 à 4% en Asie [696], est une mutation qui entraîne un décalage du cadre de lecture provoquant l'absence de la dernière partie du septième domaine transmembranaire et l'absence totale de l'extrémité C-terminale. L'expression de la protéine à la surface cellulaire est réduite en raison de la rétention intracellulaire. En outre, elle ne se lie pas aux chimiokines mais a toujours la capacité de se lier au VIH-1, bien qu'avec une efficacité réduite [696].

Les mutations *I12T*, *C20S* et *A29S* sont toutes situées dans l'extrémité N-terminale. Selon Carrington et al., ces mutations réduisent nettement l'expression de la protéine à la surface cellulaire ainsi que la liaison au ligand. Il a été démontré que les mutants *I12T* et *C20S* ne fonctionnent pas comme des corécepteurs du VIH-1 [698]. À l'inverse, Blanpain et al. ont trouvé que l'entrée du VIH-1 peut être médiée par le variant *I12T* [696]. Par ailleurs, ils réfutent également les résultats concernant l'influence de la mutation *A29S* sur l'expression de la protéine à la surface cellulaire. Cependant, le variant *A29S* n'interagit pas avec MIP-1 α et MIP-1 β mais il peut interagir avec MCP-2, et fonctionner comme un corécepteur du VIH-1 [696].

Les mutations *I42F*, *L55Q* et *A73V* se trouvent dans le premier et le deuxième domaine transmembranaire, et selon Carrington et al., ces variantes favorisent l'infection par le VIH-1 et ont une affinité d'environ 4 à 8 fois plus élevée pour les ligands [698]. Howard et al. ont démontré que les deux variants *I42F* et *A73V* ont une expression réduite à la surface cellulaire par rapport aux récepteurs de type sauvage. L'affinité du récepteur pour RANTES augmente suite à la mutation *I42F*, tandis que son activité en tant que corécepteur diminue à cause de la mutation *A73V* [699]. La mutation *L55Q* affecte un résidu hautement conservé, qui est important pour l'activation du récepteur mais pas pour l'affinité de liaison envers les chimiokines [696].

Les mutations *I12T*, *C20S*, *I42F*, *L55Q*, *A73V* et *C101X* ont été précédemment identifiés chez des individus portant la mutation *CCR5-Δ32* [700, 701].

La mutation *C178R*, initialement découverte dans la population vietnamienne [702], affecte une cystéine hautement conservée impliquée dans le pont disulfure entre ECL-1 et ECL-2, qui est important pour la structure du CCR5 et dans la liaison de ce dernier au VIH-1. Des études ont montré que le variant *C178R* provoque une réduction spectaculaire de l'expression du récepteur à la surface cellulaire avec rétention intracellulaire du récepteur mal replié [696]. Le récepteur muté ne se lie pas ou n'interagit pas avec les chimiokines mais peut toujours se lier au VIH.

La mutation *R223Q* est également connue pour affecter un résidu conservé. Une diminution de la fonction du corécepteur a été observée pour les variants *R223Q*, tout en maintenant toujours la capacité de se lier à la gp120 [698]. Capoulade-Metay et al. n'ont trouvé aucun changement dans l'expression du CCR5 ou dans la liaison aux chimiokines. En outre, Zhao et al. n'ont trouvé aucun effet sur l'infection à VIH-1 in vitro ou sur le niveau d'ARNm du CCR5 [703, 704].

La mutation *G106R* modifie l'hydrophobicité du résidu dans le troisième domaine transmembranaire, entraînant une expression réduite du récepteur [703] sans affecter les niveaux de production d'ARNm [704]. Cette mutation diminue également la liaison aux chimiokines et au VIH-1.

Les mutations *S185R*, *I254T* et *C269F* ont été trouvées dans l'Asie du Sud-Est [703]. Les deux premières mutations peuvent modifier respectivement la charge du résidu et l'hydrophobicité. La fonction du récepteur et son activité en tant que corécepteur du VIH-1 restent cependant similaires à celles du récepteur de type sauvage. En revanche, la mutation *C269F* perturbe la cystéine conservée impliquée dans la liaison entre l'ECL 3 et l'extrémité N-terminale. Cela se

traduit par une réduction de l'expression du récepteur à la surface cellulaire, une diminution de la liaison au MIP-1 β et RANTES, ainsi qu'une faible liaison au VIH-1.

Mutations de la région promotrice :

Martin et coll. ont pu identifier 10 SNP qui, dans différentes combinaisons, ont créé quatre haplotypes communs (*CCR5* P1-4) et six haplotypes peu fréquents (*CCR5* P5-10). Ces haplotypes influencent différemment la progression de l'infection au VIH-1 [705].

Un polymorphisme (A / G) en position 59029 (GenBank Accession: U95626) dans la région promotrice de *CCR5* s'avère affecter la progression de l'infection [706]. Les individus présentant le génotype A / A progressent rapidement vers le SIDA par rapport aux individus présentant le génotype G / G qui progressent 3,8 ans plus lentement. Ce dernier génotype était associé à une activité promotrice inférieure de 45% [706]. L'allèle A se trouve dans l'haplotype *CCR5* P1 et a une activité promotrice potentiellement plus efficace. Shieh et al. ont découvert que les individus présentant le génotype homozygote A / A, avaient des niveaux plus élevés de cellules CD4 + exprimant le *CCR5* [707].

Une étude réalisée par de Souza et al. sur l'effet de quatre polymorphismes du promoteur sur la transmission périnatale du VIH-1 chez les enfants brésiliens, a révélé la présence de deux génotypes affectant la transmission du VIH-1 [708]. Le génotype 59353 T / T a été associé à une augmentation de la transmission du VIH-1, alors que le génotype 59402 A / A a un effet protecteur.

Les mutations du promoteur peuvent également affecter la liaison des facteurs de transcription [709].

I.2.1.1.2 - Le gène *CCR2*

Le gène *CCR2* est composé de trois exons couvrant environ 7 kb de séquence génomique. Ce gène est en fort déséquilibre de liaison avec le gène *CCR5*. L'ORF s'étend sur deux exons épissés alternativement qui codent pour deux polypeptides distincts : le *CCR2A* et le *CCR2B* [369]. La variante *CCR2A* a une queue C- terminale distincte plus longue (de 14 acides aminés) que l'isoforme *CCR2B* (figure 43).

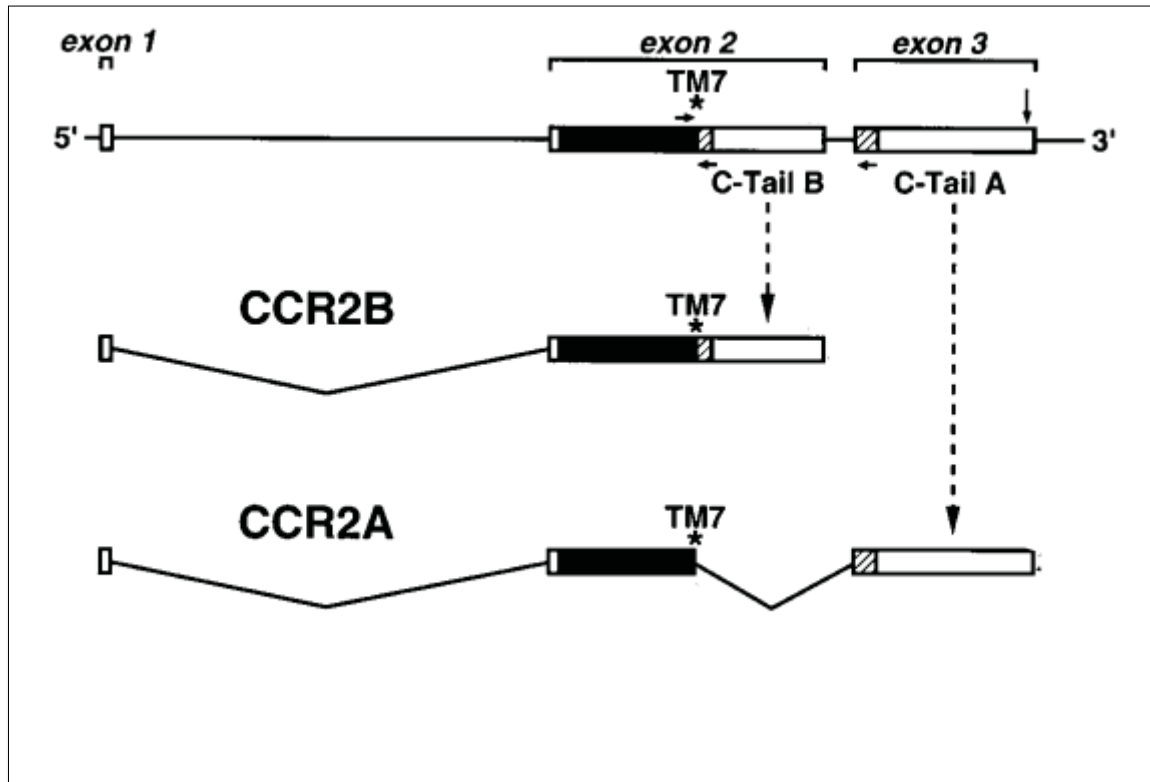


Figure 43 : Organisation structurale du gène *CCR2* (Adapté de [371]). Les zones pleines (noires) et hachurées représentent les domaines codants pour le récepteur CCR2. L'emplacement du septième domaine transmembranaire putatif (TM7) est indiqué par un astérisque.

I.2.1.1.2.1 - Le polymorphisme *CCR2 +190 G>A (rs1799864)*

Un polymorphisme nommé c.190G>A au niveau du gène codant pour le récepteur CCR2 a été décrit, dans lequel une valine 64 dans le premier domaine transmembranaire du récepteur a été remplacée par une isoleucine (p.V64I) suite à une transition (G>A) en position 190 [710].

L'allèle *CCR2 +190A (64I)* est assez courant avec des fréquences d'environ 10% chez les Caucasiens, 15% chez les Afro-Américains, 17% chez les Hispaniques et 25% chez les Asiatiques [711]. *CCR2 +190A (64I)* n'a aucune influence sur la susceptibilité au VIH-1, d'après les résultats de la majorité des études [712, 713]. Cependant, Zapata et al. ont démontré que cet allèle peut avoir un effet protecteur contre l'infection [714]. Les hétérozygotes pour cet allèle muté ont enregistré une progression retardée de 2 à 4 ans vers le SIDA par rapport aux homozygotes pour l'allèle sauvage [710]. Certaines études ont confirmé l'association de l'allèle *CCR2-64I* avec une progression plus lente de la maladie [715-717], d'autres l'ont infirmé [683, 718, 719]. Une autre étude a rapporté un effet protecteur de la variante 64I chez les Afro-Américains, mais pas chez les Caucasiens [678]. Bien que l'effet de l'allèle *CCR2 +190A* soit

controversé, une méta-analyse rassemblant toutes les études disponibles en 2001 a conclu qu'il y a un effet protecteur significatif de cet allèle contre la progression de la maladie [720].

Le mécanisme moléculaire par lequel *CCR2 +190 G>A* confère aux patients infectés par le VIH-1 un effet protecteur contre à la progression du SIDA n'est pas entièrement compris.

Puisque le récepteur *CCR2* n'est utilisé que par quelques souches du VIH-1 en tant que corécepteur, il est peu probable que l'effet du polymorphisme *CCR2 +190 G>A* soit similaire à celui du *CCR5-Δ32*. De plus, la substitution V64I dans un domaine transmembranaire est conservatrice, et *CCR5* contient une isoleucine à la position correspondante, de sorte que la première hélice α du mutant *CCR2* est identique à celle du *CCR5*. Le récepteur *CCR2* muté conserve ses propriétés fonctionnelles en termes de liaison aux chimiokines, d'activation des cascades intracellulaires et de liaison au VIH-1 [721].

Les effets des mutations *CCR2 +190 G>A* et *CCR5-Δ32* ne sont pas additifs, c'est-à-dire que les individus portant à la fois ces deux mutations (une sur chaque chromosome) ne sont pas significativement plus protégés de la progression vers le SIDA que les individus portant une de ces mutations [711].

I.2.1.1.3 - Le gène CXCR4

Le gène *CXCR4*, hautement conservé, code pour le CXCR4 : corécepteur principal des souches X4 du VIH-1. Ce gène s'étend sur 8.7 kb (promoteur compris) du chromosome 2, et il est composé de deux exons séparés par un intron (figure 44). Une région 5' flanquante de 2,6 kb située en amont de l'ORF contient une boîte TATA et le site de début de transcription caractéristique du promoteur. Le promoteur contient de nombreux sites de reconnaissance pour différents types de facteurs de transcription exerçant des actions régulatrices soit positives soit négatives [284]. Par épissage alternatif, le gène *CXCR4* pourrait produire un second transcrit, appelé CXCR4-Lo, que l'on retrouve préférentiellement dans les poumons et la rate [722].

Des études antérieures analysant le rôle du CXCR4 dans la susceptibilité au VIH-1 chez les populations blanches et afro-américaines ont montré une fréquence relativement faible de mutations du *CXCR4*, et par conséquent leur signification n'est pas claire [723-725]. Les variantes génétiques *CXCR4* signalées incluent des mutations silencieuses, *CXCR4-I261I* [725] et *CXCR4-K68K*, et une mutation non conservatrice, *CXCR4-F93S* [723]. Les mutations *CXCR4-K68K* et *CXCR4-F93S* ont également été examinées pour leur influence possible sur

l'entrée du VIH-1 : les résultats sont comparables à ce qui a été trouvé pour le CXCR4 de type sauvage [723].

Des mutations touchant le domaine cytoplasmique de CXCR4 ont été identifiées comme étant responsables du syndrome WHIM, un trouble d'immunodéficience caractérisé par des verrues, une hypogammaglobulinémie, des infections et un myélokathexis [726]. Ces mutations sont pourtant rares.

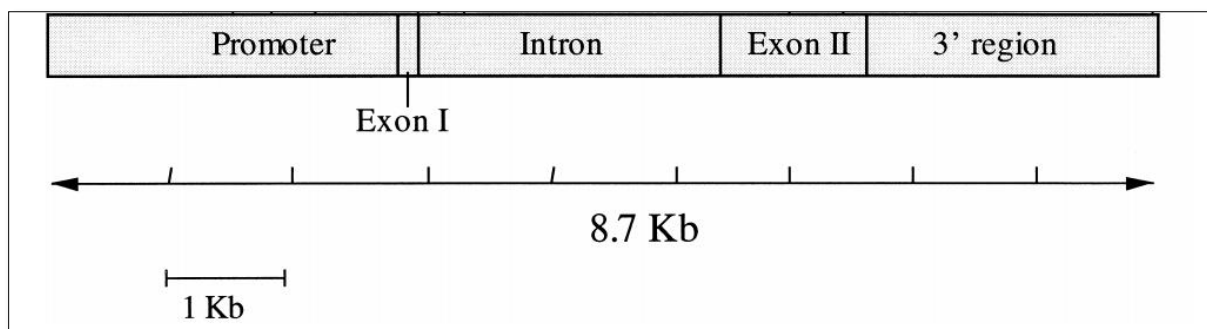


Figure 44 : Organisation structurale du gène CXCR4 [284]

I.2.1.1.1 - Le gène CX3CR1

Le récepteur 1 de chimiokine (*CX3C chemokine receptor 1* ou CX3CR1) est un corécepteur alternatif du VIH-1, utilisé rarement par certaines souches de ce virus [727]. Le gène *CX3CR1* est localisé sur le chromosome 3. Deux polymorphismes dans le gène *CX3CR1* (figure 45) ont été décrits chez les Caucasiens, entraînant une substitution d'une valine par une isoleucine à la position 249 (V249I) et une substitution d'une thréonine par une méthionine à la position 280 (T280M) avec des fréquences de 26% et 13%, respectivement. Il a été suggéré que les patients infectés par le VIH et homozygotes pour l'haplotype *CX3CR1-249I/280M* progressent rapidement vers le SIDA [728].

Cependant, une étude ultérieure du même groupe n'a pas confirmé cette constatation, remettant en cause le rôle du CX3CR1 dans la pathogenèse du VIH-1 [729]. Des données supplémentaires seront nécessaires pour confirmer la présence d'une association entre cet haplotype et la progression de la maladie.

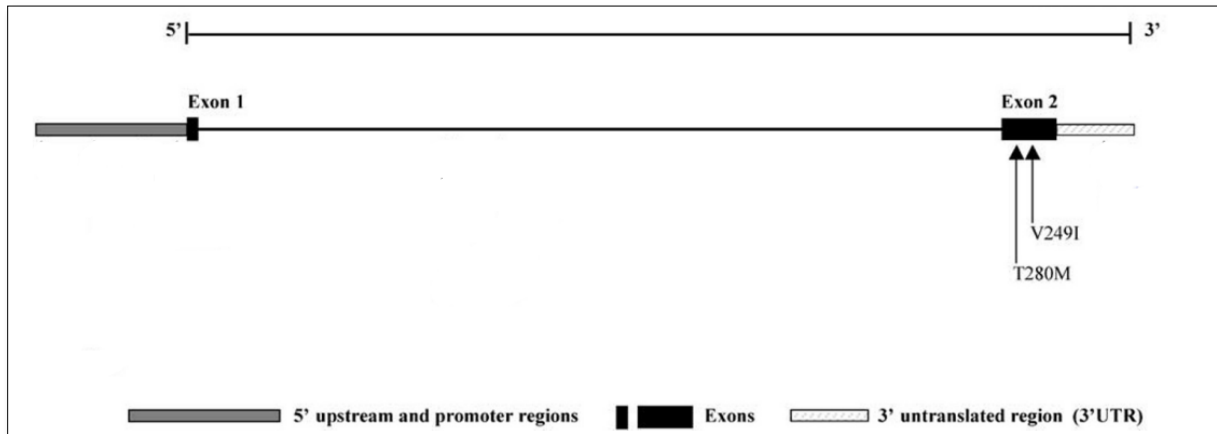


Figure 45 : Organisation structurale du gène *CX3CR1* (Adapté de [730]). Les positions et les noms des 2 SNPs sont représentés par des flèches sous la structure du gène.

I.2.1.1.2 - Le gène *RANTES*

On a signalé que le polymorphisme génétique des récepteurs des chimiokines peut être associé à une diminution du risque de l'infection par le VIH-1 et un ralentissement de la progression de la maladie. Cela a stimulé la recherche d'autres mutations des gènes codant pour des ligands des corécepteurs du VIH-1.

Le gène *RANTES* s'étend sur 8,5 kb sur le chromosome 17 et possède la même organisation caractéristique de trois exons-deux introns de la famille des chimiokines CC (figure 46). Ce gène code pour la chimiokine *RANTES*, qui est un ligand naturel du CCR5. Elle inhibe l'infection par les souches R5 du VIH-1 en bloquant le CCR5 [634, 731]. Trois SNP de ce gène (-28C → G, -403G → A et In 1.1C) (figure 46) ont été rapportés pour leur rôle dans la susceptibilité au VIH-1 et la progression vers le SIDA chez les individus infectés par le VIH-1. Il a été démontré que les SNP -28G et -403A sont associés à une susceptibilité réduite et une progression retardée vers le SIDA [732, 733]. Par contre, le SNP In 1.1C, peut accélérer la progression de la maladie en régulant à la baisse la transcription du gène *RANTES* [734].

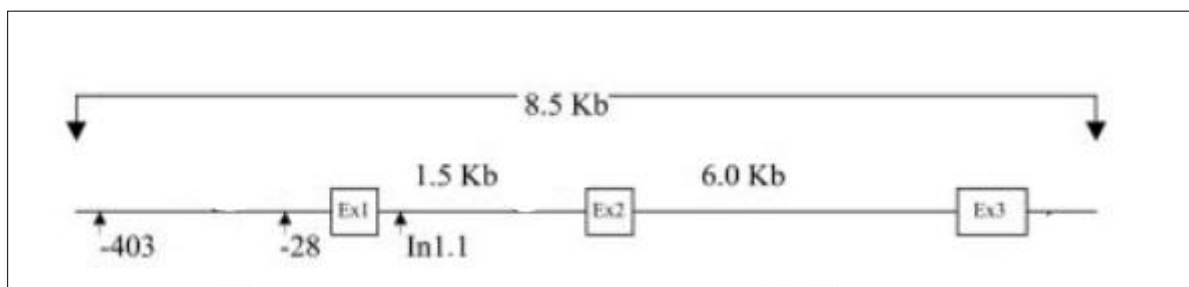


Figure 46 : l'organisation du gène *RANTES* sur le chromosome 17q11.2 et l'emplacement des SNPs (Adapté de [734]). Les exons sont représentés sous forme de cases ouvertes et les tailles d'introns sont indiquées. Les emplacements des SNPs sont indiqués par des flèches.

I.2.1.1.3 - Le gène SDF1

Le gène *CXCL12*, précédemment connu sous le nom de *SDF1* fait environ 15kb, et il est localisé sur le chromosome 10 au niveau de la bande 10q11.1. Comme de nombreux gènes, la séquence promotrice du gène de *SDF1* comporte des séquences riches en GC, par contre elle est dépourvue de boîte TATA [316]. Elle possède également de nombreux sites de reconnaissance des facteurs de transcription, tels que le facteur ubiquitaire SP-1, mais aussi de facteur pro-angiogéniques comme VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) [735] et HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor-1*), induit en situation d'hypoxie. Le gène *SDF1* code pour 6 isoformes (figure 47), SDF1 α , SDF1 β , SDF1 γ , SDF1 δ , SDF1 ϵ et SDF1 ϕ [317]. Ces isoformes sont le résultat d'un épissage alternatif [316, 317, 736]. Toutes les isoformes partagent les trois premiers exons, avec des différences observées dans le quatrième exon uniquement [317].

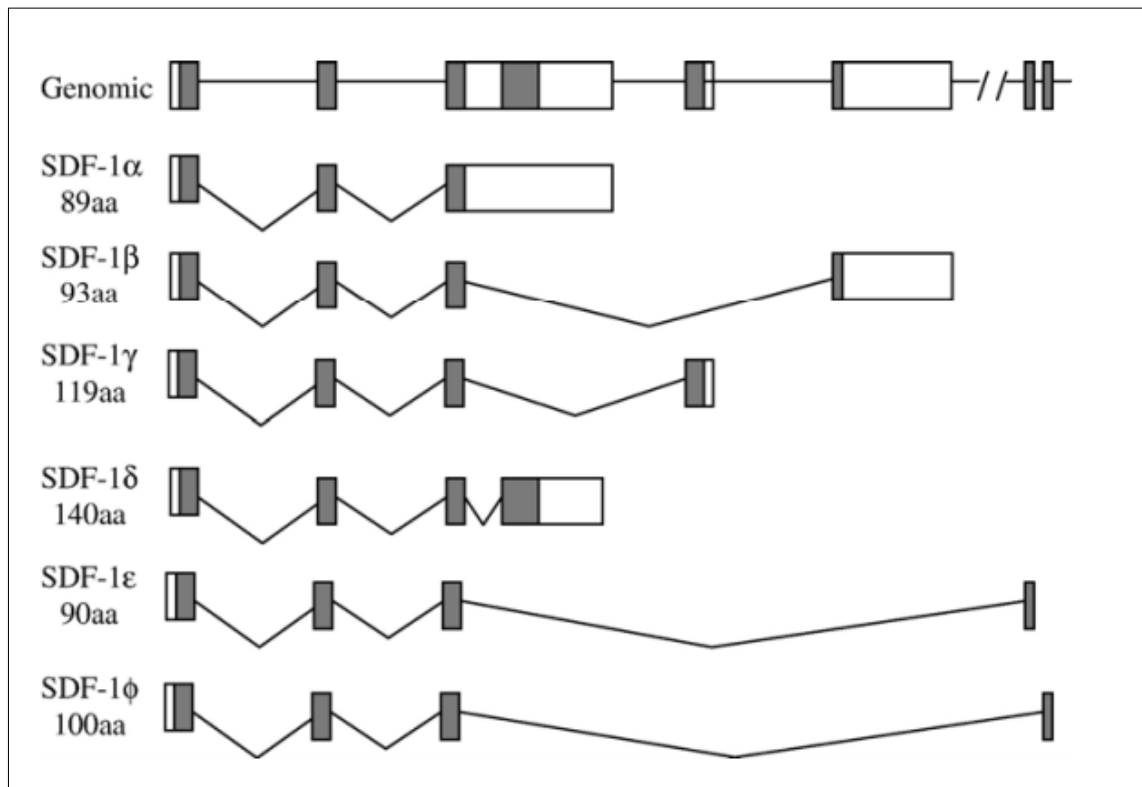


Figure 47 : Organisation structurale du gène *SDF1* [317]. Les variants d'épissage (SDF1 α à SDF1 ϕ) diffèrent au niveau du quatrième exon avec des extensions C-terminales pour SDF1 β , SDF1 γ , SDF1 δ , SDF1 ϵ et SDF1 ϕ

I.2.1.1.3.1 - Le polymorphisme *SDF1* +801 G>A (*rs1801157*)

Un SNP important nommé *SDF1* +801 G>A (*rs1801157*) et abrégé en SDF1-3'A - impliquant une substitution d'une guanine par une adénine (G → A) - a été détecté à la position 801 de la région non traduite 3'UTR de l'ARNm codant pour SDF1 β [737]. La séquence codante pour

l'isoforme $SDF1\alpha$, ne contient pas le polymorphisme $SDF1 +801 G>A$. Bien qu'elle ne soit pas spécifiquement située dans une région codante du gène, cette mutation peut réguler à la hausse la synthèse de la chimiokine.

La fréquence de cette mutation diffère d'une population à une autre. L'allèle $SDF1 +801A$ se trouve à une fréquence d'environ 21% chez les Caucasiens, 16% chez les Hispaniques, 5,7% chez les Afro-Américains et 25,7% chez les Asiatiques [737].

Il a été démontré que cette mutation peut être associée à une résistance à l'infection par le VIH-1 [738, 739] et un ralentissement de la progression de la maladie chez les individus homozygotes. Les individus hétérozygotes ont affiché un rythme de progression similaire à celui observé chez les homozygotes pour l'allèle de type sauvage. Cependant, les résultats trouvés sont controversés.

Les chercheurs ont suggéré que le polymorphisme $SDF1 +801 G>A$ peut jouer un rôle majeur lors de l'apparition des souches T-tropiques, vraisemblablement en augmentant la synthèse du $SDF-1\beta$. La surexpression de cette protéine pourrait assurer, via un blocage autocrine ou paracrine du corécepteur CXCR4 ou par l'induction de l'endocytose du CXCR4, une résistance à l'entrée des souches T-tropiques qui apparaissent plus tard au cours de l'infection empêchant donc la progression clinique rapide de la maladie chez les patients [287, 354].

Le mécanisme d'action de la mutation $SDF1 +801 G>A$ reste à préciser. Cependant, des résultats contradictoires ont également été rapportés par plusieurs autres groupes de chercheurs [740, 741]. Par exemple, dans une étude américaine portant sur une cohorte de 1090 personnes, les homozygotes pour l'allèle $SDF1 +801A$ ont montré une progression accélérée de la maladie et une mort plus rapide [678]. Sinon, aucune association significative entre $SDF1 +801A$ et l'infection par le VIH-1 [742-746] ou la progression vers le SIDA n'a été trouvée dans d'autres recherches [747-749]. Une méta-analyse récente a été menée pour évaluer davantage l'effet de cette mutation, en se basant sur les résultats de 16 études cas-témoins et 7 études de cohorte [750]. Cette méta-analyse a conclu qu'il n'y a pas d'association significative entre le polymorphisme $SDF1 +801 G>A$ et la susceptibilité au VIH, et que l'effet protecteur de ce SNP contre la progression de la maladie chez certaines populations spécifiques est léger. L'influence modérée du $SDF1 +801 G>A$ sur la progression de la maladie a été prévue car ce processus complexe peut être influencé également par divers facteurs de confusion (différentes

voies d'exposition, différents schémas thérapeutiques et même différents facteurs environnementaux...).

Par ailleurs, il a été rapporté que d'autres polymorphismes en déséquilibre de liaison avec le *SDF1-3' G801A*, plutôt que le SNP lui-même, sont responsables de la modification du niveau d'expression du transcrite SDF1. Les résultats incohérents concernant le SNP *SDF1 +801 G>A* dans diverses populations peuvent donc être attribués aux différents haplotypes [751].

I.2.1.2 - Les gènes du HLA

Les gènes codant pour la région HLA sont appelés gènes HLA et sont très importants pour induire une réponse immunitaire efficace contre tout antigène envahissant. Les gènes HLA sont localisés sur le chromosome 6. Le polymorphisme extraordinaire des gènes HLA suggère une « sélection surdominante » ou un « avantage hétérozygote », présenté par des individus hétérozygotes aux loci HLA. Une plus grande variété de peptides antigéniques contre les microorganismes pathogènes envahisseurs est produite par les hétérozygotes par rapport aux homozygotes. Il en résulte une réponse immunitaire plus efficace contre un large éventail d'agents pathogènes [752, 753].

Il a été démontré que l'hétérozygotie aux loci HLA de classe I (*HLA-A*, *HLA-B* et *HLA-C*) est fortement associée à la résistance à la progression vers le SIDA [754, 755].

HLA B * 35-Cw * 04 :

De nombreux chercheurs ont signalé le rôle des allèles ou haplotypes HLA dans la susceptibilité au VIH-1 et la progression de l'infection vers le SIDA [756-758]. L'haplotype B*35-Cw*04 a toujours été associé à une progression rapide vers le SIDA, ce qui aide le virus à échapper à la défense immunitaire en réduisant l'activité des cellules tueuses naturelles (*Natural Killer* ou *NK*) contre le VIH-1.

HLA-B*27 :

Il a été prédit que HLA-B*27 exerce un effet protecteur contre la progression vers le SIDA chez les individus infectés par le VIH-1. Il présente un épitope qui ne subit pas facilement de mutation, empêchant ainsi le virus de s'échapper du système immunitaire [759, 760].

HLA-B*57 :

Il a été rapporté que le HLA-B*57 est associé à un retard de la progression vers le SIDA [757, 758, 761]. Les réponses des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) qui ciblent plusieurs peptides

du VIH-1 sont restreintes par les molécules B57 [762]. Cette large spécificité de reconnaissance peptidique de B57 pourrait améliorer son activité contre l'infection par le VIH-1.

HLA-Bw 4 :

HLA-Bw 4 fonctionne comme un ligand spécial pour les récepteurs KIR (*killer cell Ig-like receptor*), qui sont exprimés principalement par les cellules NK et qui inhibent l'activité cytotoxique des cellules NK contre les cibles autologues [763]. Il a été démontré que l'homozygotie pour le HLA-Bw4 était significativement associée à la suppression de la virémie du VIH-1 et une progression lente vers le SIDA. Cela suggère que l'homozygotie pour le HLA peut dans certains cas être impliqué dans la lutte contre l'infection au VIH-1 [764].

HLA-B*35-Px :

HLA-B*35 est réparti en deux groupes, HLA-B*35Px et HLA-B*35PY. Le HLA-B*35Px se lie aux épitopes avec la proline en position 2 ainsi que plusieurs acides aminés en position 9 [765, 766]. Il a été démontré que HLA-B*35Px peut être associé à une progression accélérée vers le stade SIDA [767].

I.2.1.3 - Autres gènes liés à l'immunité

En plus de la variabilité au niveau des loci HLA, d'autres gènes de l'immunité ont été impliqués dans la variation de la progression de la maladie. Des études ont montré que les cytokines peuvent avoir un effet inhibiteur ou stimulant la réplication du VIH-1 [768, 769].

Facteur de Nécrose Tumorale α (Tumor Necrosis Factor, TNF α) :

Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire qui a été associée à des maladies auto-immunes et infectieuses, et connue pour stimuler la réplication du VIH-1 dans les cellules [770, 771]. Des taux élevés du TNF- α ont été rapportés chez des patients atteints du SIDA [772]. Le gène codant pour le TNF- α est localisé sur le chromosome 6. Il est considéré comme un gène candidat intéressant pour la progression vers le SIDA, en raison de sa localisation à proximité des loci HLA de classe I et de classe II.

Quatre polymorphismes dans le promoteur du gène codant pour le TNF- α ont été identifiés, tous avec des transitions G \rightarrow A [773-775]. Une faible association de l'homozygotie pour -308A à la non-progression à long terme a été identifiée [776]. Il n'a pas été démontré que les autres polymorphismes peuvent jouer un rôle dans la progression de la maladie. L'allèle microsatellite *TNF c2* a également été associé à un retard de progression vers le SIDA [777].

Récepteur de l'interféron- α (IFNAR1) :

Les interférons de type 1 (IFN) constituent la première ligne de défense contre l'infection par le VIH-1 [778]. L'IFN- α est l'IFN de type 1 le plus connu qui agit via un récepteur appelé récepteur IFN- α (IFNAR). L'IFNAR est composé de deux sous-unités, IFNAR1 et IFNAR2, situées sur le chromosome 21q [779]. Deux SNP dans le gène IFNAR1, IFNAR1 -18339 G \rightarrow C (substitution d'une valine par une leucine dans l'exon) et IFNAR1-30127 C \rightarrow T (dans l'intron), qui sont en fort déséquilibre de liaison, étaient associés à la susceptibilité au VIH-1 [780].

Interleukine-10 (IL-10) :

L'IL-10 est une cytokine qui inhibe la croissance des macrophages [781] et elle est également connue pour inhiber la réplication du VIH-1 dans ces cellules [782, 783]. Le gène codant pour l'IL-10 est situé sur le chromosome 1. Une mutation C \rightarrow A dans la région promotrice du gène en position 592 a été associée à une production réduite d'IL-10 [784], et donc à une augmentation de la susceptibilité au VIH-1 et une progression accélérée vers le SIDA [785, 786]. Le mécanisme moléculaire derrière cela n'est pas bien compris, mais il a été prédit que l'IL-10 pourrait contrôler la prolifération du VIH-1 en limitant le nombre de macrophages activés disponibles pour la réplication du VIH-1. L'IL-10-592C>A a été observé chez 23,6% des Caucasiens, 40% des Afro-Américains, 33% des Hispaniques et 60% des Asiatiques.

Interleukine-4 (IL-4) :

L'IL-4 est une cytokine importante qui induit la différenciation des lymphocytes T auxiliaires naïfs (lymphocytes Th0) en lymphocytes Th2. Elle régule également l'expression de CCR5 et CXCR4, les principaux corécepteurs impliqués dans l'entrée du VIH-1 dans les cellules T CD4+. L'IL-4 est localisée sur le chromosome 11. Un SNP I50 V dans l'exon 5 du gène codant pour le récepteur de l'IL-4 affecte la fonction de ce dernier [787]. Ce SNP peut être associé à une progression lente vers le SIDA chez les individus infectés par le VIH-1 [788].

Lectine liant le mannose (MBL) :

La MBL aide à la médiation de la défense de première ligne contre divers agents pathogènes avant que la protection immunitaire adaptative ne soit établie [789]. Le gène codant pour la MBL est localisé sur le chromosome 10. Le taux de la MBL circulante est réduit par des polymorphismes dans le premier exon du gène *MBL* [790, 791] entraînant des changements

d'acides aminés : G → D au codon 54 (allèle B), G → E au codon 57 (allèle C) et R → C au codon 52 (allèle D).

Il a été observé que l'homozygotie pour toute combinaison des variants alléliques (B, C, D) est associée à l'augmentation de la susceptibilité au VIH-1 une progression rapide vers le SIDA [792-795]. En revanche, une autre étude a observé une faible association de ces allèles mutés avec une progression retardée vers le SIDA [796].

Récepteurs KIR :

Les cellules NK fournissent une défense précoce contre les infections virales en produisant des cytokines et par cytotoxicité directe [797]. Les KIR régulent l'activation des cellules NK par reconnaissance des molécules HLA de classe I. Les KIR sont localisés sur le chromosome 19 et sont hautement polymorphes comme les HLA. L'activité des cellules NK est régulée par la présence des molécules KIR et HLA de classe I. Il a été démontré que l'allèle *KIR3DS1* en combinaison avec les allèles *HLA-B* qui codent pour l'isoleucine en position 80 (*HLA-B Bw-80Ile*), est associé à une progression retardée vers le SIDA [798, 799].

Un autre allèle KIR, *KIR3DL1* en association avec *HLA-B* est également associé à la progression vers le SIDA [800].

TSG101, PPIA et PML :

Ces trois gènes participent au cycle du VIH-1.

Le gène *TSG101* (*Tumor Susceptibility Gene 101*), localisé sur le chromosome 11, participe au bourgeonnement du VIH-1.

PPIA (*Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase A*) est le gène codant pour la cyclophiline A qui est incorporée dans la particule virale par l'interaction avec la capsid virale. Ce gène est localisé sur le chromosome 7p.

Le gène *PML* (*ProMyelocytic Leukemia*) est impliqué dans la réponse antivirale intrinsèque contre l'infection virale. Ce gène est localisé sur le chromosome 15q.

Les SNP suivants ont été identifiés au niveau de ces trois gènes : TSG101-183 T → C, PPIA 1650 A → G et PML-225 A → T. Il a été observé que TSG101-183C, PPIA-1650G et PML-

225T accélèrent la progression vers le SIDA [801]. Les mécanismes biologiques derrière cet effet ne sont pas encore compris.

APOBEC3G :

Le gène codant pour APOBEC3G désamine les résidus de cytidine dans le brin négatif d'ADN nouvellement synthétisé provoquant une hypermutation G → A dans le génome du VIH-1 [802-804]. Il s'agit d'un mécanisme général de défense innée contre tous les rétrovirus. Ce gène est localisé sur le chromosome 22q. Un SNP H186R dans ce gène a été étudié dans le but de mettre en évidence son effet sur la progression vers le SIDA.

Le génotype 186R / R était significativement associé à une progression rapide vers le SIDA et la mort chez les Afro-Américains infectés par le VIH-1 [805]. Ce SNP est rare chez les Américains européens (f = 0,03) et les Caucasiens européens (f = 0,05) mais fréquent chez les Afro-Américains (f = 0,37). La localisation de ce SNP dans une région riche en leucine pourrait être impliquée dans une interaction protéine-protéine. La perturbation de ce site pourrait entraîner une altération de la fonction de l'enzyme codée par le gène *APOBEC3G* [806].

Le récepteur de type Toll 9 ou TLR 9 :

Les TLRs jouent un rôle clé dans l'immunité innée. Au cours de l'infection par le VIH-1, les TLR peuvent influencer la réplication virale [807, 808]. Des mutations dans les gènes codant pour les TLR ont été associées à la susceptibilité ou la résistance aux différentes infections virales. Deux SNP (1635A → G et + 1174G → A) ont été détectés dans le gène *TLR 9*, situé sur le chromosome 3p. Ces deux SNP sont associés à une progression rapide vers le SIDA [809].

FcγRIIIa :

FcγR est le récepteurs du Fc des Immunoglobulines G trouvé à la surface des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques [810]. Les FcγR trouvés sur ces cellules sont FcγRI, FcγRIIIa, FcγRIIb et FcγRIIIa [811]. Le gène *FcγR* est localisé sur le chromosome 1q. Les polymorphismes de ce gène affectent la clairance virale. Le gène *FcγRIIIa* code pour une histidine (H) ou une arginine (R) à la position 131 [812]. Plusieurs groupes de chercheurs ont étudié le rôle du polymorphisme du gène *FcγRIIIA* dans l'infection par le VIH-1 et la progression de la maladie. Il a été démontré que le génotype de ce gène peut être un facteur prédictif de la progression de l'infection par le VIH-1. Plus précisément, les patients infectés par le VIH-1

porteurs de génotypes RR progressent vers un nombre de cellules T CD4+ <200 cellules / mm³ plus rapidement que les individus porteurs du génotype HH, ou du génotype RH. Cependant, la même étude a également démontré que les individus porteurs du génotype HH étaient plus susceptibles de développer une pneumonie à *Pneumocystis jirovecii*, qui est une des maladies opportunistes définissant le SIDA [813]. De même, le génotype HH a été associé à un risque accru de paludisme placentaire chez les femmes infectées par le VIH-1 [814] et d'autres infections périnatales [815].

I.2.2 - Facteurs démographiques et clinico-biologiques

La susceptibilité ou le risque d'infection par le VIH-1 est également influencé par divers autres facteurs liés à l'hôte. Le stade de l'infection a été associé à l'acquisition du VIH-1. À savoir, les personnes atteintes d'une infection aiguë avec une charge virale élevée sont plus susceptibles de transmettre le virus que les patients aux autres stades de l'infection [593, 816, 817]. Les lésions de la muqueuse génitale et l'absence de circoncision masculine peuvent également contribuer à un risque élevé de contracter le VIH-1 [598, 601]. La voie d'exposition au VIH-1, que ce soit directement via le sang ou à travers les muqueuses, par exemple, peut également affecter de manière significative la susceptibilité au VIH-1.

Concernant la progression de l'infection par le VIH-1, elle peut également être influencée par :

- **L'âge :** Il a été démontré que l'âge au moment de la séroconversion, a un impact considérable sur la progression de la maladie. Les études ont prouvé la présence d'une association entre l'âge du patient et le taux des cellules T CD4+ ainsi que la charge virale [818-820]. Il existe une relation claire entre l'augmentation du risque de progresser vers le SIDA et l'âge. Par exemple, une personne de 25 ans avec un taux des T CD4+ de 200 et un taux d'ARN-VIH-1 de 3000 a un tiers du risque de progression de la maladie par rapport à une personne de 55 ans [820].

Un âge plus avancé est associé à des taux faibles de cellules T CD4+ lors de la séroconversion, ce qui peut expliquer la relation entre l'âge et la progression de la maladie [821, 822]. Cependant, les disparités d'âge semblent diminuer avec le traitement HAART. La numération des cellules T CD4+ et le taux d'ARN-VIH-1 deviennent des indicateurs pronostiques plus utiles [822]. Il semble donc que le HAART atténue l'effet de l'âge sur la progression de la maladie [823].

- **Le sexe :** Certaines études ont démontré que les femmes développent le SIDA à des taux de lymphocytes T CD4 + plus élevés que les hommes [824]. Cependant, cette différence peut être due à l'accès réduit aux soins plutôt qu'aux effets biologiques. À l'inverse, d'autres études ont démontré que, pour un nombre de lymphocytes T CD4 + donné, les femmes peuvent avoir une charge virale inférieure de 0,3 log₁₀ à celle des hommes [825]. Cette différence est plus apparente durant les 4 années qui suivent la séroconversion [826]. Après cette période, la charge virale chez les femmes augmente de façon significative. Cette augmentation tardive de la charge virale du VIH chez les femmes peut expliquer l'absence de différences entre les sexes dans la progression de la maladie, observée dans d'autres études transversales [827]. Les mécanismes sous-jacents de ces différences observées restent indéfinis. Aucune différence liée au sexe n'était observée pour la progression clinique après séroconversion [828].

I.2.3 - Facteurs psychosociaux

Il est important de comprendre l'interaction entre les facteurs physiques et psychosociaux dans la progression de la maladie pour maximiser les soins holistiques pour le patient. Plusieurs études ont trouvé des associations significatives entre les mauvais résultats cliniques et le manque de satisfaction à l'égard du soutien social, les événements stressants de la vie et la dépression [829-832]. D'autres études ont trouvé de fortes corrélations entre la faible observance thérapeutique et la dépression, le célibat et l'itinérance [833, 834].

La stigmatisation est l'un des facteurs les plus importants qui produit et prolonge les effets psychologiques négatifs associés au VIH-1 et au SIDA chez les personnes infectées. De nombreux chercheurs ont démontré que la stigmatisation empêche la majorité des personnes infectées d'obtenir des soins médicaux, d'adopter des mesures préventives ou de demander des conseils, ce qui peut conduire à une progression plus rapide vers le SIDA [835].

Les facteurs culturels peuvent également influencer la perception de la maladie et l'attitude des patients séropositifs envers le traitement antirétroviral et ses avantages. Il a été démontré que les patients qui ont des croyances culturelles traditionnelles strictes peuvent avoir tendance à demander la consultation des guérisseurs traditionnels, ce qui peut par la suite limiter leur adhésion au traitement antirétroviral, ainsi que l'accès aux établissements de santé [836].

La prise en charge des patients doit donc inclure la prise en compte du contexte psychosocial.

DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX DE THESE





Chapitre I : MATERIEL ET METHODES

I - SCHEMA DE L'ETUDE

L'enquête que nous avons menée est une étude observationnelle de type cas-témoin.

II - POPULATION ETUDIEE

II.1 - Groupe des cas

Des échantillons de sang de personnes infectées par le VIH-1, appartenant à différentes régions du pays, ont été collectés à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V de Rabat au cours de la période 2012-2014. Tous ces patients ont été confirmés comme étant séropositifs au VIH-1 par western blot et PCR en temps réel, et avaient reçu un traitement antirétroviral basé sur l'association d'une trithérapie (HAART) qui consiste en l'association des INTI, des INNTI et des IP.

Les données démographiques (notamment le sexe, l'âge lors du diagnostic, l'origine géographique et ethnique et le mode de transmission présumé), clinique (stade clinique) et biologiques (notamment le taux de lymphocytes T CD4+ et la charge virale VIH-1), ont été recensées à partir des dossiers médicaux des patients (annexe I).

Les critères d'inclusion dans cette étude étaient donc la nationalité (marocaine) et l'âge (≥ 18 ans lors du diagnostic).

II.2 - Groupe des témoins

Ce groupe est constitué des donneurs de sang, recensés au niveau du centre de transfusion sanguine de l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V de Rabat en 2014. Ces donneurs de sang militaires provenaient de différentes régions du pays et ont été confirmés séronégatifs pour le VIH-1 par le test ELISA. Les critères d'inclusion dans cette étude étaient également la nationalité marocaine, sain et confirmé séronégatif pour le VIH-1.

Les données démographiques (sexe, âge, origines géographique et ethnique) ont été recueillies sur une fiche d'information.

La population étudiée (cas et témoins) est composée d'Arabes, d'Arabo-berbères et de Berbères de différentes régions du Maroc : Tanger-Tétouan-Al Hoceima, Est, Fès-Meknès, Rabat-Salé-Kenitra, Béni Mellal-Khénifra, Casablanca-Settat, Marrakech-Safi, Drâa-Tafilalet, Souss-Massa, Guelmim-Oued Noun, Laayoune-Sakia El Hamra.

II.3 - Effectif analysé

Cette étude cas-témoins a ciblé au total 490 individus marocains :

- L'analyse du *CCR5-Δ32* a porté sur la totalité des individus recrutés : 148 cas et 342 témoins ;
- Le *CCR2 +190 G>A*, a été génotypé chez 300 individus (100 cas et 200 témoins) ;
- L'analyse du *SDF1 +801 G>A* a porté sur 100 cas et 195 témoins.

II.4 - Considération éthique

L'étude a été examinée et approuvée par le Comité d'éthique pour la recherche biomédicale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat (annexe II). Le comité d'éthique pour la recherche biomédicale de Rabat est enregistré auprès de l'Office for Human Research Protections du Département américain de la santé et des services sociaux sous le numéro IORG0006594

La recherche a été menée conformément aux principes éthiques. Pour garantir l'anonymat, nous avons identifié les participants par des codes numériques, et avons assuré la confidentialité des données. Un consentement écrit a été exigé de tous les participants.

III - METHODES

III.1 - Prélèvements sanguins

Le sang veineux des cas et des témoins a été prélevé dans 2 tubes EDTA. Après centrifugation, et aliquotage du plasma, on a récupéré la couche leuco-plaquettaire (*buffy coat* en anglais). Ce *buffy coat* a été aliquoté dans un cryotube et conservé à -20°C .

III.2 - Quantification de l'ARN viral et détermination du taux des lymphocytes T CD4+

La quantification de l'ARN viral plasmatique (charge virale) du VIH-1 été réalisée sur le système *COBAS® AmpliPrep/ COBAS® TaqMan® HIV-1, v2.0* (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) avec une limite de détection de 20 copies/mL. Le taux des lymphocytes T CD4+ a été obtenu par cytométrie de flux à l'aide du cytomètre de flux *Navios* (*Beckman-Coulter Life Sciences*, États-Unis).

III.3 - Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique a été extrait à partir du *buffy coat* à l'aide du kit d'extraction d'ADN génomique *ISOLATE II Blood DNA Kit (Bioline, Londres, Royaume-Uni, P/N : BIO-52064)* en suivant le protocole expérimental fourni par le kit (annexe III).

III.4 - Dosage et contrôle de la pureté de l'ADN

La quantification et la pureté de l'ADN extrait ont été effectuées à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, USA) en déposant d'abord 1 μ L d'échantillon. Ensuite, la concentration de l'ADN extrait est déterminée par une mesure de l'absorbance (ou densité optique) à 260 nm. Parallèlement, la pureté de cet ADN est déterminée en mesurant l'absorbance à 230 nm, 260 nm et 280 nm. Si les rapports A^{260} / A^{230} et A^{260} / A^{280} sont proches de 2, on considère que l'ADN extrait est pur (figure 48). Enfin, les aliquotes d'ADN extrait contrôlés ont été conservés à -20 °C jusqu'à l'analyse.

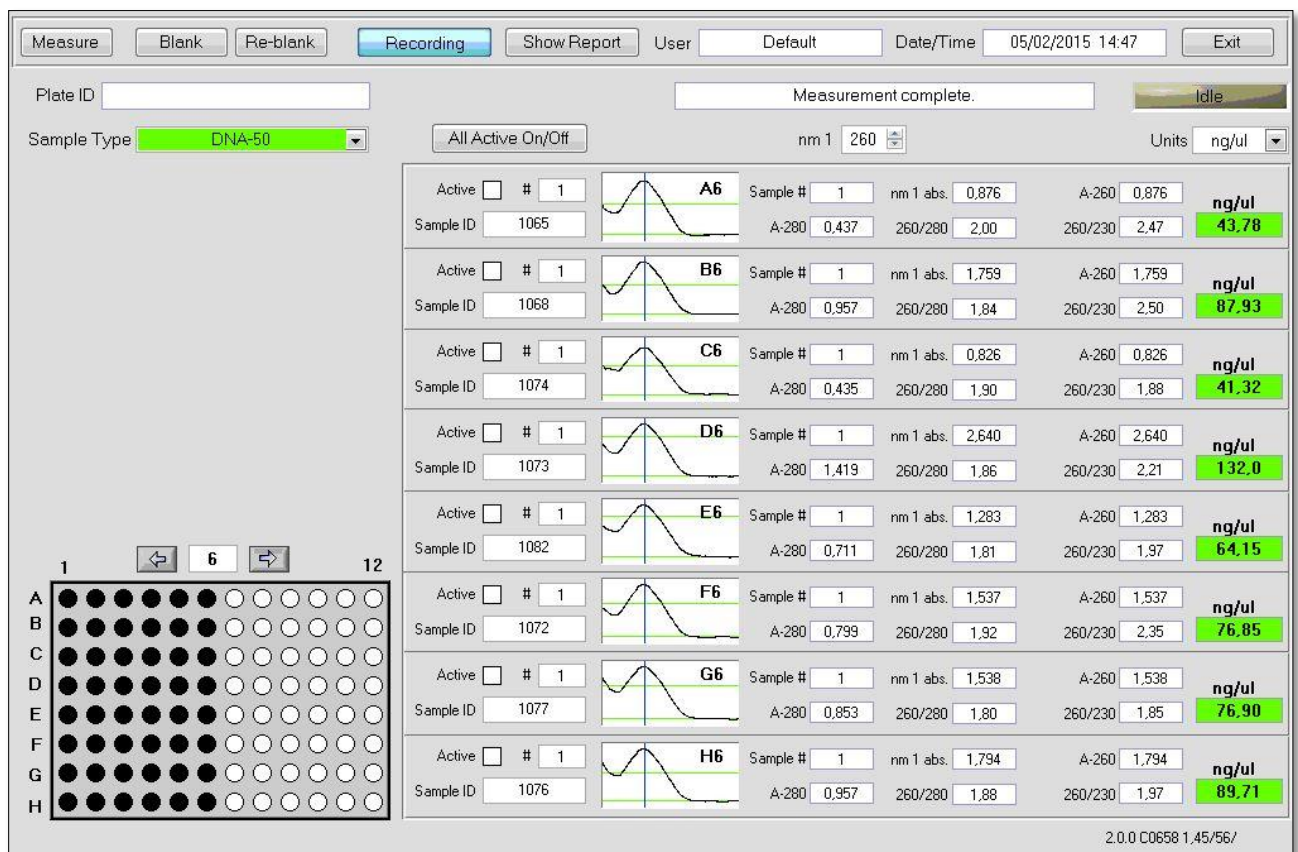


Figure 48 : Dosage et contrôle de la pureté des échantillons d'ADN

III.5 - Géotypage du polymorphisme *CCR5-Δ32* (rs333)

Amplification par PCR :

Le polymorphisme *CCR5-Δ32* (rs333) a été analysé par PCR conventionnelle en utilisant une paire d'amorces spécifiques [743]: ***CCR5-Δ32 F*** : 5'CGTCTCTCCCAGGAATCATC-3' et ***CCR5-Δ32 R*** : 5' AGGGAGCCCAGAAGAAAA-3', qui encadrent la séquence contenant la mutation *CCR5-Δ32*.

La réaction d'amplification a été réalisée dans un mélange réactionnel de 25 µL contenant 150 ng d'ADN génomique, 1 µl de chaque amorce 20 µM, 5 µl de tampon de réaction MyTaq™ (×5), 0,2 µl d'ADN polymérase MyTaq™ (*Bioline*, Londres, Royaume-Uni, P/N : BIO-21105), et de l'eau ultra pure pour compléter le volume (selon le besoin).

L'amplification a été effectuée dans un thermocycleur Veriti (*Applied Biosystems*) selon le programme suivant :

- Dénaturation initiale à 95 °C pendant 1 minute ;
- Amplification génique de 35 cycles [15 secondes à 95°C (dénaturation), 20 secondes à 52°C (hybridation) et 15 s à 72°C (élongation)] ;
- Elongation finale de 3 minutes à 72°C.

Analyse des produits PCR et détection du polymorphisme *CCR5-Δ32* :

Les produits PCR ont été analysés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 3% (*Sigma-Aldrich*, USA) coloré avec du bromure d'éthidium, en déposant dans chaque puits 9 µL de chaque produit PCR mélangé avec 1 µL du tampon de chargement (*Sigma-Aldrich*). Un marqueur de poids moléculaire ≈ 100 a été également logé dans le gel parallèlement aux produits PCR. La migration a été faite à température ambiante et a duré 45 min à 100 V dans du TAE 1X comme tampon de migration. Le gel a été enfin révélé sous lumière UV à 254 nm puis photographié et analysé en utilisant le G : BOX gel documentation system (*Syngene*).

La mutation *CCR5-Δ32* correspond à une délétion de 32 pb, qui se manifeste par la modification de la taille du gène. Cette visualisation a permis donc de distinguer directement le fragment d'ADN contenant la mutation recherchée, sans recours à une digestion enzymatique. La PCR a généré des fragments de 276 pb et 244 pb correspondant au type sauvage (*CCR5*) et au type

muté ($\Delta 32$) respectivement. La présence des deux fragments désigne un génotype hétérozygote ($CCR5/\Delta 32$) (Figure 49).

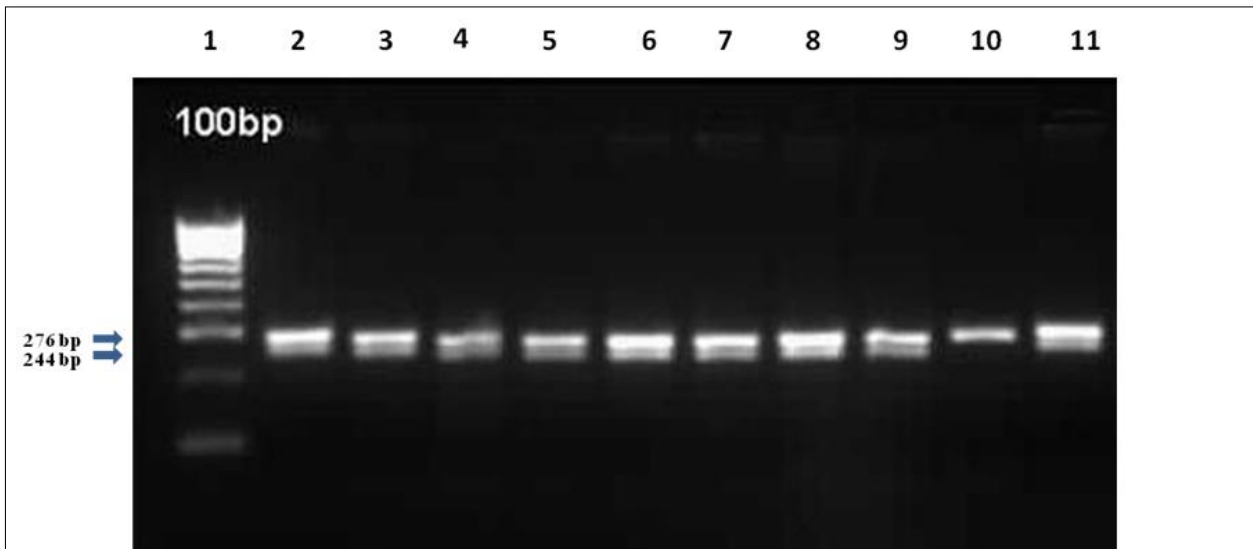


Figure 49 : Electrophorèse sur gel d'agarose (3%) des produits d'amplification de la séquence contenant le polymorphisme $CCR5-\Delta 32$. (Puit 1) : marqueur de poids moléculaire de 100 pb ; (puits 2.3.4.5.6.7.8.9.11) : génotype hétérozygote ($CCR5/\Delta 32$) ; (puit 10) : génotypes homozygotes de type sauvage ($CCR5/CCR5$). Ce gel permettait de montrer surtout la qualité des bandes correspondantes au profil hétérozygote

III.6 - Génotypage du polymorphisme $CCR2 +190 G>A$ (rs1799864)

Amplification par PCR :

Le polymorphisme $CCR2+190 G>A$ (Val64Ile, rs1799864) a été analysé par PCR conventionnelle en utilisant une paire d'amorces spécifiques [743]: $CCR2-64I F$: 5' CGGTGCTCCCTGTCATAAAT-3' et $CCR2-64I R$:5'-TGTCAGTCAAGCACTTCAGC-3'.

La PCR a été réalisée dans un mélange réactionnel de 25 μ L, contenant 150 ng d'ADN génomique, 1 μ l de chaque amorce 20 μ M, 5 μ l de tampon de réaction MyTaq™ ($\times 5$), 0,2 μ l d'ADN polymérase MyTaq™ (*Bioline*, Londres, Royaume-Uni, P/N : BIO-21105), et de l'eau ultra pure pour compléter le volume (selon le besoin).

Les paramètres d'amplification étaient les suivants :

- Dénaturation initiale à 95 °C pendant 1 minute ;
- Amplification génique de 35 cycles [15 secondes à 95°C (dénaturation), 20 secondes à 54°C (hybridation) et 15 s à 72°C (élongation)] ;
- Elongation finale de 3 minutes à 72°C.

L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur Veriti (*Applied Biosystems*).

Visualisation des produits de PCR :

Les produits PCR ont été visualisés par électrophorèse en suivant le même protocole adopté pour la visualisation des produits PCR issus du génotypage du polymorphisme *CCR5- Δ32*. La PCR a généré un fragment de 152 pb (figure 50).

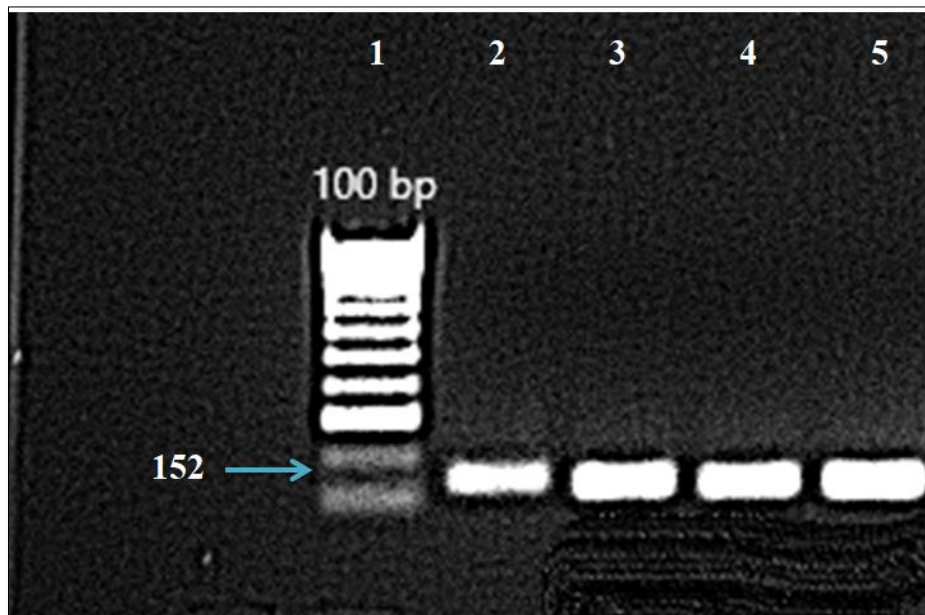


Figure 50 : Electrophorèse sur gel d'agarose (3%) des produits d'amplification de la séquence contenant le polymorphisme *CCR2 +190 G>A*. (puits 1) : marqueur de poids moléculaire de 100 pb ; (puits 2.3.4.5) : produits PCR

Séquencage :

Le polymorphisme *CCR2 +190 G>A* a été détecté par la technique du séquençage de l'ADN.

- Purification Produits PCR :

La purification des produits de PCR a pour but d'enlever les amorces et les nucléotides (dNTPS) non utilisés durant la réaction PCR. Cette purification est réalisée à l'aide d'une exonucléase et une phosphatase alcaline (ExoSAP-IT, *Affymetrix*) selon le protocole suivant : un mélange constitué de 2 μ L d'ExoSAP-IT et 5 μ L du produit PCR est incubé premièrement à 37°C pendant 15 minutes pour dégrader les amorces et les nucléotides libres, puis à 80°C pendant 15 minutes afin d'inactiver les enzymes (annexe IV).

- Réaction de séquence :

Les réactions de séquence sont préparées manuellement en microplaques de 96 puits. Le mélange réactionnel (Mix) utilisé est composé des réactifs suivants (tableau III).

Tableau III : Mélange réactionnel de la réaction de séquence

Mélange réactionnel pour une réaction de séquence	Quantité en μL
1. BigDye	1 μL
2. 5X sequencing buffer	2 μL
3. Primer (10 pmol/ μL)	0.3 μL
4. H ₂ O (MiliQ)	5,7 μL
5. ADN matrice	1 μL
Volume final	10 μL

La réaction de séquence est réalisée dans un volume final de 10 μL en ajoutant 8 μL du Mix dans chaque puits contenant 2 μL de produit PCR. Ensuite, la plaque est chargée dans le thermocycleur.

Le programme du thermocycleur est détaillé dans le tableau IV.

Tableau IV : Programme de PCR de séquence

Cycle	Temps	Température °C	
Dénaturation initiale	1 minute	96°C	
Dénaturation	10 secondes	96°C	x 25 cycles
Hybridation	5 secondes	50°C	
Elongation	4 minutes	60°C	

- Purification des produits de la réaction de séquence :

Cette étape a pour but d'éliminer les sels, les ddNTP, et les dNTP non incorporés afin d'éviter leur injection dans les capillaires du séquenceur automatique. Le mélange à purifier est constitué de 10 μL de produits séquencés et 20 μL d'eau MiliQ (stérile). Ce mélange est purifié en utilisant les puits de séphadex G50 (*Sigma-Aldrich*) préalablement préparés et conservés à +4°C (annexe V).

- Electrophorèse capillaire et assemblage des séquences :

Les échantillons purifiés sont ensuite déposés dans une plaque 96 puits, et chargés sur un séquenceur automatique ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer (*Applied Biosystem*) pour une électrophorèse capillaire.

Les électrophorégrammes sont par la suite recueillis sous forme de pics de fluorescence. La visualisation et la comparaison des électrophorégrammes est réalisée à l'aide d'un logiciel (Sequence Scanner v1.0, *Applied Biosystem*). Le logiciel Sequence Scanner, génère également des rapports complets et détaillés sur la qualité de chaque séquence. Les séquences sont ensuite vérifiées pour les nucléotides présentant des ambiguïtés, puis assemblées à l'aide du logiciel DNA Dragon Version 1.6.0 (*Sequentix-Digital DNA Processing, Germany*) disponible sur le lien suivant : (<http://www.dna-dragon.com>).

III.7 - Génotypage du polymorphisme *SDF1* +801 G>A (rs1801157)

Amplification par PCR :

Le polymorphisme *SDF1* +801 G>A (rs1801157) a été analysé par PCR conventionnelle en utilisant une paire d'amorces spécifiques encadrant la séquence contenant la mutation : *SDF1* +801 G>A F : 5' CAGTCAACCTGGGCAAAGCC -3' et *SDF1* +801 G>A R : 5'-AGCTTTGGTCCTGAGAGTCC -3'.

La réaction d'amplification a été réalisée dans un mélange réactionnel de 25 µL, contenant 150 ng d'ADN génomique, 1 µl de chaque amorce 20 µM, 10 µl du MyTaq™ Mix (2X) (*Bioline*, Londres, Royaume-Uni, P/N : BIO-25041), et de l'eau ultra pure pour compléter le volume (selon le besoin).

L'amplification a été effectuée dans un thermocycleur Veriti (*Applied Biosystems*). Le programme utilisé était le suivant :

- Dénaturation initiale à 95 °C pendant 1 minute ;
- Amplification génique de 35 cycles [15 secondes à 95°C (dénaturation), 15 secondes à 60°C (hybridation) et 10 s à 72°C (élongation)] ;
- Elongation finale de 3 minutes à 72°C.

Visualisation des produits de PCR :

Les produits PCR ont été visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose concentré à 3% en suivant le même protocole décrit précédemment (*voir la section III.5*). La PCR a généré un fragment d'ADN de 302 pb (figure 51).

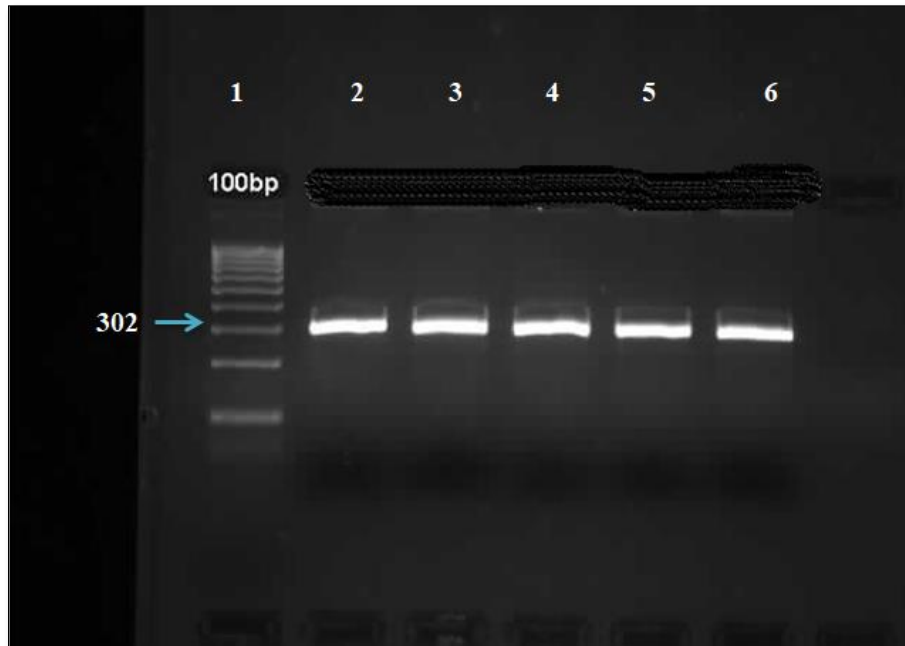


Figure 51 : Electrophorèse sur gel d'agarose (3%) des produits d'amplification de la séquence contenant le polymorphisme *SDF1 +801 G>A*. (puit 1) : marqueur de poids moléculaire de 100 pb ; (puits 2.3.4.5.6) : produits PCR

Séquencage :

Le polymorphisme *SDF1 +801 G>A* a été détecté par la technique du séquençage en suivant le même protocole décrit dans la *section III.6*. (Annexe VI)

III.8 - Evaluation de l'évolution immunovirologique

Selon le taux des lymphocytes T CD4⁺ et la charge virale VIH-1 après un an de traitement, des bons résultats immunovirologiques ont été définis par une augmentation de $\geq 25\%$ par rapport à la valeur initiale (au baseline) avec un passage d'un premier niveau < 200 à un deuxième niveau > 200 du taux des lymphocytes T CD4⁺, et une réduction de la charge virale VIH-1 d'au moins un logarithme, par rapport à la mesure initiale (baseline).

III.9 - Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) et l'outil en ligne SNPStats [837]. Les fréquences génotypiques et alléliques ont été déterminées par simple comptage. Pour évaluer si la population est en équilibre de Hardy-Weinberg, les fréquences des génotypes ont d'abord été calculées à partir des fréquences des allèles. Ensuite, l'écart par rapport au nombre de génotypes observés a été déterminé à l'aide du test χ^2 .

La comparaison entre les variables a été effectuée à l'aide du test χ^2 , test exact de Fisher, test de Mann-Whitney ou test ANOVA, selon le cas.

L'association des polymorphismes *CCR2* +190 G>A et *SDF1* +801 G>A avec l'évolution immunovirologique a été analysée selon quatre modèles différents : codominant, dominant, récessif et additif.

Afin d'identifier les facteurs prédictifs d'une bonne évolution immunovirologique, des modèles de régression logistique univariée et multivariée ont été produits. L'effet de chaque facteur incluant les génotypes *CCR2* et *SDF1* a été évalué. Les variables dont la valeur-p était $< 0,20$ dans l'analyse univariée ont été incluses dans l'analyse multivariée. Les résultats sont décrits en Odds Ratio (OR) avec un intervalle de confiance de 95% et en valeur-p.

Pour tous les tests, les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme étant statistiquement significatives.



Chapitre II : RESULTATS ET DISCUSSION

I - LE POLYMORPHISME GENETIQUE *CCR5-Δ32* (RS333) ET SON ASSOCIATION AVEC LA SUSCEPTIBILITE AU VIH-1 ET LA PROGRESSION DE LA MALADIE CHEZ LES PATIENTS SOUS TRAITEMENT ANTIRETROVIRAL

I.1 - Contexte de l'étude

La susceptibilité à l'infection par le VIH-1 est due en partie à des caractéristiques génétiques. L'étude de ces caractéristiques pourrait être la clé pour contrôler cette infection virale. De nombreuses études ont porté sur les différents mécanismes impliqués dans la résistance naturelle à l'infection par le VIH-1, et ont rapporté plusieurs facteurs associés à ce phénomène, notamment la présence de polymorphismes génétiques dans les corécepteurs du VIH-1. Parmi ces facteurs génétiques, la mutation *CCR5-Δ32* est la plus étudiée et est associée à la résistance naturelle à l'infection par le VIH-1, car elle peut inhiber l'entrée des souches R5. En outre, certains traitements contre l'infection par le VIH-1 ont même été développés sur la base de ces résultats.

La prévalence de la mutation *CCR5-Δ32* a été étudiée dans la plupart des populations du monde. Il a été rapporté que la distribution géographique de cette mutation est hétérogène : les fréquences les plus élevées de cette mutation ont été observées chez les Caucasiens, en comparaison avec l'Afrique et l'Asie [14].

Au Maroc, une étude précédente menée sur 167 individus séronégatifs pour le VIH-1 a démontré que l'allèle muté *CCR5-Δ32* est présent dans la population marocaine à une faible fréquence [17]. Cependant, aucune étude n'avait auparavant traité la distribution de cet allèle et son association avec la susceptibilité au VIH-1 et la progression de la maladie chez les patients séropositifs au VIH-1.

Dans ce contexte, et devant la rareté des données relatives à ce sujet au Maroc, il s'est avéré nécessaire d'étudier davantage ce polymorphisme chez la population marocaine. Cette étude est donc la première de son genre au Maroc qui analyse ce volet.

I.2 - Résultats

I.2.1 - Caractéristiques démographiques et cliniques

Les caractéristiques des cas et des témoins ayant participé à cette étude sont représentées dans le tableau V. L'âge médian des 148 patients (cas) au diagnostic était de 35 ans (IQR 25-75% :

30 ; 41) et la majorité étaient des hommes (74%), Arabes (66%), infectés par voie hétérosexuelle (84%) et classés dans la catégorie clinique CDC A (66%). Parmi les 342 témoins, 83% étaient des hommes, 69% étaient des Arabes et l'âge médian était de 29 ans (IQR 25-75% : 25,0 ; 37,0).

Tableau V : Caractéristiques de la population étudiée

Caractéristiques	Cas n=148	Témoins n=342
Sexe, n (%)		
Hommes	109 (74)	285 (83)
Femmes	39 (26)	57 (17)
Origine ethnique, n (%)		
Arabe	98 (66)	237 (69)
Berbère	42 (28)	93 (27)
Arabo-berbère	8 (6)	12 (4)
Groupe d'âge^a, n (%) :		
16-24	11 (7.43)	57 (16.7)
25-34	61 (41.22)	174 (50.9)
35-44	52 (35.14)	69 (20.2)
45-54	23 (15.54)	36 (10.5)
55-81	1 (0.67)	6 (1.7)
Transmission, n (%)		
Hétérosexuelle	125 (84)	-
Inconnue	23 (16)	-
Stade clinique (CDC), n (%)		
A	98 (66)	-
B	35 (24)	-
C	15 (10)	-

^a Groupe d'âge des cas lors du diagnostic de l'infection par le VIH-1

Le taux des cellules T CD4+ et la charge virale ARN VIH-1 des patients ont été enregistrés au *baseline* (avant de commencer la thérapie antirétrovirale), après 1 an, 2 ans, 3 ans et lors du dernier suivi (tableau VI).

Tableau VI : Mesures du taux des cellules T CD4+ et de la charge virale VIH-1 chez le groupe des cas (n= 148)

	Baseline n (%)	Un an après ARV n (%)	2 ans après ARV n (%)	3 ans après ARV n (%)	Dernier suivi n (%)
Intervalles Taux T CD4+ (cellules/mm3)					
< 200	35 (24)	18 (12)	11 (07)	07 (05)	05 (03)
[200-350 [26 (18)	26 (18)	19 (13)	19 (13)	12 (8)
[350-500 [40 (27)	27 (18)	28 (19)	27 (18)	32 (22)
≥500	44 (30)	54 (36)	56 (38)	59 (40)	74 (50)
Manquant	03 (01)	23 (16)	34 (23)	36 (24)	25 (17)
Intervalles charge virale (log10 copies/mL)					
Indétectable	0 (0)	35 (24)	45 (31)	62 (42)	57 (39)
< 2	0 (0)	31 (21)	39 (26)	31 (21)	31 (21)
[2 – 5]	86 (58)	57 (38)	37 (25)	28 (19)	34 (23)
>5	60 (41)	09 (06)	06 (04)	05 (03)	05 (03)
Manquant	02 (01)	16 (11)	21 (14)	22 (15)	21 (14)

- ARV : traitement antirétroviral

I.2.2 - Distribution génotypique et allélique du polymorphisme *CCR5-Δ32*

La distribution des fréquences génotypiques du polymorphisme *CCR5-Δ32* était en équilibre de Hardy-Weinberg (HWE) chez les cas ($\chi^2 = 0,0868$), et également chez les témoins ($\chi^2 = 0,0268$). Aucune différence significative n'a été observée entre les nombres des génotypes observés et attendus chez les deux groupes (tableau VII).

Tableau VII : Comparaison entre les nombres des génotypes attendus et observés chez les cas et les témoins

Génotype	Cas				Témoins			
	Observé	Attendu	χ^2	p value	Observé	Attendu	χ^2	p value
CCR5 / CCR5	141	141.08	0.0868	0.768	336	336.0	0.0268	0.870
CCR5 / CCR5- Δ 32	7	6.83			6	5.94		
Δ 32 / Δ 32	0	0.08			0	0.02		

* Ce tableau présente les fréquences des génotypes CCR5 prédites par l'équilibre de Hardy Weinberg sur la base des fréquences des génotypes observés dans notre étude. Pour ces calculs, p indique la fréquence de l'allèle de type sauvage (CCR5) et q, la fréquence de l'allèle mutant (CCR5- Δ 32), où $p+q=1$. Une population en équilibre de Hardy-Weinberg présentera trois génotypes dont les proportions répondent à l'équation : $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Pour chaque génération, la fréquence du génotype homozygote de type sauvage (CCR5/CCR5) est donc p^2 et les fréquences des génotypes hétérozygote (CCR5/ Δ 32) et homozygote mutant (Δ 32/ Δ 32) sont respectivement $2pq$ et q^2 .

Comme le montre le tableau VIII, 7 patients (4,73 %) du groupe des cas étaient hétérozygotes pour l'allèle CCR5- Δ 32, contre 6 individus (1,75 %) du groupe témoin ($p = 0,071$). Aucun individu de la population étudiée n'était homozygote pour la mutation (Δ 32/ Δ 32). Les fréquences de l'allèle CCR5- Δ 32 étaient comme suit : 7 (2,36 %) chez les cas et 6 (0,88 %) chez les témoins. Aucune différence statistiquement significative dans la distribution des fréquences alléliques et génotypiques n'a été observée entre les deux groupes étudiés ($p = 0,072$).

Tableau VIII : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme CCR5- Δ 32 (RS333)

	Cas (n=148)	Témoins (n=342)	p value*
Génotypes (n/%)			
CCR5/CCR5	141 (95.27)	336 (98.25)	0.071
CCR5/ Δ 32	7 (4.73)	6 (1.75)	
Δ 32/ Δ 32	0	0	
Allèles, F (%)			
+	289 (97.63)	678 (99.12)	0.072
Δ 32	7 (2.36)	6 (0.88)	

*Valeur-p du test exact de Fisher

I.2.3 - Association entre le polymorphisme CCR5- Δ 32 et l'origine ethnique des participants à l'étude

L'association entre le polymorphisme CCR5- Δ 32 et l'origine ethnique des groupes des cas et des témoins a été évaluée. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée lorsque l'ethnie a été comparée entre les porteurs et les non-porteurs de l'allèle CCR5- Δ 32 ($p > 0,05$).

I.2.4 - Association entre le polymorphisme *CCR5-Δ32* et la progression de la maladie

Aucune association significative n'a été observée entre l'allèle muté et la charge virale VIH-1 ou le taux de cellules T CD4+ au *baseline* (avant l'initiation du traitement), après 1 an, 2 ans, 3 ans et au dernier suivi ($p > 0,05$) (tableau IX). Le stade clinique, également, n'était pas significativement associé au polymorphisme *CCR5-Δ32* ($p > 0,05$) (tableau IX).

L'analyse ci-dessus a été répétée après avoir exclu les patients avec des mesures manquantes du taux de T CD4+ ou de charge virale. De même, nous n'avons pas observé d'association significative entre *CCR5-Δ32* et ces marqueurs immunovirologiques de la progression de la maladie ($p > 0,05$).

Tableau IX : Comparaison du stade clinique et des marqueurs de la progression de la maladie VIH-1 entre les porteurs du polymorphisme *CCR5-Δ32* (*CCR5/Δ32*) et les non-porteurs (*CCR5/CCR5*) dans le groupe des cas (n= 148)

	CCR5/CCR5 (n= 141)	CCR5/Δ32 (n= 7)	<i>p value</i>
Charge virale (copies/mL),			
médiane [IQR]			
<i>Au baseline</i>	63450 [13490 ; 222654]	151450[10164,25 ; 395026,75]	0.653*
<i>1 an après ARV</i>	82.50 [20 ; 3572,75]	292 [20 ; 109428]	0.601*
<i>2 ans après ARV</i>	39 [20 ; 442]	39 [20 ; 42]	0.285*
<i>3 ans après ARV</i>	22 [20 ; 221,50]	29 [20 ; 93]	0.698*
<i>Dernier suivi</i>	23 [20 ; 3753]	20 [20 ; 26]	0.130*
Taux de T CD4+ (cellules/mm³), médiane [IQR]			
<i>Au baseline</i>	385 [192 ; 525]	488,50 [265 ; 599,50]	0.256*
<i>1 an après ARV</i>	450 [301 ; 630]	527 [354 ; 643]	0.369*
<i>2 ans après ARV</i>	490 [335 ; 691,50]	490 [404,50 ; 747]	0.549*
<i>3 ans après ARV</i>	501 [363 ; 690,50]	526 [398,25 ; 667]	0.480*
<i>Dernier suivi</i>	547 [412,75 ; 724,50]	618 [556 ; 805]	0.113*
Stade clinique (CDC), n (%)			
<i>A</i>	90 (65.7%)	5 (83.3%)	
<i>B</i>	33 (24.1%)	1 (16.7%)	0.602**
<i>C</i>	14 (10.2%)	0 (0%)	

ARV : thérapie antirétrovirale

* Valeur-p du test ANOVA

** Valeur-p du test Khi-deux de Pearson

I.3 - Discussion

Le rôle de CCR5 dans l'infection par le VIH-1 est devenu encore plus intéressant après la découverte de la mutation $\Delta 32$. La présence de cette mutation dans le gène *CCR5* est le facteur génétique le plus important lié à la résistance naturelle à l'infection par le VIH-1. Ce travail rapporte, pour la première fois au Maroc, l'association entre l'allèle *CCR5- $\Delta 32$* et la susceptibilité au VIH-1 ainsi que les marqueurs de progression de la maladie chez des patients Marocains sous traitement antirétroviral.

Plusieurs études ont rapporté que de cette mutation est plus fréquente dans les pays Européens, en particulier chez les Caucasiens (10%), par rapport à la plupart des populations africaine, asiatique et américaine [838-843]. Dans notre étude, nous avons montré que l'allèle muté *CCR5- $\Delta 32$* existe dans la population marocaine à une faible fréquence ; 0.0236 chez les cas contre 0.0088 chez les témoins. La présence de cet allèle chez les marocains est probablement due à la dérive génétique ou au mélange génétique avec des personnes d'origine européenne. De plus, la présence des groupes ethniques berbères et arabes a influencé la diversité génétique de la population marocaine.

L'analyse des données des fréquences génotypiques a révélé que la valeur du χ^2 était $< 3,84$, signifiant que la valeur-p est supérieure au seuil de signification de 0,05. Donc, l'hypothèse H_0 est acceptable et la population est à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Cela signifie qu'il n'existe pas de différence significative entre les fréquences génotypiques observées et attendues chez les patients et les témoins. Par conséquent, nous suggérons qu'il n'y a pas de pression de sélection sur un allèle par rapport à l'autre. Ceci contredit les résultats d'une étude précédente menée sur un nombre limité d'échantillons, qui suggérait que la distribution de l'allèle *CCR5- $\Delta 32$* est inégale dans les sous-populations saines marocaines [17].

Les résultats obtenus concernant la distribution du polymorphisme *CCR5- $\Delta 32$* chez le groupe témoin de notre étude sont proches de ceux rapportés par des études précédentes menées au Maroc [17], en Arabie Saoudite [844], en Iran [845], en Jordanie [846]. Une étude récente menée par Solloch et al. a également montré que l'allèle *CCR5- $\Delta 32$* existe chez des individus sains marocains, avec une fréquence légèrement plus élevée que celle observée dans notre étude [843]. En revanche, cet allèle muté est quasiment absent au Cameroun [847], au Taiwan et en Inde [848-850].

La fréquence du génotype hétérozygote *CCR5/Δ32* chez le groupe des cas était légèrement plus élevée, mais statistiquement non significative, que celle du groupe témoin ($p > 0,05$). Nous suggérons donc que l'hétérozygotie pour l'allèle *CCR5-Δ32* n'influence pas directement la susceptibilité au VIH-1 dans la population marocaine. Ce résultat est cohérent avec les conclusions de diverses études menées chez les Ouïgours [743], les Caucasiens Espagnols [851], la population de Gondar [852], et les Iraniens [853]. De même, une méta-analyse de 18 études incluant plus de 12 000 sujets, a rapporté que le génotype hétérozygote n'influence significativement pas la susceptibilité au VIH-1 [854]. Cependant, certaines études ont révélé une différence significative dans la fréquence du variant *CCR5-Δ32* entre les personnes saines et les personnes infectées par le VIH-1 [855]. L'absence du génotype homozygote dans notre population pourrait être relativement associée, à une augmentation de la susceptibilité au VIH-1 chez les Marocains.

Le rôle de la mutation *CCR5-Δ32* dans la progression de l'infection par le VIH-1 a également intéressé plusieurs chercheurs. De nombreuses études ont été réalisées pour évaluer si l'hétérozygotie pour l'allèle *Δ32* affecte la progression de la maladie. En effet, l'influence du caractère hétérozygote sur l'évolution de l'infection demeure un sujet de controverse. Badie et al. ont rapporté que la progression vers le SIDA était plus lente chez les personnes hétérozygotes que chez les patients présentant le génotype sauvage (*CCR5/CCR5*). Toutefois, ce résultat était statistiquement non significatif [856]. Néanmoins, d'autres études ont montré une association significative de la variante *CCR5-Δ32* avec une diminution du risque de progression vers le SIDA et le décès [674, 857]. Dans notre étude, la charge virale ARN VIH-1 et le taux des cellules T CD4⁺ ont été utilisés pour évaluer le taux de progression de l'infection par le VIH-1. Nous n'avons pas détecté d'association statistiquement significative entre l'allèle variant et les variables immunovirologiques des patients ($p > 0,05$). En outre, aucune association significative n'a été observée avec le stade clinique. Ceci est cohérent avec l'étude de Veloso et al., qui ont montré que la mutation *CCR5-Δ32* n'a pas d'effet significatif sur la progression de la maladie [851]. L'étude de Meyer et al., par contre, a révélé que la suppression d'un allèle du gène *CCR5* semble protéger contre la progression de l'infection, principalement pendant les premières années de l'infection, en maintenant une charge virale constamment faible [858].

Notre résultat doit être interprété avec prudence, car tous les patients inclus dans cette étude suivent un traitement antirétroviral qui affecte les marqueurs de la progression de la maladie (le taux des cellules T CD4⁺ et la charge virale), il est donc compliqué de détecter l'effet éventuel

de la mutation sur ces marqueurs. En outre, il se peut qu'il y eût chez certains patients, une émergence des souches X4 ou des souches dual-tropiques R5X4 au cours de l'infection qui sont capables d'influencer le taux des cellules CD4⁺ ou la charge virale [859, 860]. D'autres facteurs comme le sexe [861], l'âge au moment du diagnostic [822], le taux de cellules T CD4⁺ au baseline, les soins de santé, les coinfections [862] et la variabilité génétique virale [863], peuvent également influencer la progression de la maladie chez les patients. De plus, il a été rapporté que chez certains cas, même s'ils sont rares, les virus utilisant le CXCR4 pendant la primo-infection augmentent le risque d'une progression rapide de la maladie [864, 865]. Par ailleurs, le nombre limité des patients porteurs du génotype hétérozygote (*CCR5/Δ32*) dans la population marocaine, est probablement l'une des raisons pour lesquelles nous n'avons pas détecté une association significative entre le polymorphisme *CCR5-Δ32* et la progression de la maladie.

I.4 - Conclusion

Notre étude cas-témoin a montré que l'hétérozygotie du *CCR5-Δ32* pourrait ne pas influencer la susceptibilité à l'infection par le VIH-1. Ce résultat confirme les conclusions précédentes de plusieurs études. L'absence d'un effet protecteur de l'allèle *CCR5-Δ32* contre la progression de la maladie chez les patients marocains nécessite une confirmation par des études supplémentaires. Par ailleurs, l'absence du génotype homozygote (*Δ32/Δ32*) dans notre population étudiée était un obstacle possible pour pouvoir dévoiler les conséquences directes de la présence d'un récepteur CCR5 tronqué qui n'est pas exprimé à la surface cellulaire sur l'infection par le VIH-1.

I.5 - Publication

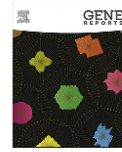
Cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue *GENE REPORTS* :

FARISSI FZ, El Annaz H, El Alaoui MA, Elkochri S, Tagajdid MR, Abi R, Alaoui Amine S, Alaoui N, Kasouati J, Touil N, Frikh R, Hjira N, El Fahime EM, Mrani S. **Investigation of CCR5-Δ32 (rs333) genetic polymorphism frequency and its relationship with HIV-1 susceptibility and disease progression: A Moroccan case-control study.** Gene Reports. 2019 ; 15 : p. 100391.



Contents lists available at ScienceDirect

Gene Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/genrep

Investigation of *CCR5-Δ32* (rs333) genetic polymorphism frequency and its relationship with HIV-1 susceptibility and disease progression: A Moroccan case-control study

Fatima Zahra Farissi^{a,f,*}, Hicham El Annaz^{a,f}, Moulay Abdelaziz El Alaoui^{b,f}, Safae Elkochri^f, Mohamed Reda Tagajdid^{a,f}, Rachid Abi^{a,f}, Sanaa Alaoui Amine^{b,f}, Najwa Alaoui^{a,f}, Jalal Kasouati^c, Nadia Touil^{a,f}, Rachid Frikh^d, Naoufal Hjira^{d,f}, El Mostapha El Fahime^{b,f}, Saad Mrani^{a,e,f}

^a Research Team in Molecular Virology and Oncobiology, Faculty of Medicine and Pharmacy, University Mohammed V in Rabat, Av. Mohamed Belarbi El Alaoui, ZIP 6203, Rabat, Morocco

^b Molecular Biology and Functional Genomics Platform, National Center for Scientific and Technical Research, CNRST, 8027, Rabat, Morocco

^c UPR of Public Health and Community Medicine, Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohamed V University of Rabat, Morocco

^d Department of Dermatology, Mohamed V Military Hospital in Rabat, Morocco

^e National Reference Laboratory, Mohammed VI University of Health Sciences, Casablanca, Morocco

^f Genomics Center for Human Pathologies, Faculty of Medicine and Pharmacy, University Mohammed V in Rabat, Morocco

ARTICLE INFO

Keywords:

HIV-1
Susceptibility
CCR5-Δ32
Chemokine receptor
HIV-1 disease progression
Moroccans

ABSTRACT

Background: Host genetic factors are involved in resistance/susceptibility to HIV-1 infection and progression. The most relevant genetic variant of the gene encoding HIV-1 major co-receptor, *CCR5-Δ32*, has a protective effect against HIV-1 infection, and the prevalence of this mutation varies by ethnicity. In Morocco, only limited information is available concerning this protective allele.

Objectives: The aim of this case-control study was to investigate the frequency of *CCR5-Δ32* among HIV-1 infected and uninfected individuals in Morocco and to assess the association between this protective allele and HIV-1 susceptibility and disease progression.

Patients and methods: A total of 148 HIV-1 seropositive (cases) and 342 healthy Moroccan individuals (controls) were recruited from Mohammed V Military Training Hospital in Rabat. The *CCR5-Δ32* variant was analysed by Polymerase Chain Reaction (PCR) assay. Comparison of Genotype and allele frequencies between cases and controls was performed using the χ^2 test and the Fisher exact test. Association between *CCR5-Δ32* polymorphism and HIV-1 disease progression was assessed using ANOVA test.

Results: 7 of 148 (4.73%) HIV-1 seropositive (cases group) were heterozygous for the *CCR5-Δ32* allele compared to 6 of 342 (1.75%) HIV-1 seronegative individuals (controls group). None of the analysed individuals had *CCR5-Δ32* homozygous genotype. No statistical significant association was found in the genotype distribution between cases and controls. Also, we didn't observe any significant association between *CCR5-Δ32* polymorphism and the markers of HIV-1 disease progression (HIV-1 viral load or CD4 cell counts) ($p > 0.05$).

Conclusion: The present results are the first findings on the association of *CCR5-Δ32* variant allele with HIV-1 susceptibility and the markers of HIV-1 disease progression among Moroccan HIV-1 seropositive patients. These results suggest that *CCR5-Δ32* mutation may not affect HIV-1 susceptibility in heterozygous individuals. Given the low frequency of the $\Delta 32$ mutated allele in our population, further studies are needed to confirm our results and evaluate the relationship between *CCR5-Δ32* polymorphism and HIV-1 disease progression in Morocco.

Abbreviations list: ART, antiretroviral therapy; CCL, chemokine (C–C motif) ligand; CCR5, C-C chemokine receptor type 5; CCR2, C-C chemokine receptor type 2; CDC, Centers for Disease Control and Prevention; CXCR-4, C-X-C chemokine receptor type 4; ELISA, the enzyme-linked immunosorbent assay; HAART, highly active antiretroviral therapy; HWE, Hardy–Weinberg equilibrium; IQR, interquartile range; SDF1, stromal cell-derived factor 1; VL, viral load; WT, wild type; $\Delta 32$, 32-base-pair deletion

* Corresponding author.

E-mail address: fz.farissi@yahoo.com (F.Z. Farissi).

<https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100391>

Received 6 November 2018; Received in revised form 6 March 2019; Accepted 12 March 2019

Available online 13 March 2019

2452-0144/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Human immunodeficiency virus (HIV) remains the world's most significant public health problems with 1.8 million of new infections annually (UNAIDS, 2017). In 2016, it was estimated that 36.7 million were living with human immunodeficiency virus (HIV) and a total of 1.8 million newly HIV infected worldwide (UNAIDS, 2017). In Morocco, the number of people living with HIV was estimated to be 22,000 in 2016 (UNAIDS, 2017). The highest rate of HIV infections (63%) was observed among young people (Kouyoumjian et al., 2013).

Susceptibility to HIV-1 infection depends on several factors; numerous studies revealed that host genetic factors affect resistance/susceptibility to HIV-1 and AIDS progression (Chatterjee, 2010; Coloccini et al., 2014). The role that plays chemokines and chemokine receptors in infectious diseases including HIV-1 infection is crucial. To enter host cells, the virion envelope glycoproteins (gp120) of HIV-1 interact with the CD4 molecule and its co-receptors (Berger et al., 1999).

The major HIV-1 co-receptor for primary macrophage tropic HIV-1 strains is C–C chemokine receptor 5 (CCR5) which recognizes CCL5, CCL3, CCL4, and CCL8 chemokine ligands (Ferreira-Fernandes et al., 2015; Slominski et al., 2017). This co-receptor is encoded by the *CMKBR5* gene located on human chromosome 3p21.31 and expressed on different types of cells including memory T cells, monocytes, macrophages, dendritic cells, microglia, neurons, astrocytes, endothelial cells, vascular smooth muscle and fibroblasts (Rottman et al., 1997). Moreover, it has been proven that CCR5 plays an important role in immune response (Barmania and Pepper, 2013).

A deletion of 32 nucleotides from the exon 1 of the *CCR5* gene, known as *CCR5-Δ32* mutation (rs333) produces a frame shift mutation at position 185 which affects CCR5 receptor expression and leads to the generation of non-functional receptor on lymphoid cell surfaces (Samson et al., 1996). As a result, individuals carrying this polymorphism, especially homozygous individuals have been found to be practically resistant to HIV-1 strains in various ethnicities (Liu et al., 1996; Jang et al., 2008). HIV-infected individuals, who are heterozygous for the $\Delta 32$ genotype, may have a better therapeutic response to HAART than *CCR5* homozygous (O'Brien and Moore, 2000; Laurichesse et al., 2007) and delayed HIV-1 disease progression to AIDS (Arenzana-Seisdedos and Parmentier, 2006). However, it has been observed some homozygous individuals (*CCR5-Δ32/Δ32*) which were HIV-1 seropositive (Tan et al., 2010; Gray et al., 2006; Ballana et al., 2013).

The worldwide distribution of *CCR5-Δ32* is heterogeneous. The highest frequencies of this mutation were observed among Caucasians, comparatively to Africa and Asia (Martinson et al., 1997).

Despite the important role of chemokines and chemokine receptors in immune response to HIV-1, limited data is available on the frequencies of genetic polymorphisms of HIV-1 co-receptors and their contribution both in HIV-1 resistance and AIDS progression among Moroccan individuals.

In Morocco, one previous study was conducted with HIV seronegative individuals and it was evidenced that *CCR5-Δ32* is present in Moroccan population at low frequency (Elharti et al., 2000). The current report is the first case-control study investigating the distribution of *CCR5-Δ32* polymorphism in Morocco and its association with HIV-1 susceptibility and disease progression among HIV-1 seropositive subjects.

The aim of the present study is twofold: firstly to investigate the *CCR5-Δ32* frequency among HIV-1 infected and uninfected Moroccan individuals and secondly to explore its association with hosts' susceptibility to HIV-1 infection and disease progression.

2. Materials and methods

2.1. Patients and controls

A total of 490 Moroccan individuals, randomly selected, were

included in this case-control study. 148 blood samples from HIV-1 infected individuals (aged ≥ 18 years), belonging to different regions of the country, were collected at Mohammed V Military Training Hospital in Rabat during the period of 2012–2014. All of these patients were confirmed as HIV-1 positive by western blotting and had received an antiretroviral therapy.

The control group included 342 unrelated Moroccan healthy blood donors, and was recruited at blood transfusion center in Mohammed V Military Training Hospital in Rabat in 2014. These military blood donors came from different parts of the country and were confirmed to be seronegative for HIV-1 by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The study was approved by the Ethics Committee for Biomedical Research in Rabat registered at the Office for Human Research Protections in US Department of Health and Human Services under the number IORG0006594, and was conducted with respect to legal aspects; anonymity and confidentiality of the data were preserved. Written informed consent was obtained from all participants.

2.2. Methods

2.2.1. RNA quantification and CD4 count

The HIV-1 viral load (VL) was performed using COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) with a detection limit of 20 HIV RNA copies/mL. The CD4 cell counts were obtained by flow cytometry using the Navios Flow Cytometer (Beckman Coulter Life Sciences, USA).

2.2.2. Isolation of genomic DNA

Genomic DNA was isolated from Buffy Coat using ISOLATE II Blood DNA Kit (Bioline, London, UK, P/N: BIO-52064) referring to the manufacturer's instructions. DNA purity was measured using NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). DNA aliquots were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until subsequent analysis.

2.2.3. Genotyping of *CCR5-Δ32* polymorphism

The *CCR5-Δ32* (rs333) polymorphism was analysed by PCR without any restriction Endonuclease using pair of specific primers (Tan et al., 2010): *CCR5-Δ32* F: 5'CGTCTCTCCAGGAATCATC-3' and *CCR5-Δ32* R: 5'-AGGGAGCCCAGAAGAGAAA-3', which surround the *CCR5-Δ32* mutation (rs333).

The total reaction volume for PCR amplification was 25 μl containing 150 ng genomic DNA, 20 μM of each primer, 5 μl $5\times$ MyTaq Reaction Buffer and 0.2 μl MyTaq DNA polymerase (Bioline, London, UK, P/N: BIO-21105). The PCR conditions were: initial denaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, 35 cycles at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 15 s, annealing at 52 $^{\circ}\text{C}$ for 20 s and extension at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 15 s. Followed by a final extension at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 3 min. The reactions were carried out in a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). The polymorphism was detected by electrophoresis in a 3% agarose gel (Sigma-Aldrich, USA) stained with ethidium bromide, the gels were visualised under UV trans-illuminator using the G: BOX gel documentation system (Syngene). PCR will generate fragments with 276 bp and 244 bp for homozygous wild type (*CCR5/CCR5*) and homozygous 32 bp deletion ($\Delta 32/\Delta 32$) genotypes respectively. The presence of both fragments designates a heterozygous genotype (*CCR5/\Delta 32*) (Fig. 1).

2.2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS software version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Genotypic and allelic frequencies were determined by simple counting. To assess whether the population was in Hardy-Weinberg equilibrium, genotype frequencies were first calculated from allele frequencies, and then their deviation from the number of observed genotypes was determined using χ^2 tests. The distribution of genotypes between HIV-1 seronegative and HIV-1 seropositive groups was compared by the χ^2 test or Fisher's exact test.

2

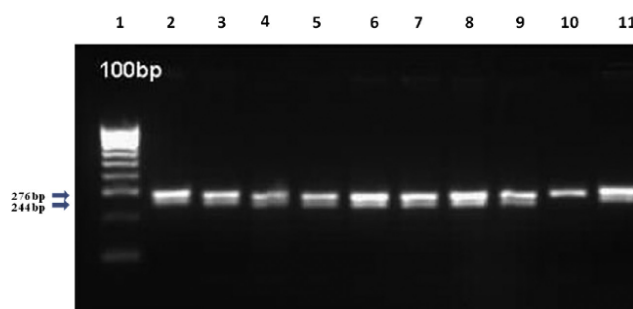


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis (3%) of PCR amplification product of *CCR5* gene using the primers (*CCR5_F/CCR5_R*); (Lane 1):100 bp molecular size ladder; (lanes 2.3.4.5.6.7.8.9.11): Heterozygous (*CCR5/Δ32*); (lane 10): Wild type (*CCR5/CCR5*).

Likewise, χ^2 test was used to evaluate the association between *CCR5-Δ32* mutation and demographic characteristics of subjects and compare clinical stage between *CCR5Δ32* carriers and non-carriers patients.

Association between *CCR5-Δ32* polymorphism and markers of HIV-1 disease progression (CD4+ cell counts and HIV-1 viral load) was performed with ANOVA test. For all tests, $p < 0.05$ was considered as significant.

3. Results

3.1. Demographic and clinical information

The detailed demographic and clinical characteristics of 148 HIV-1 seropositive patients and 342 healthy controls involved in this study were collected (Table 1). At baseline, the median age at onset of HIV-1 infection was 35 years (IQR 25–75%: 30; 41) and the majority of them were males (74%), Arabs (66%), heterosexually infected (84%) and classified in clinical category CDC A (66%). Of 342 controls, 83% were male, 69% were Arabs and the median age was 29 years (IQR 25–75%: 25.0; 37.0).

CD4 cell counts and HIV-1 viral load measurements of patients (cases) were obtained at baseline (before commencing antiretroviral therapy), at 1 year, 2 years, 3 years and at last follow up (Table 2).

Table 1

Baseline demographic and clinical characteristics of studied individuals.

Parameters	Case n = 148	Control n = 342
Sex		
Males	109 (74%)	285 (83%)
Females	39 (26%)	57 (17%)
Ethnic group, n (%)		
Arab	98 (66%)	227 (69%)
Berber	42 (28%)	93 (27%)
Arab-Berber	8 (6%)	12 (4%)
Age group ^a , n (%):		
16–24	11 (7.43%)	57 (16.66%)
25–34	61 (41.21%)	174 (50.87%)
35–44	52 (35.13%)	69 (20.17%)
45–54	23 (15.54%)	36 (10.52%)
55–81	1 (0.67%)	6 (1.75%)
Transmission risk group, n (%)		
Heterosexual	125 (84%)	–
Unknown	23 (16%)	–
CDC category, n (%)		
A	98 (66%)	–
B	35 (24%)	–
C	15 (10%)	–

^a Age group at the onset of HIV-1 infection for cases.

3.2. Allelic and genotypic distribution of *CCR5-Δ32* (rs333) polymorphism

The distribution of *CCR5-Δ32* genotypes and alleles was in Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) in cases ($\chi^2 = 0.0868$) and controls ($\chi^2 = 0.0268$). No significant difference was found between observed and expected genotype numbers in both groups (Table 3).

As summarized in Table 4, 7 of 148 (4.73%) patients (cases) were heterozygous for the *CCR5Δ32* allele compared to 6 of 342 (1.75%) healthy controls ($p = 0.071$). None of the studied individuals (cases or controls) was found to be homozygous for the mutation ($\Delta32/\Delta32$). The frequencies the *CCR5-Δ32* allele determined as follows: 7 (2.36%) among cases and 6 (0.88%) in healthy controls. No statistically significant differences were observed between cases and controls groups ($p = 0.072$).

3.3. Association between *CCR5-Δ32* polymorphism and demographic characteristics of the study participants

The association between the *CCR5-Δ32* polymorphism and demographic variables: gender, age and ethnicity of cases and controls groups was assessed. No statistically significant differences were observed when these characteristics were compared between *CCR5-Δ32* allele carriers and non-carriers ($p > 0.05$).

3.4. Association between *CCR5-Δ32* polymorphism and HIV-1 disease progression

No significant association was observed between the variant allele and HIV-1 viral loads or CD4 cell counts baseline (before initiating ART), at 1 year, 2 years, 3 years and at last follow up ($p > 0.05$) (Table 5).

Likewise, clinical stage wasn't significantly associated with the *CCR5-Δ32* polymorphism ($p > 0.05$) (Table 5). The analysis above was repeated after excluding patients with missing CD4 counts and viral load. Similarly, we didn't observe significant association between *CCR5-Δ32* and these markers ($p > 0.05$).

4. Discussion

The analysis of natural CC-chemokine receptor polymorphisms, especially for *CCR5*, the main HIV coreceptor (B.E. et al., 1998) leads to indicate and clarify the host genetic and immunologic factors that influence host susceptibility to HIV-1 infection and its progression.

Several studies reported that the frequency of the *CCR5-Δ32* polymorphism, the most relevant host genetic factor of HIV resistance known to date, was high in European countries especially among Caucasians (10%), contrary to the most of African, Asian and American

Table 2
CD4 cell count and HIV-1 viral load follow up data of cases group (n = 148).

	Before ART	1 year after ART	2 years after ART	3 years after ART	> 4 years after ART
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
CD4 cell count category (cells/mm ³)					
< 200	35(24)	18(12)	11 (07)	07 (05)	05 (03)
[200-350]	26(18)	26(18)	19 (13)	19 (13)	12 (8)
[350-500]	40(27)	27(18)	28 (19)	27 (18)	32 (22)
≥500	44(30)	54(36)	56 (38)	59 (40)	74 (50)
No. with missing data	03(01)	23(16)	34 (23)	36 (24)	25 (17)
Viral load category (log ₁₀ HIV-1 RNA copies/ml)					
Undetectable	0(0)	35(24)	45 (31)	62 (42)	57 (39)
< 2	0(0)	31(21)	39 (26)	31 (21)	31 (21)
[2-5]	86(58)	57(38)	37 (25)	28 (19)	34 (23)
> 5	60(41)	09(06)	06 (04)	05 (03)	05 (03)
No. with missing data	02(01)	16(11)	21 (14)	22 (15)	21 (14)

ART: antiretroviral therapy.

populations (Degerli et al., 2005; Sabeti et al., 2005; Kim et al., 2007; Weiss, 2013; Li et al., 2014; Solloch et al., 2017). In our investigation, we found that the mutated allele exists in Moroccan population at low frequency, 7 of 148 (4.73%) HIV-1 seropositive (cases) were heterozygous for the *CCR5-Δ32* allele compared to 6 of 342 (1.75%) HIV-1 seronegative individuals (controls) and none of the cases or the controls had *CCR5-Δ32* homozygous genotype.

As far as we know and based on other investigations, we expected to observe this low frequency of heterozygous genotype for *CCR5-Δ32* allele Moroccan seronegative individuals but we didn't expect to observe this mutant allele among HIV-1-infected patients. It's probably due to the genetic drift and the marriage patterns of the Moroccan and European populations. Moreover, the presence of Berber and Arab ethnic groups influenced the genetic diversity of Moroccan population.

The analysis of *CCR5* genotypes frequencies data revealed that the χ^2 value was < 3.84, this means that p-value is above the 0.05 significance level. So, the *H0* hypothesis is acceptable; the population is at Hardy-Weinberg equilibrium from generation to generation. No significant difference exists between observed and expected genotypes frequencies in both patients and controls. Therefore, we suggest that there is no selective pressure on either allele. This is in contrast to the finding of (Elharti et al., 2000) whose investigation revealed an unequal distribution of the *CCR5-Δ32* among Moroccan healthy subpopulations.

The results observed in healthy subjects are close to those observed in the previous investigation in Morocco (Elharti et al., 2000), Saudi Arabia (Jawdat et al., 2013), Iran (Rahimi et al., 2014), Jordan (Khabour et al., 2013). Moreover a recent investigation by U.V. Solloch et al. showed that the mutated allele exists in Moroccan healthy individuals, but with a higher frequency than our result (Solloch et al., 2017). In contrast, this mutated allele was almost absent in Cameroon (Nkenfou et al., 2013), Taiwan, and India (Gupta and Padh, 2015; Bharti et al., 2015; Ting et al., 2015).

The frequency of *CCR5-Δ32* in the HIV-1 seropositive group was slightly higher, but statistically insignificant, than that in the HIV-1 seronegative subjects ($p > 0.05$). Thus, we assumed that *CCR5-Δ32* polymorphism may not directly affect HIV-1 susceptibility among Moroccan population. This result was consistent with the findings of

Table 4
Genotypes and alleles frequencies of the *CCR5Δ32* polymorphism.

	Cases (n = 148)	Controls (n = 342)	p value ^a
Genotypes (n/%)			
wt/wt	141 (95.27)	336 (98.25)	
wt/Δ32	7 (4.73)	6 (1.75)	0.071
Δ32/Δ32	0	0	
Alleles (n/%)			
+	289 (97.63)	678 (99.12)	0.072
Δ32	7 (2.36)	6 (0.88)	

^a Fisher's exact test.: Significance between cases and controls.

various studies carried out among Uighurs (Tan et al., 2010), Caucasian Spaniards (Veloso et al., 2010), Gondar population (Admas and Berhane, 2016) and Iranians (Heydarifard et al., 2017). Likewise, one meta-analysis showed the same findings (Liu et al., 2012). However, some studies reported significant difference in the frequency of *CCR5-Δ32* variant between healthy and HIV-infected individuals (Jilizi et al., 2007).

CCR5-Δ32 mutation is not only associated with HIV-1 susceptibility, but also implicated in disease progression of HIV-1 infection. Several studies have been performed to assess whether *CCR5* (WT/Δ32) heterozygosity affects disease progression of HIV-1 infection. Badie et al. reported that the frequency of rapid progression to AIDS was less in heterozygous individuals than the patients with *CCR5* (WT/WT) genotype, but this result was statically insignificant (Badie et al., 2015). Mulherin et al. didn't observe significant time-dependency for the effect of *CCR5-Δ32* allele on progression from seroconversion to AIDS or from seroconversion to death, though they found significant time dependency for the period from AIDS diagnosis to death (Mulherin et al., 2003). Nevertheless, other studies revealed significant association of *CCR5-Δ32* variant with a decreased risk for progression to AIDS and to death (Michael et al., 1997; Ioannidis et al., 2001). In our investigation, Plasma HIV-1 RNA (viral load) and CD4 cell counts have been used to evaluate the rate of HIV-1 disease progression. We didn't find any statistical significant association between the variant allele and these

Table 3
Comparison between expected and observed genotype numbers in cases and controls.

Genotype	Cases				Controls			
	Observed	Expected	χ^2	p value	Observed	Expected	χ^2	p value
CCR5/CCR5	141	141.08	0.0868	0.768	336	336.0	0.0268	0.870
CCR5/CCR5 Δ32	7	6.83			6	5.94		
Δ 32/Δ 32	0	0.08			0	0.02		

F.Z. Farissi, et al.

Gene Reports 15 (2019) 100391

Table 5
Comparison of clinical stage and markers of HIV-1 disease progression between CCR5Δ32 carriers (WT/Δ32) and non-carriers (WT/WT) in cases group (n = 148).

	WT/WT (n = 141)	WT/Δ32 (n = 7)	p value
Plasma viral load			
Median [IQR] copies/ml			
At baseline	63,450 [13,490; 222,654]	151,450 [10,164,25; 395,026,75]	0.653 [*]
1 year of ART	82.50 [20; 3572,75]	292 [20; 109,428]	0.601 [*]
2 years of ART	39 [20; 442]	39 [20; 42]	0.285 [*]
3 years of ART	22 [20; 221,50]	29 [20; 93]	0.698 [*]
4 years of ART	23 [20; 3753]	20 [20; 26]	0.130 [*]
CD4 T-cell count: Median [IQR] cells/mm³			
At baseline	385 [192; 525]	488,50 [265; 599,50]	0.256 [*]
1 year of ART	450 [301; 630]	527 [354; 643]	0.369 [*]
2 years of ART	490 [335; 691,50]	490 [404,50; 747]	0.549 [*]
3 years of ART	501 [363; 690,50]	526 [398,25; 667]	0.480 [*]
4 years of ART	547 [412,75; 724,50]	618 [556; 805]	0.113 [*]
CDC category (%)			
A	90 (65.7%)	5 (83.3%)	0.602 ^{**}
B	33 (24.1%)	1 (16.7%)	
C	14 (10.2%)	0 (0%)	

ART: antiretroviral therapy.

^{*} p value results of the ANOVA test.^{**} p value result of the Pearson's Chi-square test.

clinical variables obtained at baseline (even before ART initiation) at 1 year, 2 years, 3 years and at last follow up ($p > 0.05$). Additionally, no significant association was observed between CCR5-Δ32 and the clinical stage. This negative finding should be interpreted cautiously, as all patients enrolled in this study undergo ART that affects markers of HIV-1 disease progression (CD4 cell counts and viral load), thus it will be complicated to detect the potential effect of the mutation on these markers. Likewise, maybe some patients could have probably infected with CXCR4-using (X4) strains or R5X4 dualtropic viruses which use both CCR5 and CXCR4 to enter the host cells (de Mendoza et al., 2007; Shepherd et al., 2008).

Further factors like gender (Metallidis et al., 2013), age at diagnosis (Geskus et al., 2005) and baseline CD4 + T-cell count, health care and co-infection (Konrad et al., 2013) and viral genetic variability (Campbell et al., 2004), may affect this progression. Moreover, it has been reported that in primary infection, CXCR4-using viruses is linked to rapid disease progression in HIV-positive patients (Cavarelli and Scarlatti, 2009; Raymond et al., 2010). So, the examination of the direct relationship between host genetic variation and HIV-1 disease markers is complicated.

In addition, we highlight that our limitation consist on the number of patients harboring the (Δ32/WT) genotype, which is also probably one of the reasons why we didn't observe a significant association between CCR5-Δ32 polymorphism and HIV-1 infection. Thus, further studies are required in the future to better understand the impact of CCR5Δ32/WT on markers of HIV-1 disease progression.

5. Conclusion

In our report, CCR5Δ32 heterozygosity may not influence HIV-1 susceptibility infection; these results confirm previous findings of several investigations. Determining the relationship between CCR5Δ32 allele and HIV-1 disease progression requires additional studies.

Also, other genetic polymorphisms of HIV-1 co-receptors, CCR2 and SDF1 in particular, should be investigated in Moroccan population,

which may be useful to clinicians studying the infectious and auto-immune diseases.

Financial support

This work was supported by the University of Mohamed V, Rabat, Morocco.

Conflict of interest

We have no competing interests to declare.

Acknowledgments

This work was carried out in collaboration between the Military Hospital of Instruction Mohammed V of Rabat and the National Center for Scientific and Technical Research, Morocco. We acknowledge Pr M. KHALFAOUI, CNRST Director.

References

- Admas, A., Berhane, N., 2016. The frequency and effects of CCR5 Delta 32 allele in Gondar population. *Mol. Biol.* 5, 168.
- Arenzana-Seisdedos, F., Parmentier, M., 2006. Genetics of resistance to HIV infection: role of co-receptors and co-receptor ligands. *Semin. Immunol.* 18, 387–403.
- B.E., Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, et al., 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* 391:240.
- Badie, B., Najmabadi, H., Djavid, G., Kheirandish, P., Jabbari, H., 2015. Frequency of CCR5 Delta 32 polymorphism and its relation to disease progression in Iranian HIV-1 positive individuals. *J. Hum. Virol. Retrovirol.* 2, 00059.
- Ballana, E., Riveira-Munoz, E., Pou, C., Bach, V., Parera, M., Noguera, M., et al., 2013. HLA class I protective alleles in an HIV-1-infected subject homozygous for CCR5-Delta32/Delta32. *Immunobiology* 218, 543–7.
- Barmania, F., Pepper, M.S., 2013. C-C chemokine receptor type five (CCR5): an emerging target for the control of HIV infection. *Appl. Transl. Genom.* 2, 3–16.
- Berger, Edward A., Murphy, Philip M., Farber, Joshua M., 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 657–700.
- Bharti, D., Kumar, A., Mahla, R.S., Kumar, S., Ingle, H., Yadav, T., et al., 2015. Low prevalence of CCR5-Δ32, CCR2-64I and SDF1-3'A alleles in the Baiga and Gond tribes of Central India. *SpringerPlus* 4, 451.
- Campbell, G.R., Pasquier, E., Watkins, J., Bourgaire-Rey, V., Peyrot, V., Esquieu, D., et al., 2004. The glutamine-rich region of the HIV-1 Tat protein is involved in T-cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 48197–204.
- Cavarelli, M., Scarlatti, G., 2009. Phenotype variation in human immunodeficiency virus type 1 transmission and disease progression. *Dis. Markers* 27, 121–136.
- Chatterjee, K., 2010. Host genetic factors in susceptibility to HIV-1 infection and progression to AIDS. *J. Genet.* 89, 109–116.
- Colocini RS, Dilemia D, Ghiglione Y, Turk G, Laufer N, Rubio.A., et al., 2014. Host genetic factors associated with symptomatic primary HIV infection and disease progression among Argentinean seroconverters. *PLoS One* 9(11): e113146.
- Degerli, N., Yilmaz, E., Bardakci, F., 2005. The Δ32 allele distribution of the CCR5 gene and its relationship with certain cancers in a Turkish population. *Clin. Biochem.* 38, 248–252.
- Elharti, E., Elaouad, R., Simons, M.J., Messouak-Elhachimi, Z., Gluckman, J.C., Parmentier, M., Benjouad, A., 2000. Frequency of the CCR5delta32 allele in the Moroccan population. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 1 (16(1)), 87–89.
- Ferreira-Fernandes, H., Santos, A.C., Motta, F.J., Canalle, R., Yoshioka, F.K., Burbano, R. R., et al., 2015. Prevalence of CCR5-Delta32 and CCR2-V64I polymorphisms in a mixed population from northeastern Brazil. *Genet. Mol. Res.* 14, 11710–8.
- Geskus, R.B., Meyer, L., Hubert, J.B., Schuitemaker, H., Berkhout, B., Rouzioux, C., et al., 2005. Causal pathways of the effects of age and the CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on AIDS development. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 39, 321–6.
- Gray, L., Churchill, M.J., Keane, N., Sterjovski, J., Ellet, A.M., Purcell, D.F., et al., 2006. Genetic and functional analysis of R5X4 human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins derived from two individuals homozygous for the CCR5delta32 allele. *J. Virol.* 80, 3684–91.
- Gupta, A., Padh, H., 2015. Analysis of CCR5 and SDF-1 genetic variants and HIV infection in Indian population. *Int. J. Immunogenet.* 42, 270–278.
- Heydarifard, Z., Tabarraei, A., Moradi, A., 2017. Polymorphisms in CCR5Delta32 and risk of HIV-1 infection in the southeast of Caspian Sea, Iran. *Dis. Markers* 4190107.
- Ioannidis JP, R.P., Goedert JJ, et al., 2001. Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: an international meta-analysis of individual-patient data. *Ann. Intern. Med.* 135:782–795.
- Jang, D.H., Choi, B.S., Kim, S.S., 2008. The effects of rantes/CCR5 promoter polymorphisms on HIV disease progression in HIV-infected Koreans. *Int. J. Immunogenet.* 35.
- Jawdat, D., Alarifi, M., Al-Turki, A., Alalwan, A., Al-Amro, F., Atallah, N., et al., 2013. 82-P: the prevalence of CCR5 delta 32 mutation in Saudi Arabia. *Hum. Immunol.* 74,

5

F.Z. Farissi, et al.

Gene Reports 15 (2019) 100391

- 108.
- Jlizi, A., Edouard, J., Fadhlouli-Zid, K., Frigi, S., Debre, P., Slim, A., et al., 2007. Identification of the CCR5-Delta32 HIV resistance allele and new mutations of the CCR5 gene in different Tunisian populations. *Hum. Immunol.* **68**, 993–1000.
- Khabour, O.F., Abu-Haweleh, L.I., Alzoubi, K.H., 2013. Distribution of CCR-5 Delta32, CCR2-64I, and SDF-1-3'A alleles among Jordanians. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **29**, 151–155.
- Kim, H.S., Kim, D.-S., Lee, E.Y., Sunwoo, I.-N., Choi, Y.-C., 2007. CCR2-64I and CCR5Δ32 polymorphisms in Korean patients with myasthenia gravis. *J. Clin. Neurol. (Seoul, Korea)* **3**, 133–138.
- Konrad, S., Skinner, S., Kazadi, G.B., Gartner, K., Lim, H.J., 2013. HIV disease progression to CD4 count < 200 cells/μl and death in Saskatoon, Saskatchewan. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **24**, 97–101.
- Kouyoumjian, S.P., Muntaz, G.R., Hilmi, N., Zidouh, A., El Rhilani, H., Alami, K., et al., 2013. The epidemiology of HIV infection in Morocco: systematic review and data synthesis. *Int. J. STD AIDS* **24**, 507–16.
- Laurichesse, J.J., Persoz, A., Theodorou, I., Rouzioux, C., Delfraissy, J.F., Meyer, L., 2007. Improved virological response to highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients carrying the CCR5 Δ32 deletion. *HIV Med.* **8**, 213–219.
- Li, H., Liu, T.-J., Hong, Z.-H., 2014. Gene polymorphisms in CCR5, CCR2, SDF1 and RANTES among Chinese Han population with HIV-1 infection. *Infect. Genet. Evol.* **24**, 99–104.
- Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., et al., 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**, 367–377.
- Liu, S., Kong, C., Wu, J., Ying, H., Zhu, H., 2012. Effect of CCR5-Δ32 heterozygosity on HIV-1 susceptibility: a meta-analysis. *PLoS One* **7** (4), e35020.
- Martinson, J.J., Chapman, N.H., Rees, D.C., Liu, Y.-T., Clegg, J.B., 1997. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat. Genet.* **16**, 100.
- de Mendoza C., Rodriguez, C., Garcia, F., Eiros, J.M., Ruiz, L., Caballero, E., et al., 2007. Prevalence of X4 tropic viruses in patients recently infected with HIV-1 and lack of association with transmission of drug resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 698–704.
- Metallidis, S., Tsachouridou, O., Skoura, L., Zebekakis, P., Chrysanthidis, T., Pilalas, D., et al., 2013. Older HIV-infected patients—an underestimated population in northern Greece: epidemiology, risk of disease progression and death. *Int. J. Infect. Dis.* **17**, 30.
- Michael, N.L., Chang, G., Louie, L.G., Mascola, J.R., Dondero, D., Birx, D.L., Sheppard, H.W., 1997. The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med.* **3**, 338–340.
- Mulherin, S.A., O'Brien, T.R., Ioannidis, J.P., Goedert, J.J., Buchbinder, S.P., Coutinho, R. A., et al., 2003. Effects of CCR5-Delta32 and CCR2-64I alleles on HIV-1 disease progression: the protection varies with duration of infection. *AIDS* **17**, 377–87.
- Nkenfou, C.N., Mekue, L.C.M., Nana, C.T., Kuiate, J.R., 2013. Distribution of CCR5-Delta32, CCR5 promoter 59029 A/G, CCR2-64I and SDF1-3'A genetic polymorphisms in HIV-1 infected and uninfected patients in the West Region of Cameroon. *BMC. Res. Notes* **6**, 288.
- O'Brien, S.J., Moore, J.P., 2000. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol. Rev.* **177**, 99–111.
- Rahimi, H., Farajollahi, M.M., Hosseini, A., 2014. Distribution of the mutated delta 32 allele of CCR5 co-receptor gene in Iranian population. *Med. J. Islam Repub. Iran* **28**, 140.
- Raymond, S., Delobel, P., Mavigner, M., Cazabat, M., Encinas, S., Souyris, C., et al., 2010. CXCR4-using viruses in plasma and peripheral blood mononuclear cells during primary HIV-1 infection and impact on disease progression. *AIDS* **24**, 2305–12.
- Rottman, J.B., Ganley, K.P., Williams, K., Wu, L., Mackay, C.R., Ringler, D.J., 1997. Cellular localization of the chemokine receptor CCR5. Correlation to cellular targets of HIV-1 infection. *Am. J. Pathol.* **151**, 1341–1351.
- Sabeti, P.C., Walsh, E., Schaffner, S.F., Varrilly, P., Fry, B., Hutcheson, H.B., et al., 2005. The case for selection at CCR5-Δ32. *PLoS Biol.* **3**, e378.
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B.J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C.-M., et al., 1996. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**, 722.
- Shepherd JC, Jacobson LP, Qiao W, Jamieson BD, Phair JP, Piazza P, et al., 2008. Emergence and persistence of CXCR4-tropic HIV-1 in a population of men from the multicenter AIDS cohort study. *J. Infect. Dis.* **198**, 1104–1112.
- Slominski, B., Lawryniewicz, U., Mysliwska, J., Ryba-Stanislawowska, M., Skrzypkowska, M., Brandt, A., 2017. CCR5-Delta32 gene polymorphism is associated with retinopathy in patients with type 1 diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **439**, 256–260.
- Solloch, U.V., Lang, K., Lange, V., Böhme, I., Schmidt, A.H., Sauter, J., 2017. Frequencies of gene variant CCR5-Δ32 in 87 countries based on next generation sequencing of 1.3 million individuals sampled from 3 national DKMS donor centers. *Hum. Immunol.* **78**, 710–717.
- Tan, X.H., Zhang, J.Y., Di, C.H., Hu, A.R., Yang, L., Qu, S., et al., 2010. Distribution of CCR5-Delta32, CCR5m303A, CCR2-64I and SDF1-3'A in HIV-1 infected and uninfected high-risk Uighurs in Xinjiang, China. *Infect. Genet. Evol.* **10**, 268–72.
- Ting, K.-H., Ueng, K.-C., Chiang, W.-L., Chou, Y.-E., Yang, S.-F., Wang, P.-H., 2015. Relationship of genetic polymorphisms of the chemokine, CCL5, and its receptor, CCR5, with coronary artery disease in Taiwan. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2015**, 8.
- UNAIDS, 2017. UNAIDS DATA 2017. http://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/2017_data_book.
- Veloso, S., Olona, M., Garcia, F., Domingo, P., Alonso-Villaverde, C., Broch, M., 2010. Effect of TNF-alpha genetic variants and CCR5 Delta 32 on the vulnerability to HIV-1 infection and disease progression in Caucasian Spaniards. *BMC Med. Genet.* **11**, 63.
- Weiss, R.A., 2013. Thirty years on: HIV receptor gymnastics and the prevention of infection. *BMC Biol.* **11**, 1741–7007.

II - LE POLYMORPHISME GENETIQUE *CCR2+190 G>A (RS1799864)* ET SON IMPACT SUR LA SUSCEPTIBILITE AU VIH-1 ET LES MARQUEURS IMMUNOVIROLOGIQUES PREDICTIFS DE LA PROGRESSION DE L'INFECTION CHEZ LES PATIENTS SOUS TRAITEMENT ANTIRETROVIRAL

II.1 - Contexte de l'étude

Comme discuté auparavant dans le chapitre III relatif à la synthèse bibliographique, les facteurs génétiques de l'hôte, en particulier les mutations des récepteurs des chimiokines, sont importantes pour déterminer l'évolution clinique de la maladie chez les patients infectés par le VIH-1. La variante *CCR2 +190A (64I)* du *CCR2*, le corécepteur alternatif d'une minorité des souches R5 et dual-tropiques R5X4, est l'une des mutations importantes qui pourraient influencer l'infection par le VIH-1.

Plusieurs études ont rapporté que cette mutation n'a aucun effet apparent sur le risque de l'infection par le VIH-1 chez les homozygotes et les hétérozygotes [710, 712]. Par surcroît, il a été suggéré que l'allèle *CCR2 +190A (G/A + A/A vs G/G)* peut être associé à un retard significatif dans la progression de la maladie en influençant les marqueurs immunovirologiques (la charge virale VIH-1 et le taux des cellules T CD4+) chez les patients. Cependant, cette association reste très controversée surtout chez les patients séropositifs suivant un traitement antirétroviral. Le rôle de l'allèle *CCR2 +190A* dans l'infection par le VIH-1 peut différer d'une population à l'autre en raison de leur bagage génétique.

Au Maroc, aucune donnée n'est disponible concernant ce polymorphisme. Cette étude est donc la première à l'échelle nationale qui détermine la fréquence du polymorphisme génétique *CCR2 +190 G>A* et évalue l'effet potentiel de cet allèle muté sur la susceptibilité au VIH-1 et les marqueurs immunovirologiques chez des patients traités.

II.2 - Résultats

II.2.1 - Caractéristiques démographiques et cliniques

Les caractéristiques des 100 patients séropositifs pour le VIH-1 (cas) sous traitement antirétroviral et des 200 témoins sains recrutés dans ce travail sont détaillées dans le tableau X. La plupart des patients sont des hommes (68 %), arabes (68 %), infectés par voie hétérosexuelle (89 %) et classés dans la catégorie clinique CDC A (68 %) avec un âge moyen de $35,8 \pm 8,4$

ans lors du diagnostic. Le groupe témoin avait un âge moyen de $31,5 \pm 8,9$ ans, dont 71,50 % étaient des hommes et 68 % étaient des Arabes.

Tableau X : Caractéristiques des cas et des témoins

Caractéristiques	Cas n=100	Témoins n=200
Sexe, n (%)		
Hommes	68 (68)	143 (71.5)
Femmes	32 (32)	57 (28.5)
Origine ethnique, n (%)		
Arabe	68 (68)	136 (68)
Berbère	27 (27)	54 (27)
Arabo-berbère	5 (5)	10 (5)
Age (années), moyenne \pm SD	35.8 ± 8.4	31.5 ± 8.9
Transmission, n (%)		
Hétérosexuelle	89 (89)	-
Inconnue	11 (11)	-
Stade clinique (CDC), n (%)		
A	68 (68)	-
B	22 (22)	-
C	10 (10)	-

Le tableau XI représente les mesures du taux de cellules T CD4+ et de la charge virale VIH-1 chez les patients (cas), enregistrées au baseline (avant l'initiation du traitement antirétroviral) et après un an du traitement.

Tableau XI : Mesures du taux des cellules T CD4+ et de la charge virale VIH-1 chez les patients (n= 100)

	Baseline n (%)	Un an après TAR* n (%)
Intervalles Taux T CD4+		
(cellules/mm³)		
< 200	24 (24)	14 (14)
200-349	18 (18)	18 (18)
350-500	27 (27)	22 (22)
> 500	30 (30)	38 (38)
Manquant	01 (01)	08 (08)
Intervalles charge virale (copies/mL)		
Indéetectable, < 20	0 (0)	26 (26)
20-400	01 (1)	35 (35)
401-999	4 (4)	1 (1)
1000-9999	14 (14)	10 (10)
≥10000	80 (80)	18 (18)
Manquant	01 (01)	10 (10)

*TAR : traitement antirétroviral

II.2.2 - Distribution génotypique et allélique du polymorphisme *CCR2* +190 G>A

La distribution des fréquences génotypiques du polymorphisme *CCR2* +190 G>A (ou *CCR2-V64I*) chez les patients VIH-1 et les témoins sains était en équilibre de Hardy-Weinberg (HWE). Aucune différence significative n'a été constatée entre les nombres de génotypes observés et prévus chez le groupe des cas et le groupe témoin ($p > 0,05$) (tableau XII).

Tableau XII : Comparaison entre les nombres des génotypes CCR2 +190G>A prévus et observés chez les cas et les témoins

Génotype	Cas (n=100)				Témoins (n=200)			
	Observé	Prévu	χ^2	p value	Observé	Prévu	χ^2	p value
G/G	67	67.2	0.0264	0.87	146	145.4	0.1330	0.71
G/A	30	29.5			49	50.3		
A/A	3	3.2			5	4.4		

* Ce tableau présente les fréquences des génotypes CCR2 prédites par l'équilibre de Hardy Weinberg sur la base des fréquences des génotypes observés dans notre étude. Pour ces calculs, p indique la fréquence de l'allèle de type sauvage (CCR2+190G) et q, la fréquence de l'allèle mutant (CCR2+190A), où $p+q=1$. Une population en équilibre de Hardy-Weinberg présentera trois génotypes dont les proportions répondent à l'équation : $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Pour chaque génération, la fréquence du génotype homozygote de type sauvage (G/G) est donc p^2 et les fréquences des génotypes hétérozygote (G/A) et homozygote mutant (A/A) sont respectivement $2pq$ et q^2 .

Comme indiqué dans le tableau XIII, 30% des patients (groupe des cas) étaient hétérozygotes pour l'allèle CCR2 +190A (G/A) et 3% présentaient le génotype homozygote muté (A/A), contre 24,5% et 2,5%, respectivement, chez les individus sains du groupe témoin (figure 52). La fréquence allélique du CCR2 +190A était de 18% chez les patients et de 14,75% chez les témoins. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée dans la distribution des génotypes ($p = 0,55$) et la fréquence allélique du variant CCR2 +190A entre les deux groupes ($p = 0,28$).

Tableau XIII : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme CCR2 +190 G>A chez les cas et les témoins

	Cas (n=100)	Témoins (n=200)	p value*
Génotypes (n/%)			
G/G	67 (67)	146 (73)	0.55
G/A	30 (30)	49 (24.50)	
A/A	3 (3)	5 (2.50)	
Allèles, F (%)			
G (sauvage)	164 (82)	341 (85.25)	0.28
A (mutant)	36 (18)	59 (14.75)	

*Valeur-p du test exact de Fisher

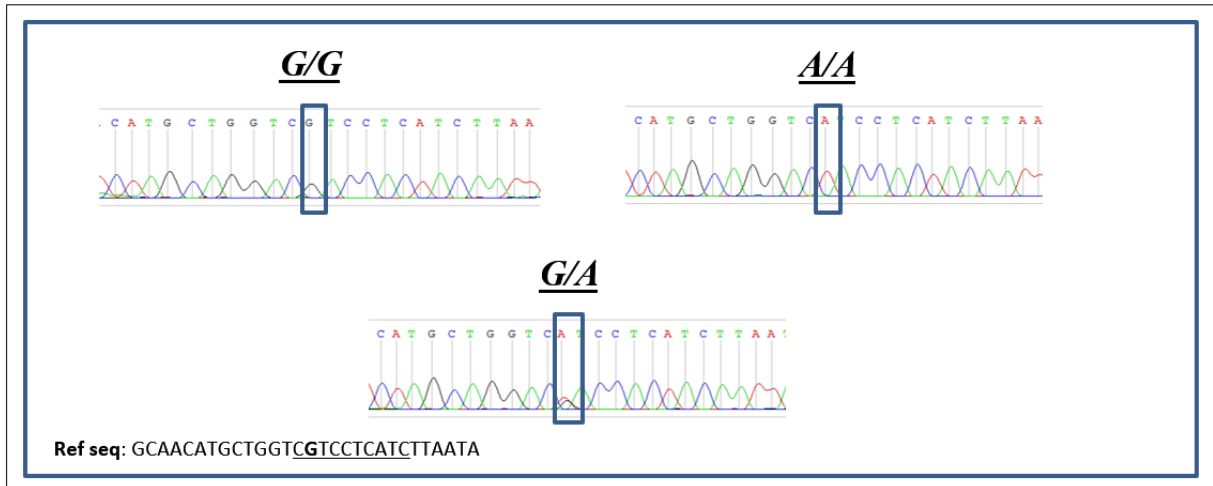


Figure 52 : Les résultats du séquençage du gène *CCR2*. Les génotypes homozygote sauvage G/G, homozygote muté A/A et hétérozygote G/A sont indiqués dans l'électrophorégramme

II.2.3 - Association entre le polymorphisme *CCR2 +190 G>A* et l'ethnie

Nous avons effectué une comparaison de l'ethnicité des cas et des témoins sur la base des génotypes *CCR2 +190 G>A*. Les fréquences des génotypes hétérozygotes (G/A) et homozygotes (A/A) ne différaient pas significativement (selon l'origine ethnique) ($p > 0,05$) (tableau XIV).

II.2.4 - Association entre le polymorphisme *CCR2 +190 G>A* et les caractéristiques clinique et immunovirologiques du groupe des cas

Les paramètres cliniques et immunovirologiques des patients séropositifs pour le VIH-1 : le stade clinique, les médianes de la charge virale plasmatique et du taux des lymphocytes T CD4+ (au baseline et après un an du traitement), ainsi que l'évolution immunovirologique ont été comparés en fonction des génotypes *CCR2 +190 G>A*. Nous n'avons pas constaté une différence significative dans ces paramètres en fonction du portage de l'allèle mutant *CCR2 +190A* ($p > 0,05$) (tableau XIV).

Tableau XIV : Comparaison de l'ethnie et des caractéristiques cliniques en fonction des génotypes CCR2 +190 G>A

	G/G		G/A		A/A		p value* (Cas)	p value* (Témoins)
	Cas (n=67)	Témoins (n=146)	Cas (n=30)	Témoins (n=49)	Cas (n=3)	Témoins (n=5)		
Ethnie, n (%)								
Arabe	45 (67.2)	100(68.5)	21 (70)	32 (65.3)	02 (66.7)	04 (80)	0.96	0.78
Berbère	19 (28.4)	40 (27.4)	07 (23.3)	13 (26.5)	01 (33.3)	01 (20)		
Arabo-Berbère	03 (4.4)	06 (4.1)	02 (6.7)	04 (8.2)	00 (00)	00 (00)		
Stade clinique (CDC), n (%)								
A	49 (73.2)	-	18 (60)	-	01 (33.3)		0.2	-
B	11 (16.4)		09 (30)		02 (66.7)			
C	07 (10.4)		03 (10)		00 (00)			
Charge virale (copies/mL) au baseline, médiane [IQR]	63450 [20958;239883]	-	111000 [7541;258851]	-	37100 [17378;37100]	-	0.61	-
Charge virale (copies/mL) après 1 an du TAR, médiane [IQR]	117 [20;2216]	-	50 [20;3070]	-	15135 [20; 15135]	-	0.63	-
Taux de T CD4+ (cellules/mm3) au baseline, médiane [IQR]	360 [213;547]	-	396 [212;535]	-	299 [60; 299]	-	0.28	-
Taux de T CD4+ (cellules/mm3) après 1 an du TAR, médiane [IQR]	438 [300;659]	-	442 [290;630]	-	316 [104;316]	-	0.13	-
Evolution immuno-virologique, n (%)								
Bonne	20 (29.9)	-	03 (10)	-	00 (00)		0.08	-
Mauvaise	38 (56.7)		21 (70)		02 (66.7)	-		
Manquant	09 (13.4)		06 (20)		01 (33.3)			

TAR : Traitement Antirétroviral

*p-values correspondant à la comparaison des variables en fonction des différents génotypes (test de Mann-Whitney ou test du Khi-deux, selon le cas)

II.2.5 - Association entre le polymorphisme CCR2 +190 G>A et l'évolution immunovirologique

À l'aide de l'outil SNPStats, nous avons d'abord testé le meilleur modèle d'association du SNP CCR2 +190 G>A avec l'évolution immunovirologique. Le meilleur modèle d'association

correspondant à nos données était le modèle dominant. Selon ce modèle d'association, et vu aussi le nombre limité du génotype homozygote muté *A/A*, nous avons regroupé les patients portant le génotype hétérozygote *G/A* et le génotype homozygote *A/A* en un seul groupe « porteurs de la mutation *CCR2 +190 G>A* ». Les patients ont été donc stratifiés en deux groupes : ceux portant le génotype sauvage *G/G* et ceux portant les génotypes mutés *G/A + A/A*.

L'analyse univariée a montré que seuls le portage de l'allèle *CCR2 +190A* en mode dominant (*G/A + A/A* vs. *G/G* : $p = 0,038$; OR 4,03 ; IC 95 % [1,07-15,09]) ainsi que l'origine ethnique (pour le groupe ethnique berbère : $p = 0,026$; OR 13,23 ; IC 95 % [1. 35-129] et le groupe Arabo-berbère : $p = 0,046$; OR 11,33 ; IC 95 % [1,04-122,5]) étaient significativement associés à une mauvaise évolution immunovirologique chez nos patients traités (tableau XV). Dans l'analyse multivariée, cette association est restée significative pour l'ethnie (pour le groupe ethnique berbère ; $p = 0,029$; OR 18,134, IC 95% [1,5-3909,4]), mais l'influence de l'allèle *CCR2 +190A* a perdu sa signification ($p > 0,05$) (tableau XV).

Tableau XV : Analyses univariée et multivariée des facteurs associés à l'évolution immunovirologique chez les patients traités

	Fréquences*		UNIVARIEE			MULTIVARIEE		
	Bonne EIV	Mauvaise EIV	OR	IC 95%	p-value	OR	IC 95%	p-value
Sexe, n (%)								
Hommes (n=68)	12 (52.2)	45 (73.8)	Reference 2,578	-	-	-	-	-
Femmes (n= 32)	11 (47.8)	16 (26.2)						
Age (années), moyenne ± SD	34.09 ± 8.3	36.34 ± 8.3	1,034	0,974- 1,098	0,266	-	-	-
Groupe d'âge, n (%)								
18-35	14 (60.9)	33 (54.1)	Reference	-	-	-	-	-
36-45	06 (26.1)	18 (29.5)	1,27	0,41- 3,88	0,67	-	-	-
46-60	03 (13)	10 (16.4)	1,41	0,33 - 5,93	0,63	-	-	-
Origine ethnique, n (%)								
Arabe (n= 68)	13 (56.5)	43 (70.5)	Reference	-	-	-	-	-
Berbère (n= 27)	06 (26.1)	17 (27.9)	13,23	1,35-129	0,026	18,134	1,5-3909,4	0,029
Arabo-Berbère (n=5)	04 (17.4)	01 (1.6)	11,33	1,04- 122,5	0,046	17,41	0,4-725,9	0,13
Stade clinique (CDC), n (%)								
A (n=68)	18 (78.3)	37 (60.7)	Reference	-	-	-	-	-
B (n=22)	05 (21.7)	16 (26.2)	1.55	0.49 - 4.92	0.45	-	-	-
C (n=10)	00 (00)	08 (13.1)	0.93	0.24 - 3.54	0.9	-	-	-
Génotypes <i>CCR2+190G>A</i>, n (%)								
<i>G/G</i> (n=67)	20 (87)	38 (62.3)	Reference	-	-	-	-	-
<i>G/A + A/A</i> (n=33)	03 (13)	23 (37.7)	4,03	1,07 - 15,09	0,038	1	-	0,99

* 16 données manquantes

EIV : Evolution Immunovirologique après un an de traitement antirétroviral

Les valeurs en gras sont les valeurs statistiquement significatives ($p < 0,05$)

II.3 - Discussion

Depuis la découverte de la contribution génétique protectrice du polymorphisme *CCR2 +190 G>A*, de nombreuses études ont été menées chez différentes populations pour examiner la fréquence de cet allèle mutant et son effet protecteur contre l'infection par le VIH-1.

Dans ce travail, nous avons analysé pour la première fois au Maroc, la fréquence du polymorphisme *CCR2 +190 G>A* et son impact sur l'infection par le VIH-1. La distribution de l'allèle *CCR2 +190A* était de 0,18 chez les patients séropositifs pour le VIH-1, contre 0,1475 chez les sujets sains séronégatifs pour le VIH-1.

La fréquence allélique observée chez les sujets sains était proche de celles rapportées par d'autres études menées en Iran (0,1221) [866], au Cameroun (0,1536) [867], au Brésil (0,1390) [868], en Hongrie (0,186) [869], en Turquie (0,1780) [870], et relativement plus élevée que celle observée dans la population indienne (0,091) [871]. Par ailleurs, une étude menée par Li et al., a rapporté une fréquence plus élevée de l'allèle *CCR2 +190A* chez la population chinoise Han (0,2306) [842].

D'après les informations dont nous disposons et selon les études antérieures, nous nous attendions à observer cette fréquence élevée de l'allèle *CCR2 +190A* dans la population marocaine, puisqu'il est assez fréquent dans le monde.

L'analyse de la distribution génotypique a montré que la valeur de χ^2 était < 3.84 , et la valeur de p était supérieure au seuil de signification ($p > 0.05$). Ainsi, l'hypothèse nulle est acceptée ; les fréquences des génotypes observés et attendus ne diffèrent pas significativement chez les patients et les témoins, ce qui suggère qu'aucune pression sélective n'existe sur l'un ni sur l'autre des allèles. Cela signifie que notre population marocaine étudiée est en équilibre de Hardy-Weinberg de génération en génération.

Le groupe des cas, comparé au groupe témoin, avait une fréquence légèrement plus élevée de l'allèle *CCR2 +190A* (18%), mais cette différence n'était pas statistiquement significative ($p > 0,05$). Ce résultat suggère donc que probablement cet allèle mutant, n'exerce pas d'effet protecteur ou n'influence pas la susceptibilité de l'hôte à l'infection par le VIH-1 chez la population marocaine. Cette conclusion est cohérente avec les résultats de diverses études menées chez les Indiens du Nord [872], la population chinoise Han [842], la Pologne [873] et le Cameroun [847].

En outre, une autre étude menée au Luxembourg a rapporté une conclusion similaire [874]. Cependant, certains chercheurs ont observé une différence statistiquement significative dans la fréquence du polymorphisme *CCR2 +190 G>A* entre les personnes séronégatives et les personnes séropositives pour le VIH-1, et ont suggéré une association potentielle de cet allèle variant avec la susceptibilité au VIH-1 [875, 876].

Bien qu'il n'ait pas été démontré que l'allèle mutant *CCR2 +190A* protège complètement contre la susceptibilité au VIH-1 [712], plusieurs enquêtes ont rapporté un effet protecteur de ce polymorphisme contre la progression de la maladie du VIH-1 [877]. Néanmoins, les résultats de certaines études ont révélé le contraire [878-880].

Dans notre étude, les caractéristiques cliniques et immunovirologiques des patients (les médianes de la charge virale et du taux des lymphocytes T CD4+ et le stade clinique) ne différaient pas significativement en fonction du génotype *CCR2 +190 G>A*. De même, nous n'avons pas observé de différence significative dans l'évolution immunovirologique après un an de traitement, entre les différents génotypes ($p > 0,05$). Cela est conforme aux résultats de Puissant et al. qui n'ont pas trouvé de différence significative dans la distribution du *CCR2 +190 G>A* entre les patients répondeurs et non répondeurs [881].

Dans l'analyse univariée des facteurs associés à l'évolution immunovirologique, le portage de l'allèle *CCR2 +190A* et l'origine ethnique des patients étaient significativement associés à des mauvais résultats immunovirologiques après un an de traitement antirétroviral. Cependant, l'analyse multivariée a montré que le polymorphisme *CCR2 +190 G>A* n'est pas un facteur indépendant, tandis que l'ethnie restait associée à une mauvaise évolution immunovirologique.

Nous suggérons donc que cette mutation, seule et indépendamment des autres facteurs de risque connus, n'ait pas d'effet direct sur les niveaux de charge virale et la restauration du nombre des cellules T CD4+ dans notre population. En revanche, Restrepo et al. ont rapporté une association indépendante significative entre le génotype hétérozygote *G/A* et le statut immunologique du non-répondeur [882].

L'association significative entre l'ethnie (le groupe berbère) et les résultats immunovirologiques est probablement due à des différences dans des facteurs culturels et psychologiques (stigmatisation et dépression liées au VIH), dans le comportement lié à la santé, et dans le statut socio-économique entre nos groupes ethniques. Ces facteurs pourraient avoir un impact sur l'adhésion au traitement antirétroviral [883, 884], ce qui pourrait influencer par la suite,

l'évolution immunologique et le contrôle virologique chez le groupe ethnique berbère. Pareillement, d'autres études ont signalé une association significative entre l'ethnie et les résultats immunovirologiques des patients séropositifs pour le VIH-1 [885-887].

A l'heure actuelle, les études analysant l'effet du polymorphisme du *CCR2* sur les marqueurs de progression de la maladie du VIH-1 (la charge virale et le taux de lymphocytes T CD4+) chez les patients sous traitement antirétroviral ne sont pas nombreuses. En accord relatif avec nos résultats, la quasi-totalité des études précédentes évaluant cet effet chez des individus traités, n'ont pas montré un impact significatif du polymorphisme *CCR2 +190 G>A* sur la charge virale VIH-1 ou le taux des lymphocytes T CD4+ [12, 683, 879, 881, 888].

Le rôle réel et efficient du *CCR2 +190 G>A* dans la progression de la maladie du VIH-1 n'est toujours pas clair et également un sujet controversé, puisqu'il s'agit de la mutation d'un corécepteur alternatif utilisé uniquement par une minorité de souches du VIH-1.

Certains rapports antérieurs ont montré que ce SNP est en complet déséquilibre de liaison avec une mutation de substitution de C en T sur la région régulatrice du *CCR5*, et qu'il pourrait moduler à la baisse l'expression des principaux corécepteurs du VIH-1 *CCR5* et *CXCR4* [721, 889, 890]. Cependant, d'autres études n'ont pas réussi à montrer une différence statistiquement significative dans les niveaux d'expression de *CCR5* sur les cellules mononuclées du sang périphérique entre les génotypes sauvage *G/G* et homozygote muté *A/A* [891, 892].

Les résultats de notre étude sont probablement dus au traitement antirétroviral qui affecte les marqueurs de la progression de la maladie du VIH-1, ce qui peut masquer l'effet direct du polymorphisme *CCR2 +190 G>A* sur l'évolution immunovirologique chez nos patients traités. En outre, des études précédentes ont révélé que la variabilité génétique virale [863] et les facteurs psychologiques [893], peuvent également avoir un impact sur les marqueurs de la progression de l'infection par le VIH-1. Par ailleurs, la faible fréquence du génotype homozygote *AA* dans notre population étudiée est une limite éventuelle pour le présent travail.

II.4 - Conclusion

En conclusion, cette étude cas-témoin appuie les conclusions des études précédentes en démontrant que l'allèle *CCR2 +190A* ne semble pas influencer la susceptibilité au VIH-1.

Par ailleurs, nous suggérons que cet allèle mutant ne soit pas un facteur prédictif indépendant du contrôle virologique ou de la restauration immunologique chez les patients marocains sous

traitement. Ce résultat suggère ainsi que la progression de la maladie est multifactorielle et que les mécanismes responsables de cette progression diffèrent selon les individus. Néanmoins, vu la rareté du génotype homozygote muté *A/A* dans notre population, des études, à grande échelle et de suivi à long terme, s'avèrent nécessaires pour analyser davantage la contribution de ce polymorphisme chez les patients sous traitement antirétroviral au Maroc.

II.5 - Publication

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue *GENE REPORTS* :

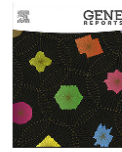
FARISSI FZ, El Annaz H, Melloul M, El Alaoui MA, Tagajdid MR, Abi R, Alaoui Amine S, Marda A, Boui M, El Fahime EM, Mrani S. **Analysis of the *CCR2-64I* (rs1799864) genetic polymorphism distribution and its effect on the risk of HIV-1 infection and immunovirological outcomes in Moroccan ART-treated individuals.** Gene Reports. 2020 ; **20** : p. 100715.

Gene Reports 20 (2020) 100715



Contents lists available at ScienceDirect

Gene Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/genrep

Analysis of the *CCR2-64I* (rs1799864) genetic polymorphism distribution and its effect on the risk of HIV-1 infection and immunovirological outcomes in Moroccan ART-treated individuals



Fatima Zahra Farissi^{a,*}, Hicham El Annaz^a, Marouane Melloul^{b,c}, Moulay Abdelaziz El Alaoui^c, Mohamed Reda Tagajdid^a, Rachid Abi^d, Sanaa Alaoui Amine^{c,d}, Asmaa Marda^e, Mohamed Boui^{a,f}, El Mostapha El Fahime^c, Saad Mrani^{a,g}

^a Reserach Team in Molecular Virology and Oncobiology, Center for Genomics of Human Pathologies (GENOPATH), Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University in Rabat, Av. Mohamed Belarbi El Alaoui, ZIP 6203 Rabat, Morocco

^b Laboratory of Physiology, Genetics and Ethnopharmacology, Faculty of Sciences Oujda, Mohammed Premier University, Oujda, Morocco

^c Molecular Biology and Functional Genomics Platform, National Center for Scientific and Technical Research, CNRST, 8027 Rabat, Morocco

^d Reserach Team in Neurology and Neurogenetics, GENOPATH, Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University in Rabat, Av. Mohamed Belarbi El Alaoui, ZIP 6203 Rabat, Morocco

^e Microbiology, Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohamed V University, Rabat BP 6203, Morocco

^f Department of Dermatology, Mohamed V Military Hospital in Rabat, Morocco

^g National Reference Laboratory, Mohammed VI University of Health Sciences, Casablanca, Morocco

ARTICLE INFO

Keywords:
HIV-1
Susceptibility
CCR2-64I
Chemokine receptor
Immunovirological outcomes
Moroccans

ABSTRACT

Background: Several studies have reported that the *CCR2-64I* genetic polymorphism influences the rate of markers of HIV-1 disease progression (HIV-1 viral loads and CD4+ T cell counts). However, the association between this mutation and HIV-1 infection among antiretroviral therapy (ART)-treated HIV-1 seropositive patients is controversial. In Morocco, no data is available regarding this polymorphism.

Objectives: In the present case-control study, we aimed to investigate the frequency of the *CCR2-64I* genetic polymorphism and to evaluate the association of this mutant allele with susceptibility to HIV-1 infection and immunovirological outcomes in Morocco.

Methods: We recruited 100 HIV-1 seropositive patients (cases) undergoing antiretroviral therapy (ART) and 200 HIV-1 seronegative individuals from Mohammed V Military Training Hospital in Rabat. Genotyping of the *CCR2-64I* polymorphism was performed using Polymerase Chain Reaction (PCR) assay and automated DNA sequencing. The comparison between variables was performed using χ^2 -test, Fisher's exact test, or Mann-Whitney U test, as appropriate. Factors associated with immunovirological outcomes were assessed using logistic regression analysis.

Results: The frequencies of *CCR2-64V/CCR2-64V*, *CCR2-64V/CCR2-64I* and *CCR2-64I/CCR2-64I* genotypes were 67, 30 and 3%, respectively among HIV-1 infected patients (cases), compared to 73, 24.50, and 2.50%, respectively, among HIV-1 uninfected individuals (controls). We didn't observe any statistically significant difference in the genotype distribution between cases and control groups. Additionally, the multivariate logistic regression analysis didn't reveal a significant association between the *CCR2-64I* polymorphism and the immunovirological outcomes after one year of ART ($p > 0.05$).

Conclusion: We are the first to report the frequency of *CCR2-64I* polymorphism and its association with HIV-1 infection in Moroccan individuals. Our findings suggest that the *CCR2-64I* allele may not influence the susceptibility to HIV-1 infection, as was previously reported in other populations. Besides, we hypothesize that this mutation, independently of classical risk factors, may not impact the virological outcomes and immunological

Abbreviations: ART, antiretroviral therapy; CCL, chemokine (C–C motif) ligand; CCR5, C-C chemokine receptor type 5; CCR2, C-C chemokine receptor type 2; CDC, Centers for Disease Control and Prevention; CXCR-4, C-X-C chemokine receptor type 4; DNA, deoxyribonucleic acid; ELISA, the enzyme-linked immunosorbent assay; HAART, highly active antiretroviral therapy; HIV, human immunodeficiency virus; IQR, interquartile range; NNRTIs, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; *NRTIs*, nucleotide reverse transcriptase inhibitors; PCR, Polymerase Chain Reaction; PI, protease inhibitors; RNA, ribonucleic acid; SD, standard deviation; SNP, single-nucleotide polymorphism; SPSS, Statistical Package for the Social Sciences

* Corresponding author at: Reserach Team in Molecular Virology and Oncobiology, Center for Genomics of Human Pathologies (GENOPATH), Faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University in Rabat, Av. Mohamed Belarbi El Alaoui, ZIP 6203 Rabat, Morocco.

E-mail addresses: fz.farissi@yahoo.com, fatimazahra.farissi@um5s.net.ma (F.Z. Farissi).

<https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100715>

Received 30 September 2019; Received in revised form 24 March 2020; Accepted 12 May 2020

Available online 13 May 2020

2452-0144/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

recovery among HIV-1 infected patients under treatment. Nevertheless, this result required confirmation by further large scale and extended follow-up studies, considering the low frequency of the *CCR2-64I/CCR2-64I* homozygous genotype in our population.

1. Introduction

The contribution of chemokines and chemokine receptors in HIV-1 infection is substantial. The entry of HIV-1 virus into CD4-expressing cells is mainly mediated by the CD4 receptor and one or both of the CC and CXC chemokine coreceptors; primarily cysteine-cysteine receptor 5 (CCR5) for macrophage-cell-tropic (R5 tropic) and cysteine-X-cysteine receptor 4 (CXCR4) for T-cell-tropic (X4-tropic) (Dragic et al., 1996; Feng et al., 1996; Gorry et al., 2002). Moreover, it has been proven that some HIV-1 strains (R5 viruses) could also use CCR2 (C-C chemokine receptor type 2) as an alternative coreceptor (Berger et al., 1999). This 7-transmembrane G protein-coupled receptor (Kelvin et al., 1993) recognizes CCL2, CCL7, CCL8, and CCL13 ligands (Zlotnik et al., 2006), and the *CCR2* gene encodes it. The *CCR2* gene is located on chromosome 3p21-p31 in a cluster of CC chemokine receptor genes, including CCR5 (Murphy et al., 2000). Several types of immune cells express CCR2, such as memory T lymphocytes, monocytes, and basophils (Sanders et al., 2000).

CCR2 is one of the most investigated genetic factors confirmed to be related to the host's resistance to HIV-1 infection. A point mutation is known as *CCR2-64I* (rs1799864), in which guanine-to-adenine substitution leads to replacing amino acid valine (V) with isoleucine (I) at position 64 in the first transmembrane domain of the *CCR2* (Smith et al., 1997). Many investigations, but not all, have reported that the *CCR2-64I* polymorphism affects mainly HIV-1 disease progression; individuals carrying this polymorphism may have delayed HIV-1 disease progression by the maintenance of a stable HIV viral load and a slow CD4 T-cell decline (Mulherin et al., 2003; Ammaranond et al., 2013). The mechanism of *CCR2-64I* protection remains unclear; it can be explained by a direct modification of the kinetics of infection, or by an indirect effect of the physiological concentration of CCR2 on the availability of CCR5 on the surface of target cells or through regulation linkage disequilibrium in the regulatory region or promoter region of this gene (Duri, 2012). Also, studies have shown that the mutant allele *CCR2-64I*, forms heterodimers with CXCR4, and therefore, may odd the function of CXCR4 as the co-receptor for X4 viruses (Burton et al., 2005).

On the other hand, several researchers have reported that *CCR2-64I* mutation had no impact on resistance/susceptibility to HIV-1 infection (Smith et al., 1997; Kostrikis et al., 1998; Tan et al., 2010; Ding et al., 2011). However, some reports have shown the opposite (Zapata et al., 2013).

The *CCR2-64I* is an old allele, distributed in many ethnic groups around the world, with the highest frequencies in Africa and Asia (Martinson et al., 2000).

In Morocco, no data is available neither on the frequency of the *CCR2-64I* polymorphism nor on its relationship with HIV-1 infection. Therefore, the present investigation is the first study aiming to investigate the frequency of this mutant allele among ART-treated HIV-1 infected and uninfected Moroccan individuals and examine its association with the predisposition to HIV-1 infection and immunovirological outcomes.

2. Materials and methods

2.1. Ethical considerations

The study was reviewed and approved by the Ethics Committee for Biomedical Research in Rabat registered at the Office for Human Research Protections in the US Department of Health and Human

Services under the number IORG0006594.

To assure anonymity, we have identified the participants by numerical codes, and have ensured the confidentiality of the data. All participants gave their written informed consent.

2.2. Patients and controls

We carried out a case-control study enrolling three hundred randomly selected Moroccan individuals. One hundred blood samples from HIV-1 infected patients (aged ≥ 18 years), were collected during the period between 2012 and 2014, from the Mohammed V Military Training Hospital in Rabat. These samples belong to different regions of Morocco. All infected patients were confirmed as HIV-1 positive by western blotting and real-time PCR using COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test, v2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), and had received an antiretroviral therapy based on the combination of triple therapy (highly active antiretroviral therapy, HAART). First-line HAART consists of the combination of two Nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) with Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) or Protease inhibitors (PI). A successful ARV treatment lowers the viral load to undetectable levels (< 50 copies of HIV RNA/ml) in six months and maintains CD4 above $500/\text{mm}^3$.

Collection of blood samples and examination of immunovirological parameters (Plasma viral load and CD4 T-cell count) were performed at enrollment and after one year of antiretroviral therapy in follow-up visits.

The control group included two hundred unrelated Moroccan healthy blood donors from different regions of Morocco, confirmed to be seronegative for HIV-1 by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). We recruited these controls in 2014, at the blood transfusion center in Mohammed V Military Training Hospital in Rabat.

The study population (cases and controls) consists of Arabs, Arab-Berbers, and Berbers from different regions of Morocco; Tangier-Tetouan-Al Hoceima, Eastern, Fez-Meknes, Rabat-Salé-Kenitra, Béni Mellal-Khénifra, Casablanca-Settat, Marrakesh-Safi, Drâa-Tafilalét, Souss-Massa, Guelmim-Oued Noun, Laayoune-Sakia El Hamra.

3. Methods

3.1.1. Plasma HIV-1 viral load and CD4 T-cell count

The HIV-1 viral load (VL) was determined using the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test, v2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) with a detection limit of 20 HIV RNA copies/mL.

The blood CD4+ T-cells were enumerated by flow cytometry using the Navios Flow Cytometer (Beckman Coulter Life Sciences, USA).

3.1.2. Isolation of genomic DNA

Genomic DNA was extracted from collected Buffy Coat using the ISOLATE II Blood DNA Kit (Bioline, London, UK) according to the manufacturer's instructions. We have evaluated DNA purity using NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). DNA aliquots were maintained at -20°C .

3.1.3. Genotyping of *CCR2-64I* polymorphism

The *CCR2-64I* (rs1799864) polymorphism was analyzed by PCR using a pair of specific primers: *CCR2-64I* F: 5' CCGTGCTCCCTGTCA TAAAT-3' and *CCR2-64I* R: 5'-TGTCAGTCAAGCACTTCAGC-3' (Tan

et al., 2010).

The PCR was carried out in 25 μ L reaction mixture, containing 150 ng genomic DNA, 20 μ M of each primer, 5 μ L 5 \times MyTaq Reaction Buffer and 0.2 μ L MyTaq DNA polymerase (Bioline, London, UK). The Amplification parameters were: initial denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 1 min, followed by 35 cycles at 95 $^{\circ}$ C for 15 s, annealing at 54 $^{\circ}$ C for 20 s, extension at 72 $^{\circ}$ C for 15 s, and a final extension at 72 $^{\circ}$ C for 3 min. The reactions were performed in a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems).

The polymorphism was detected by sequencing the PCR products using the BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit with an ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using the POP-7 polymer. Data were analyzed by sequencing Analysis Software version 5.3.1 (Applied Biosystems).

3.1.4. Immunovirological outcomes

According to CD4+ T-cell counts and HIV-1 viral loads after one year of ART, better immunovirological outcomes were defined by an increase of \geq 25% above the baseline value with a switch from < 200 to > 200 level in CD4+ T-cell counts, and a decrease of at least one logarithm in HIV-1 viral loads below the baseline measurement.

3.2. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the SPSS software version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Genotypic and allelic frequencies were obtained by simple counting. Testing for deviations from Hardy-Weinberg equilibrium was assessed by calculating genotype frequencies first from allele frequencies, and then their deviation from the number of observed genotypes was determined using χ^2 tests. The comparison between variables was performed using χ^2 -test, Fisher exact test, or Mann-Whitney *U* test, as appropriate. Univariate and multivariable logistic regression models were used to identify factors associated with immunovirological outcomes; the single effect of each factor including *CCR2* genotypes was evaluated. The variables with a *p*-value < 0.20 in univariate analysis were included in multivariate analysis. For all tests, confidence intervals (CI) were set at the 95% level, and *p*-values < 0.05 were considered statistically significant.

4. Results

4.1. Demographic and clinical characteristics

The demographic and clinical information of 100 HIV-1 seropositive patients on ART and 200 healthy controls enrolled in the present investigation are detailed in Table 1. Most of the HIV-1 infected patients were males (68%), Arabs (68%), heterosexually infected (89%), and classified in clinical category CDC A (68%) with a mean age of 35.8 years (SD 8.4) at the onset of HIV-1 infection.

The control study group had a median age of 31.5 years (SD 8.9), 71.50% were males, and 68% were Arabs.

CD4 cell counts and HIV-1 viral load measurements among patients (cases) examined at baseline (before commencing antiretroviral therapy), and after one year of ART are shown in Table 2.

4.2. Allelic and genotypic distribution of *CCR2-64I* (rs1799864) polymorphism

The distribution of the *CCR2-64I* genotypes among HIV-1 patients and healthy controls did not deviate from Hardy-Weinberg equilibrium; no significant difference was found between observed and expected genotype numbers in both groups (*p* > 0.05) (Table 3).

As reported in Table 4, 30% of the 100 patients (cases group), were heterozygous for the *CCR2-64I* allele (*CCR2-64V/CCR2-64I*) and 3% had the homozygous genotype (*CCR2-64I/CCR2-64I*) compared to 24.5% and 2.5%, respectively, among healthy individuals (controls

group) (Fig. 1). The *CCR2-64I* allelic frequencies were 18% in patients and 14.75% among controls. No statistically significant difference was observed in the genotypes distribution (*p* = 0.55), and allelic frequencies of *CCR2-64I* variant between the groups (*p* = 0.28).

4.3. Association between *CCR2-64I* polymorphism and ethnicity of the study subjects

We performed a comparison of the ethnicity of cases and control groups based on *CCR2-64I* genotypes. The frequencies of both heterozygous (*CCR2-64V/CCR2-64I*) and homozygous genotypes (*CCR2-64I/CCR2-64I*) did not differ significantly according to that variable (*p* > 0.05) (Table 5).

4.4. Association between *CCR2-64I* polymorphism and clinical features of cases group

Clinical parameters of HIV-1 seropositive patients (Plasma viral load, CD4 T-cell count at baseline and after one year of ART, transmission route, clinical stage, and immunovirological outcomes) were compared based on *CCR2-64I* genotypes. We didn't observe a significant difference in these parameters according to the carriage of *CCR2-64I* mutant allele (*p* > 0.05) (Table 5).

4.5. Association between *CCR2-64I* mutation and immunovirological outcomes

Given the constrained number of *64I/64I* homozygous genotype, we combined the heterozygous and homozygous genotypes as carriers of the mutation.

The univariate analysis showed that only carriage of *CCR2-64I* allele (*p* = 0.038; OR 4.03; 95% CI [1.07–15.09]) and ethnicity (for Berber ethnic group: *p* = 0.026; OR 13.23; 95% CI [1.35–129] and Arab-Berber group: *p* = 0.046; OR 11.33; 95% CI [1.04–122.5]) were significantly associated with poor immunovirological outcomes in our treated patients (Table 6). In multivariate analysis, this association remained significant for ethnicity (for Berber ethnic group; *p* = 0.029; OR 18.134, 95% CI [1.5–3909.4]) but the influence of *CCR2-64I* allele lost its significance (*p* > 0.05) (Table 6).

5. Discussion

Since the discovery of the protective genetic contribution of *CCR2-64I* polymorphism, many studies have investigated the frequency of this mutant allele and its protective effect. In the present report, the

Table 1
Characteristics of the study population.

Parameters	Cases N = 100	Controls N = 200
Sex, n (%)		
Males	68 (68)	143 (71.5)
Females	32 (32)	57 (28.5)
Ethnic group, n (%)		
Arab	68 (68)	136 (68)
Berber	27 (27)	54 (27)
Arab-Berber	5 (5)	10 (5)
Age (mean \pm SD)	35.8 \pm 8.4	31.5 \pm 8.9
Transmission risk group, n (%)		
Heterosexual	89 (89)	–
Unknown	11 (11)	–
CDC category, n (%)		
A	68 (68)	–
B	22 (22)	–
C	10 (10)	–

Table 2
CD4 cell count and HIV-1 viral load follow up data of cases group (n = 100).

	Before ART	1 year after ART
	n (%)	n (%)
CD4 cell count category (cells/mm ³)		
< 200	24 (24)	14 (14)
200–349	18 (18)	18 (18)
350–500	27 (27)	22 (22)
> 500	30 (30)	38 (38)
Not determined	01 (01)	8 (08)
Viral load category (copies/ml)		
Undetectable, < 20	0 (0)	26 (26)
20–400	1 (1)	35 (35)
401–999	4 (4)	1 (1)
1000–9999	14 (14)	10 (10)
≥10,000	80 (80)	18 (18)
Not determined	01 (01)	10 (10)

distribution of *CCR2-64I* allele was 0.18 in HIV-1 seropositive patients compared to 0.1475 among healthy HIV-1 seronegative individuals. The allelic frequency observed among healthy subjects was close to those already reported in other investigations in Iran (0.1221) (Gharagozloo et al., 2005), Cameroon (0.1536) (Nkenfou et al., 2013), Brazil (0.1390) (Ferreira-Fernandes et al., 2015), Hungary (0.186) (Juhász et al., 2012), Turkey (0.1780) (Balci et al., 2017), and relatively higher than observed in Indian population (0.091) (Verma et al., 2007).

On the other hand, a previous study has found higher frequencies among the Chinese Han population (0.2306) (Li et al., 2014).

To our knowledge extent and according to previous studies, we expected to observe this high frequency of *CCR2-64I* allele in the Moroccan population as it's common among African and Asian countries.

The analysis of *CCR2* genotypes distribution data has shown that the χ^2 value was < 3.84, and the *p*-value more than the significance level (*p* > 0.05). So, the null hypothesis is acceptable; observed and expected genotype frequencies didn't differ significantly in patients and controls, suggesting that no selective pressure exists on either allele, which means that our studied Moroccan population is in Hardy-Weinberg equilibrium from generation to generation.

HIV-1 seropositive patients, compared to healthy subjects, had a slightly higher frequency of *CCR2-64I* allele (18%), but this difference wasn't statistically significant (*p* > 0.05). Therefore, we suggest that this genetic polymorphism may not have a protective effect or influence the host's susceptibility to HIV-1 infection in Moroccan individuals.

This finding was consistent with the results of various studies carried out among North Indians (Kaur et al., 2007), Chinese Han population (Li et al., 2014), Poland (Parczewski et al., 2009) and Cameroon (Nkenfou et al., 2013). Furthermore, another study in Luxembourg has reported a similar conclusion (Roman et al., 2002). However, some researchers have observed a statistically significant difference in the

Table 3
Comparison between expected and observed genotype numbers in cases and controls.

Genotype	Cases (n = 100)				Controls (n = 200)			
	Observed	Expected ^a	χ^2	<i>p</i> value	Observed	Expected ^a	χ^2	<i>p</i> value
CCR2-64V/CCR2-64V	67	67.2	0.0264	0.87	146	145.4	0.1330	0.71
CCR2-64V/CCR2-64I	30	29.5			49	50.3		
CCR2-64I/CCR2-64I	3	3.2			5	4.4		

^a This table presents the frequencies of the *CCR2* genotypes predicted by the Hardy Weinberg Equilibrium based on the frequencies of the genotypes observed in our study. For these calculations, *p* indicates the frequency of the wild type allele (*CCR2-64V*) and *q*, the frequency of the mutant allele (*CCR2-64I*), where *p* + *q* = 1. A population in Hardy-Weinberg equilibrium will show three genotypes with proportions answering the equation: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. For each generation, the frequency with the homozygous wild-type genotype (*CCR2-64V/CCR2-64V*), is thus p^2 and the frequencies of heterozygous (*CCR2-64V/CCR2-64I*), and homozygous mutant genotypes (*CCR2-64I/CCR2-64I*) are $2pq$ and q^2 respectively.

Table 4
Genotypes and alleles frequencies of the *CCR2-64I* polymorphism in cases and controls.

	Cases (n = 100)	Controls (n = 200)	<i>p</i> value ^a
Genotypes (n/%)			
CCR2-64V/CCR2-64V	67 (67)	146 (73)	0.55
CCR2-64V/CCR2-64I	30 (30)	49 (24.50)	
CCR2-64I/CCR2-64I	3 (3)	5 (2.50)	
Alleles (n/%)			
+ (wild type)	164 (82)	341 (85.25)	0.28
64I (mutant)	36 (18)	59 (14.75)	

^a Fisher's exact test.: Significance between cases and controls.

frequency of *CCR2-64I* mutation between HIV-seronegative and HIV-seropositive individuals and suggested a potential association of this variant allele and susceptibility to HIV-1 infection (Shrestha et al., 2006; Zwolińska et al., 2016).

Although the mutant allele *CCR2-64I* has not been shown to completely protect against HIV-1 susceptibility (Ding et al., 2011), several investigations have reported a protective effect of this polymorphism on HIV-1 disease progression (Xu et al., 2010). Nevertheless, some studies have revealed contrary results (Singh et al., 2003; Philpott et al., 2004; Roy and Chakrabarti, 2012). In our study, the clinical features of patients (transmission route, viral loads, CD4 T-cell count, and clinical stage) didn't differ significantly according to *CCR2-64I* genotypes. Similarly, we didn't observe a significant difference in immunovirological outcomes after one year of ART, between *CCR2-64I* genotypes (*p* > 0.05), which is congruent with the findings of Puissant et al. (2006) who also found no significant difference in *CCR2-64I* between responders and non-responders patients. Additionally, in univariate analysis of factors associated with the immunovirological outcomes, carriage of the *CCR2-64I* allele was significantly associated with poor immunovirological outcomes after one year of ART as well as ethnicity. But the multivariate analysis demonstrated that *CCR2-64I* polymorphism was not an independent factor, while ethnicity retained a significant independent predictive value of immunovirological outcomes. Thus, we suggest that this mutation alone and independently of other known factors may have no direct effect on viral load levels and CD4 T-cell count recovery in our population. In contrast, Restrepo et al. have reported a significant independent association between *CCR2-64I* heterozygous genotype and immunological non-responder status (Restrepo et al., 2019).

The significant association between ethnicity (the Berber group) and immunovirological outcomes is probably due to differences in cultural and psychological factors (HIV-related stigma and depression), health-seeking behaviors, and socioeconomic status between our ethnic groups. These factors could impact adherence to ART (Spire et al., 2008; Sumari-de Boer et al., 2012), which may influence the

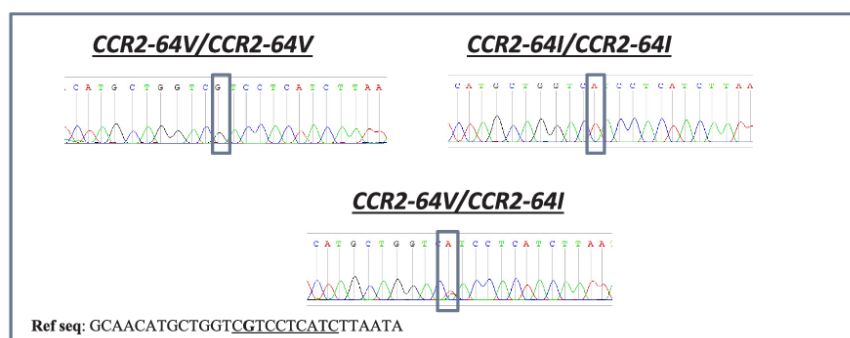


Fig. 1. Results of sequencing for homozygous G/G (CCR2-64V/CCR2-64V), A/A (CCR2-64I/CCR2-64I) and the heterozygous A/G (CCR2-64V/CCR2-64I) are indicated in the electropherograms.

Table 5
Comparison of ethnicity and clinical features according to CCR2 genotypes.

	CCR2-64V/CCR2-64V		CCR2-64V/CCR2-64I		CCR2-64I/CCR2-64I		p value* (cases)	p value* (controls)
	Cases (N = 67)	Controls (N = 146)	Cases (N = 30)	Controls (N = 49)	Cases (N = 3)	Controls (N = 5)		
Ethnicity, n (%)								
Arab	45 (67.2)	100 (68.5)	21 (70)	32 (65.3)	02 (66.7)	04 (80)	0.96	0.78
Berber	19 (28.4)	40 (27.4)	07 (23.3)	13 (26.5)	01 (33.3)	01 (20)		
Arab-Berber	03 (4.4)	06 (4.1)	02 (6.7)	04 (8.2)	00 (00)	00 (00)		
Transmission route, n (%)								
Heterosexual	58 (86.6)	–	28 (93.3)	–	03 (100)	–	0.5	–
Unknown	09 (13.4)	–	02 (6.7)	–	00 (00)	–		
CDC category, n (%)								
A	49 (73.2)	–	18 (60)	–	01 (33.3)	–	0.2	–
B	11 (16.4)	–	09 (30)	–	02 (66.7)	–		
C	07 (10.4)	–	03 (10)	–	00 (00)	–		
Baseline plasma viral load (median [IQR] copies/ml)	63,450 [20,958;239,883]	–	111,000 [7541; 258,851]	–	37,100 [17,378; 37,100]	–	0.61	–
Plasma viral load 1 year of ART (median [IQR] copies/ml)	117 [20;2216]	–	50 [20; 3070]	–	15,135 [20; 15,135]	–	0.63	–
Baseline CD4 T-cell count (median [IQR] cells/mm ³)	360 [213;547]	–	396 [212; 535]	–	299 [60; 299]	–	0.28	–
CD4 T-cell count 1 year of ART (Median [IQR] cells/mm ³ after 1 year)	438 [300;659]	–	442 [290; 630]	–	316 [104; 316]	–	0.13	–
Immunovirological outcomes (%)								
Better	20 (29.9)	–	03 (10)	–	00 (00)	–	0.08	–
Poor	38 (56.7)	–	21 (70)	–	02 (66.7)	–		
Missing data	09 (13.4)	–	06 (20)	–	01 (33.3)	–		

ART: antiretroviral therapy.

* p-Values for the comparison of variables according to different genotypes (Mann-Whitney U test or Chi-square test as appropriate).

immunologic progression and virologic control among the Berber ethnic group. Similarly, other studies have reported a significant association between ethnicity and immunovirological outcomes (Smith et al., 2003; Klein et al., 2014; Bhagwat et al., 2019).

Few studies have investigated the effect of CCR2 polymorphisms on the markers of HIV-1 disease progression (viral loads and CD4 T-cell counts) among patients receiving ART. In partial agreement with our results, almost all of the previous investigations assessing this effect in treated individuals, have not shown a significant impact of the CCR2-64I polymorphism on HIV-1 viral loads or CD4 T-cell counts (Schinkel et al., 1999; Wit et al., 2002; Philpott et al., 2004; Fernandez et al., 2006; Puissant et al., 2006).

The real efficient role of CCR2-64I in HIV-1 disease progression, still unclear and controversial, since it's just a mutation of a minor coreceptor for HIV-1. Some previous reports have shown that this SNP is in complete linkage disequilibrium with a C to T substitution on CCR5

regulatory region and it might down-modulate the expression of the principal HIV-1 co-receptors CCR5 and CXCR4 (Kostrikis et al., 1998; Lee et al., 1998; Nakayama et al., 2004). However, other studies have failed to show a statistically significant difference in levels of CCR5 expression on peripheral blood mononuclear cells between CCR2-64V/CCR2-64V wild type and CCR2-64I/CCR2-64I homozygous genotypes (Lee et al., 1998; Mariani et al., 1999).

The results of our investigation are likely due to the fact of undergoing ART that affects markers of HIV-1 disease progression and then, can mask the direct effect of the CCR2-64I polymorphism on immunovirological outcomes among our treated patients. Furthermore, previous reports have revealed that viral genetic variability (Campbell et al., 2004), health care, co-infections (Konrad et al., 2013), ethnicity (Singh et al., 2003) and psychological factors (O'Cleirigh et al., 2007), may have an impact on the progression of HIV-1 infection.

Besides, the present investigation has potential limitations, which

Table 6
Univariate and multivariate analysis of factors associated with immunovirological outcomes in treated patients (cases group).

	Frequencies ^a		Univariate			Multivariate		
	Better IVO	Poor IVO	OR	95% CI	p-Value	OR	95% CI	p-Value
Gender, n (%)								
Males (N = 68)	12 (52.2)	45 (73.8)	Reference	–	–	–	–	–
Females (N = 32)	11 (47.8)	16 (26.2)	2,578	0,951–6,990	0,063	0,25	0,38–1,762	0,255
Age (mean ± SD)	34.09 ± 8.3	36.34 ± 8.3	1034	0,974–10,98	0,266	–	–	–
Age group, n (%)								
18–35	14 (60.9)	33 (54.1)	Reference	–	–	–	–	–
36–45	06 (26.1)	18 (29.5)	1,27	0,41–3,88	0,67	–	–	–
46–60	03 (13)	13 (16.4)	1,41	0,33–5,93	0,63	–	–	–
Ethnic group, n (%)								
Arab (N = 68)	13 (56.5)	43 (70.5)	Reference	–	–	–	–	–
Berber (N = 27)	06 (26.1)	17 (27.9)	13,23	1,35–129	0,026	18,134	1,5–3909,4	0,029
Arab-Berber (N = 5)	04 (17.4)	01 (1.6)	11,33	1,04–122,5	0,046	17,41	0,4–725,9	0,13
Transmission route, n (%)								
Heterosexual (N = 87)	21 (91)	52 (85.2)	Reference	–	–	–	–	–
Unknown (N = 13)	02 (8.7)	09 (14.8)	0,55	0,110–2763	0,468	–	–	–
CDC category, n (%)								
A (N = 68)	18 (78.3)	37 (60.7)	Reference	–	–	–	–	–
B (N = 22)	05 (21.7)	16 (26.2)	1,55	0,49–4,92	0,45	–	–	–
C (N = 10)	00 (00)	08 (13.1)	0,93	0,24–3,54	0,9	–	–	–
Genotypes (n/%)								
WT/WT (N = 67)	20 (87)	38 (62.3)	Reference	–	–	–	–	–
WT/64I-64I/64I (N = 33)	03 (13)	23 (37.7)	4,03	1,07–15,09	0,038	1	–	0,99

IVO: immunovirological outcomes after one year of antiretroviral therapy.

The bold value indicates statistically significant values.

^a 16 missing data for immunovirological outcomes.

are the relatively small number of HIV-1 seropositive patients and the low frequency of the homozygous genotype (64I/64I) in our study population. Therefore, further studies involving a larger sample size are required. Additionally, genotyping of the CCR5 promoter, which is in strong linkage disequilibrium with CCR2-64I, may provide conclusive results concerning the association of the CCR2-64I genetic polymorphism with the HIV-1 disease progression in Morocco.

6. Conclusion

The results of the current report confirm the previous findings indicating that the CCR2-64I allele may not influence HIV-1 susceptibility. Additionally, we suggest that this mutant allele may not be an independent factor for virological outcomes or CD4+ T cell count recovery in Moroccan patients under treatment. However, this result needs to be confirmed by broader and long-term follow-up studies.

Financial support

This work was supported by the Mohammed V University in Rabat, Morocco.

CRedit authorship contribution statement

Fatima Zahra Farissi: Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Hicham El Annaz:** Conceptualization, Formal analysis. **Marouane Melloul:** Methodology, Investigation. **Moulay Abdelaziz El Alaoui:** Methodology, Visualization, Writing - review & editing. **Mohamed Reda Tagajdid:** Data curation. **Rachid Abi:** Data curation. **Sanaa Alaoui Amine:** Investigation. **Asmaa Marda:** Formal analysis. **Mohamed Boui:** Project administration. **El Mostapha El Fahime:** Resources. **Saad Mrani:** Resources, Validation, Supervision, Project administration.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

We carried out this work in collaboration with the Military Hospital of Instruction Mohammed V of Rabat and the National Center for Scientific and Technical Research, Morocco. We thank Pr M. KHALFAOUI, CNRST Director.

References

- Ammaranond, P., Sanguansithianan, S., Phaengchomduan, P., Sae-Lee, C., Mardkhumchan, S., 2013. Impact of CCR2 and SDF1 polymorphisms on disease progression in HIV-infected subjects in Thailand. *J. Clin. Lab. Anal.* 27, 38–44.
- Baki, A., Yegin, Z., Koc, H., 2017. Prevalence of HIV/AIDS protective alleles (CCR5-Δ32, CCR2-64I, and SDF1-3'A) in Turkish population. *AIDS* 6 (8).
- Berger, E.A., Murphy, P.M., Farber, J.M., 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 657–700.
- Bhagwat, P., Kapadia, S.N., Ribaud, H.J., Gulick, R.M., Currier, J.S., 2019. Racial Disparities in Virologic Failure and Tolerability During Firstline HIV Antiretroviral Therapy. *Open Forum Infectious Diseases*. Oxford University Press, US, pp. ofz022.
- Burton, C.T., Gotch, F.M., Imami, N., 2005. CCR2/64I mutation detection in a HIV-1-positive patient with slow CD4 T-cell decline and delay in disease progression. *Int. J. STD AIDS* 16, 392–395.
- Campbell, G.R., Pasquier, E., Watkins, J., Bourgarel-Rey, V., Peyrot, V., Esquieu, D., Barbier, P., de Mareuil, J., Braguer, D., Kaleebu, P., 2004. The glutamine-rich region of the HIV-1 Tat protein is involved in T-cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 48197–48204.
- Ding, D.-L., Liu, S.-J., Zhu, H.-Z., 2011. Association between the CCR2-Val64Ile polymorphism and susceptibility to HIV-1 infection: a meta-analysis. *Mol. Med. Rep.* 4, 181–186.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y., Nagashima, K.A., Cayanana, C., Maddon, P.J., Koup, R.A., Moore, J.P., 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381, 667.
- Duri, K., 2012. Coreceptor usage in HIV infection. *Immunodeficiency* 235–258.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., Berger, E.A., 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872–877.
- Fernandez, S., Rosenow, A.A., James, I.R., Roberts, S.G., Nolan, R.C., French, M.A., Price, P., 2006. Recovery of CD4+ T cells in HIV patients with a stable virologic response to antiretroviral therapy is associated with polymorphisms of interleukin-6 and central

- major histocompatibility complex genes. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 41, 1–5.
- Ferreira-Fernandes, H., Santos, A., Motta, F., Canalle, R., Yoshioka, F., Burbano, R., Rey, J., da Silva, B., Pinto, G., 2015. Prevalence of CCR5-Δ32 and CCR2-V64I polymorphisms in a mixed population from northeastern Brazil. *Genet. Mol. Res.* 14, 11710–11718.
- Gharagozloo, M., Doroudchi, M., Farjadian, S., Pezeshki, A.M., Ghaderi, A., 2005. The frequency of CCR5Δ32 and CCR2-64I in southern Iranian normal population. *Immunol. Lett.* 96, 277–281.
- Gorry, P.R., Zhang, C., Wu, S., Kunstman, K., Trachtenberg, E., Phair, J., Wolinsky, S., Gabuzda, D., 2002. Persistence of dual-tropic HIV-1 in an individual homozygous for the CCR5Δ32 allele. *Lancet* 359, 1832–1834.
- Juhász, E., Béres, J., Kanizsai, S., Nagy, K., 2012. The consequence of a founder effect: CCR5-Δ32, CCR2-64I and SDF1-3'A polymorphism in Vlach gypsy population in Hungary. *Pathol. Oncol. Res.* 18, 177–182.
- Kaur, G., Singh, P., Kumar, N., Rathhap, C., Sharma, G., Vajpayee, M., Wig, N., Sharma, S., Mehra, N., 2007. Distribution of CCR2 polymorphism in HIV-1-infected and healthy subjects in North India. *Int. J. Immunogenet.* 34, 153–156.
- Kelvin, D.J., Michiel, D.F., Johnston, J.A., Lloyd, A.R., Sprenger, H., Oppenheim, J.J., Wang, J.M., 1993. Chemokines and serpentine: the molecular biology of chemokine receptors. *J. Leukoc. Biol.* 54, 604–612.
- Klein, M.B., Young, J., Dunn, D., Ledergerber, B., Sabin, C., Cozzi-Lepri, A., Dabis, F., Harrigan, R., Tan, D.H., Walmsley, S., 2014. The effects of HIV-1 subtype and ethnicity on the rate of CD4 cell count decline in patients naive to antiretroviral therapy: a Canadian-European collaborative retrospective cohort study. *CMAJ Open* 2, E318.
- Konrad, S., Skinner, S., Kazadi, G.B., Gartner, K., Lim, H.J., 2013. HIV disease progression to CD4 count < 200 cells/μL and death in Saskatoon, Saskatchewan. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 24, 97–101.
- Kostrikis, L.G., Huang, Y., Moore, J.P., Wolinsky, S.M., Zhang, L., Guo, Y., Deutsch, L., Phair, J., Neumann, A.U., Ho, D.D., 1998. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat. Med.* 4, 350.
- Lee, B., Doranz, B.J., Rana, S., Yi, Y., Mellado, M., Frade, J.M., Martinez-An, C., O'Brien, S.J., Dean, M., Collman, R.G., 1998. Influence of the CCR2-V64I polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 coreceptor activity and on chemokine receptor function of CCR2b, CCR3, CCR5, and CXCR4. *J. Virol.* 72, 7450–7458.
- Li, H., Liu, T.-J., Hong, Z.-H., 2014. Gene polymorphisms in CCR5, CCR2, SDF1 and RANTES among Chinese Han population with HIV-1 infection. *Infect. Genet. Evol.* 24, 99–104.
- Mariani, R., Wong, S., Mulder, L.C., Wilkinson, D.A., Reinhart, A.L., LaRosa, G., Nibbs, R., O'Brien, T.R., Michael, N.L., Connor, R.I., 1999. CCR2-64I polymorphism is not associated with altered CCR5 expression or coreceptor function. *J. Virol.* 73, 2450–2459.
- Martinson, J.J., Hong, L., Karanicolos, R., Moore, J.P., Kostrikis, L.G., 2000. Global distribution of the CCR2-64I/CCR5-59653T HIV-1 disease-protective haplotype. *Aids* 14, 483–489.
- Mulherin, S.A., O'Brien, T.R., Ioannidis, J.P., Goedert, J.J., Buchbinder, S.P., Coutinho, R.A., Jamieson, B.D., Meyer, L., Michael, N.L., Pantaleo, G., 2003. Effects of CCR5-Δ32 and CCR2-64I alleles on HIV-1 disease progression: the protection varies with duration of infection. *Aids* 17, 377–387.
- Murphy, P.M., Baggolini, M., Charo, I.F., Hébert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., Power, C.A., 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 52, 145–176.
- Nakayama, E.E., Tanaka, Y., Nagai, Y., Iwamoto, A., Shioda, T., 2004. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. *Aids* 18, 729–738.
- Nkenfou, C.N., Mekue, L.C.M., Nana, C.T., Kuiate, J.R., 2013. Distribution of CCR5-Delta32, CCR5 promoter 59029 A/G, CCR2-64I and SDF1-3'A genetic polymorphisms in HIV-1 infected and uninfected patients in the West Region of Cameroon. *BMC Res. Notes* 6, 288.
- O'Leirigh, C., Ironson, G., Weiss, A., Costa Jr., P.T., 2007. Conscientiousness predicts disease progression (CD4 number and viral load) in people living with HIV. *Health Psychol.* 26, 473.
- Parczewski, M., Leszczyszyn-Pynka, M., Kaczmarczyk, M., Adler, G., Bińczak-Kuleta, A., Łoniewska, B., Boroń-Kaczmarek, A., Ciechanowicz, A., 2009. Sequence variants of chemokine receptor genes and susceptibility to HIV-1 infection. *J. Appl. Genet.* 50, 159–166.
- Philpott, S., Burger, H., Tarwater, P.M., Lu, M., Gange, S.J., Anastos, K., Cohen, M., Greenblatt, R.M., Kovacs, A., Minkoff, H., 2004. CCR2 genotype and disease progression in a treated population of HIV type 1-infected women. *Clin. Infect. Dis.* 39, 861–865.
- Puissant, B., Roubinet, F., Massip, P., Sandres-Saune, K., Apoil, P.-A., Abbal, M., Pasquier, C., Izopet, J., Blancher, A., 2006. Analysis of CCR5, CCR2, CX3CR1, and SDF1 polymorphisms in HIV-positive treated patients: impact on response to HAART and on peripheral T lymphocyte counts. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 22, 153–162.
- Restrepo, C., Gutiérrez-Rivas, M., Pacheco, Y.M., García, M., Blanco, J., Medrano, L.M., Navarrete-Muñoz, M.A., Gutiérrez, F., Miralles, P., Dalmau, D., 2019. Genetic variation in CCR2 and CXCL12 genes impacts on CD4 restoration in patients initiating cART with advanced immunosuppression. *PLoS One* 14, e0214421.
- Roman, F., Franck, N., Burgy, C., Servais, J., Zimmer, J.-M., Mossong, J., Goubau, P., Schneider, F., Hemmer, R., Schmit, J.-C., 2002. Prevalence of HIV co-receptor polymorphisms in HIV-infected patients and uninfected volunteers in Luxembourg. *HIV Clin. Trials* 3, 195–201.
- Roy, P., Chakrabarti, S., 2012. The distribution of CCR2-64I, SDF1-3' A and MCP1-2518 G/A genes polymorphism in a specific high risk group from the northeastern states West Bengal, and Gorkha population in India. *Indian J. Virol.* 23, 286–293.
- Sanders, S.K., Crean, S.M., Boxer, P.A., Kellner, D., LaRosa, G.J., Hunt, S.W., 2000. Functional differences between monocyte chemotactic protein-1 receptor A and monocyte chemoattractant protein-1 receptor B expressed in a Jurkat T cell. *J. Immunol.* 165, 4877–4883.
- Schinkel, J., Langendam, M.W., Coutinho, R.A., Krol, A., Brouwer, M., Schuitemaker, H., 1999. No evidence for an effect of the CCR5 Δ32/+ and CCR2b 64I/+ mutations on human immunodeficiency virus (HIV)-1 disease progression among HIV-1-infected injecting drug users. *J. Infect. Dis.* 179, 825–831.
- Shrestha, S., Strathdee, S.A., Galal, N., Oleksyk, T., Fallin, M.D., Mehta, S., Schaid, D., Vlahov, D., O'Brien, S.J., Smith, M.W., 2006. Behavioral risk exposure and host genetics of susceptibility to HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 193, 16–26.
- Singh, K.K., Barroga, C.F., Hughes, M.D., Chen, J., Raskino, C., McKimney, R.E., Spector, S.A., 2003. Genetic influence of CCR5, CCR2 and SDF1 variants on human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-related disease progression and neurological impairment, in children with symptomatic HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 188, 1461–1472.
- Smith, M.W., Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G.A., Lomb, D.A., Goedert, J.J., O'Brien, T.R., Jacobson, L.P., Kaslow, R., 1997. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. *Science* 277, 959–965.
- Smith, P.R., Sarner, L., Murphy, M., James, B., Thomas, J.M., Skinner, C.J., Aitken, C., 2003. Ethnicity and discordance in plasma HIV-1 RNA viral load and CD4+ lymphocyte count in a cohort of HIV-1-infected individuals. *J. Clin. Virol.* 26, 101–107.
- Spire, B., Carrieri, P., Sopha, P., Protopoulos, C., Prak, N., Quillet, C., Ngeeth, C., Ferradini, L., Delfraissy, J.-F., Laureillard, D., 2008. Adherence to antiretroviral therapy in patients enrolled in a comprehensive care program in Cambodia: a 24-month follow-up assessment. *Antivir. Ther.* 13, 697–703.
- Sumari-de Boer, I.M., Sprangers, M.A., Prins, J.M., Nieuwkerk, P.T., 2012. HIV stigma and depressive symptoms are related to adherence and virological response to antiretroviral treatment among immigrant and indigenous HIV infected patients. *AIDS Behav.* 16, 1681–1689.
- Tan, X.-h., Zhang, J.-y., Di, C.-h., Hu, A.-r., Yang, L., Qu, S., Zhao, R.-l., Yang, P.-r., Guo, S.-x., 2010. Distribution of CCR5-Δ32, CCR5m303A, CCR2-64I and SDF1-3' A in HIV-1 infected and uninfected high-risk Uighurs in Xinjiang, China. *Infect. Genet. Evol.* 10, 268–272.
- Verma, R., Gupta, R.B., Singh, K., Bhasin, R., Shukla, A.A., Chauhan, S.S., Luthra, K., 2007. Distribution of CCR5Δ32, CCR2-64I and SDF1-3' A and plasma levels of SDF-1 in HIV-1 seronegative North Indians. *J. Clin. Virol.* 38, 198–203.
- Wit, F.W., van Rij, R.P., Weverling, G.J., Lange, J.M., Schuitemaker, H., 2002. CC chemokine receptor 5 Δ32 and CC chemokine receptor 2 64I polymorphisms do not influence the virologic and immunologic response to antiretroviral combination therapy in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J. Infect. Dis.* 186, 1726–1732.
- Xu, L., Qiao, Y., Zhang, X., Sun, H., Wang, J., Sun, D., Jin, Y., Yu, Y., Chen, F., Bai, J., 2010. CCR2-64I allele is associated with the progression of AIDS in a Han Chinese population. *Mol. Biol. Rep.* 37, 311–316.
- Zapata, W., Aguilar-Jiménez, W., Pineda-Trujillo, N., Rojas, W., Estrada, H., Rugeles, M.T., 2013. Influence of CCR5 and CCR2 genetic variants in the resistance/susceptibility to HIV in serodiscordant couples from Colombia. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 29, 1594–1603.
- Zlotnik, A., Yoshie, O., Nomiya, H., 2006. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol.* 7, 243.
- Zwolińska, K., Blachowicz, O., Tomczyk, T., Knysz, B., Gąsiorowski, J., Zalewska, M., Orzechowska, B.U., Sochocka, M., Piasecki, E., 2016. The effects of killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes on susceptibility to HIV-1 infection in the Polish population. *Immunogenetics* 68, 327–337.

III - LE POLYMORPHISME GENETIQUE *SDF1 +801 G>A* (RS1801157) ET SON EFFET SUR LA SUSCEPTIBILITE AU VIH-1 ET L'EVOLUTION IMMUNOVIROLOGIQUE PREDICTIVE DE LA PROGRESSION DE LA MALADIE CHEZ LES PATIENTS SOUS TRAITEMENT ANTIRETROVIRAL

III.1 - Contexte de l'étude

Comme discuté auparavant, l'histoire naturelle et le processus de l'infection par le VIH-1 sont complexes, variables et dépendent d'une multitude de facteurs viraux, de facteurs de l'hôte et de leurs interactions. Les polymorphismes des gènes des chimiokines peuvent également influencer la susceptibilité au VIH-1 et le taux de progression vers le SIDA. Cependant, leur influence sur la restauration immunologique ou le contrôle virologique chez les patients suivant une thérapie HAART reste incertaine.

Il a été démontré que le SNP *SDF1 +801 G>A* (rs1801157) du gène codant pour la chimiokine SDF1 qui est le ligand unique pour le corécepteur CXCR4 du VIH-1, entraîne une surexpression de cette chimiokine. Par conséquent, les niveaux élevés du SDF1 permettent d'inhiber l'infection par les souches T-tropiques du VIH-1. En outre, le *SDF1 +801 G>A* pourrait protéger contre la progression clinique rapide vers le SIDA, et cela a été démontré plus clairement chez les patients non traités [786]. Toutefois, les résultats concernant l'effet de cette mutation sont controversés [894, 895]. De même, chez les patients recevant une thérapie HAART, certaines études ont révélé une amélioration des réponses immunologique et virologique en association avec le SNP *SDF1 +801 G>A* [9], contrairement à d'autres qui n'ont pas trouvé cette corrélation [896, 897].

Dans ce contexte, la présente étude a été menée pour étudier pour la première fois au Maroc, la distribution de l'allèle *SDF1 +801A* ainsi que son influence potentielle sur la susceptibilité au VIH-1 et l'évolution immunovirologique chez des patients sous traitement antirétroviral.

III.2 - Résultats

III.2.1 - Caractéristiques de la population étudiée

Deux cent quatre-vingt-quinze personnes ont été étudiées : 100 patients infectés par le VIH-1 (cas) sous traitement antirétroviral et 195 témoins sains. Le tableau XVI représente les caractéristiques de la population étudiée. L'âge moyen des patients était de $35,4 \pm 8,1$ lors du

diagnostic, et la plupart d'entre eux étaient des hommes (74 %), arabes (65 %), et classés dans la catégorie clinique CDC A (69 %). En ce qui concerne le mode de transmission, 91 % des patients étaient infectés par voie hétérosexuelle, et pour les 9 patients restants, cette donnée n'était pas disponible. Le groupe témoin avait un âge moyen de 33.9 ± 8.9 ans, 82.1 % étaient des hommes et 69.7 % étaient des Arabes.

Tableau XVI : Caractéristiques de la population étudiée

Caractéristiques	Cas n=100	Témoins n=195
Sexe, n (%)		
Hommes	74 (74)	160 (82.1)
Femmes	26 (26)	35 (17.9)
Origine ethnique, n (%)		
Arabe	65 (65)	136 (69.7)
Berbère	29 (29)	54 (27.7)
Arabo-berbère	6 (6)	5 (2.6)
Age (années), moyenne \pm SD	35.4 ± 8.1	33.9 ± 8.9
Transmission, n (%)		
Hétérosexuelle	91 (91)	-
Inconnue	9 (9)	-
Stade clinique (CDC), n (%)		
A	69 (69)	-
B	21 (21)	-
C	10 (10)	-

Les mesures du taux de cellules T CD4+ et de la charge virale VIH-1 chez les patients (cas), obtenues au baseline et après un an du traitement antirétroviral sont représentées dans le tableau XVII.

Tableau XVII : Mesures du taux des cellules T CD4+ et de la charge virale VIH-1 chez les patients (n= 100)

	Baseline n (%)	Un an après TAR* n (%)
Intervalles Taux T CD4+ (cellules/mm³)		
< 200	22 (22.5)	6 (6.8)
200-499	45 (45.9)	41 (46.6)
≥ 500	31 (31.6)	41 (46.6)
Manquant	2	12
Intervalles charge virale (copies/mL)		
Indétectable, < 20	0 (0)	48 (53.9)
20-399	02 (2)	14 (15.7)
400-100000	54 (55.1)	21 (23.6)
> 100000	42 (42.9)	6 (6.7)
Manquant	2	11

* **TAR** : traitement antirétroviral

III.2.2 - Distribution génotypique et allélique du polymorphisme *SDF1* +801 G>A

Le polymorphisme *SDF1* +801 G>A a été détectée par séquençage (figure 53). La distribution des fréquences génotypiques du *SDF1* +801 G>A chez les patients VIH-1 et les témoins sains était en équilibre de Hardy-Weinberg (HWE) ; nous n'avons pas observé une différence statistiquement significative entre les nombres de génotypes observés et attendus chez les deux groupes étudiés ($p > 0,05$) (tableau XVIII).

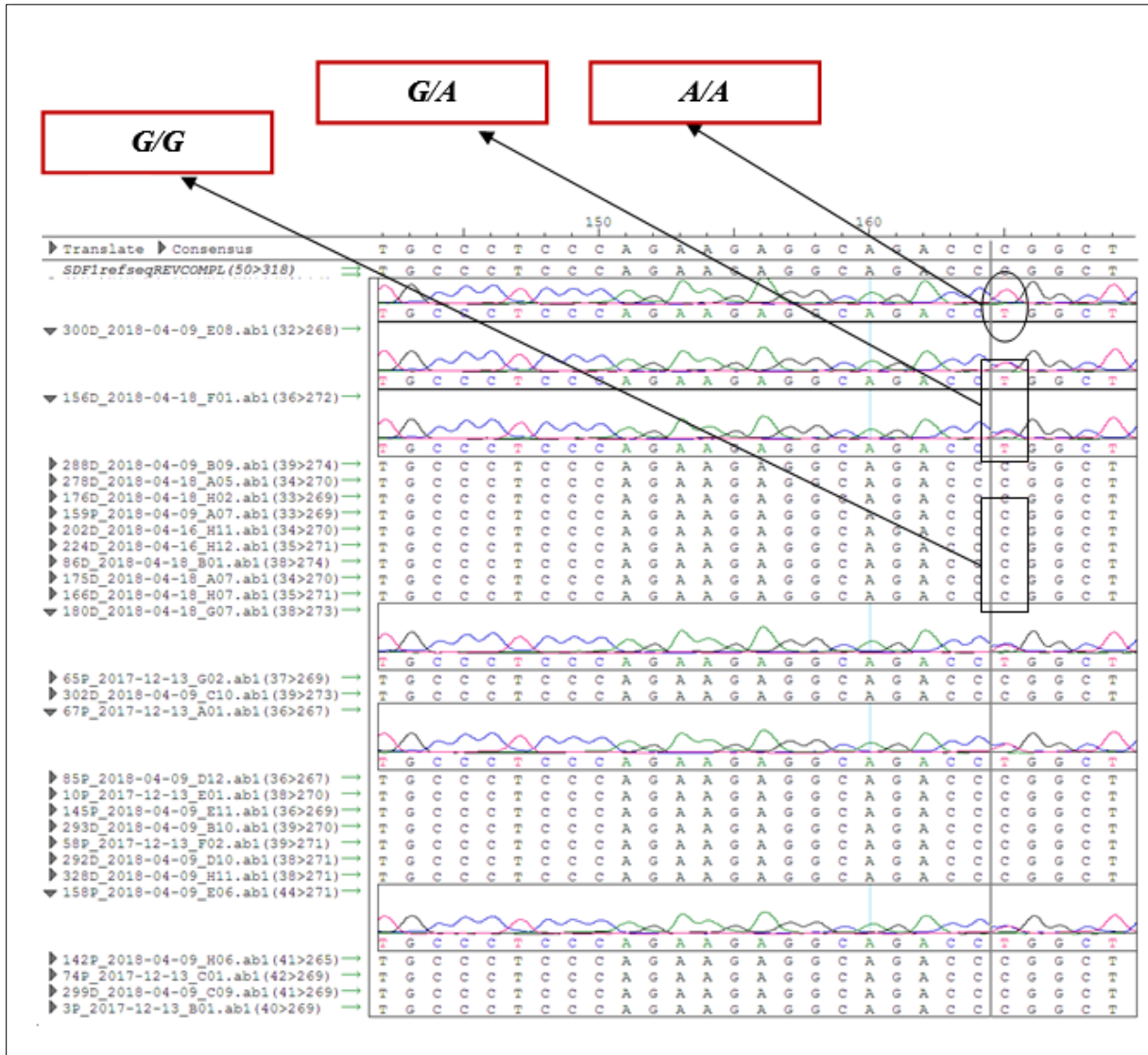


Figure 53 : Les résultats du séquençage du gène *SDF1*. Les génotypes homozygote sauvage *G/G*, homozygote muté *A/A* et hétérozygote *G/A* sont indiqués dans l'électrophorégramme

Tableau XVIII : Comparaison entre les fréquences génotypiques prévues et observées chez les cas et les témoins

Génotype <i>SDF1 +801 G>A</i>	Cas (n=100)				Témoins (n=195)			
	Observé	Prévu	χ^2	p value	Observé	Prévu	χ^2	p value
G/G	69	70.6	1.3472	0.24	131	128.0	1.9260	0.16
G/A	30	26.9			54	60.0		
A/A	1	2.6			10	7.0		

Ce tableau présente les fréquences des génotypes *SDF1* prédites par l'équilibre de Hardy Weinberg sur la base des fréquences des génotypes observés dans notre étude. Pour ces calculs, p indique la fréquence de l'allèle de type sauvage (*SDF1*) et q , la fréquence de l'allèle mutant (*SDF1 +801A*), où $p+q=1$. Une population en équilibre de Hardy-Weinberg présentera trois génotypes dont les proportions répondent à l'équation : $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Pour chaque génération, la fréquence du génotype homozygote de type sauvage G/G est donc p^2 et les fréquences des génotypes hétérozygote G/A et homozygote mutant A/A sont respectivement $2pq$ et q^2 .

Le tableau XIX montre la distribution génotypique et allélique de l'allèle mutant *SDF1 +801A* chez les cas et le groupe témoin. L'allèle *SDF1 +801A* avait tendance à être plus moins fréquent chez les cas, bien que la différence ne soit pas significative ($p = 0,75$ par rapport aux témoins). Par ailleurs, aucune différence statistiquement significative n'a été observée dans la distribution génotypique entre les deux groupes ($p = 0,2$).

Tableau XIX : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme *SDF1 +801 G>A* chez les cas et les témoins

	Cas (n=100)	Témoins (n=195)	p value*
Génotypes (n/%)			
G/G	69 (69)	131 (67.2)	0.20
G/A	30 (30)	54 (27.7)	
A/A	1 (1)	10 (5.1)	
Allèles, F (%)			
G (sauvage)	168 (84)	316 (81)	0.75
A (mutant)	32 (16)	74 (19)	

*Valeur-p du test exact de Fisher

III.2.3 - Association du polymorphisme *SDF1 +801 G>A* avec l'ethnie et les paramètres immunovirologiques et clinique des patients

Compte tenu du nombre limité du génotype homozygote muté A/A, nous avons regroupé les patients portant le génotype hétérozygote G/A et le patient qui avait le génotype homozygote muté A/A dans un seul groupe : groupe muté porteur de la mutation 3'A. Nous avons effectué une comparaison de l'ethnie des patients sur la base des génotypes *SDF1 +801 G>A*. La

distribution génotypique ne différait pas significativement selon l'origine ethnique ($p > 0,05$) (tableau XX).

Les paramètres immunovirologiques et cliniques des patients séropositifs pour le VIH-1 : charge virale plasmatique, taux des lymphocytes T CD4+ enregistrés au baseline, l'évolution immunovirologique et le stade clinique ont été comparés en fonction des génotypes *SDF1 +801 G>A*. Nous avons constaté une différence statistiquement significative dans l'évolution immunovirologique entre le groupe sauvage *G/G* et le groupe muté (*G/A + A/A*) ($p=0.03$). Par contre, aucune différence significative dans les autres variables en fonction du portage de l'allèle mutant ($p > 0,05$) n'a été observée (tableau XX).

Tableau XX : Comparaison des caractéristiques des patients en fonction des génotypes *SDF1 +801 G>A*

	<i>G/G</i> (n = 69)	(<i>G/A + A/A</i>) (n = 31)	<i>p</i> value
Ethnie, n (%)			
Arabe	46 (66.7)	19 (61.3)	0.87*
Berbère	19 (27.5)	10 (32.3)	
Arabo-Berbère	4 (5.8)	2 (6.4)	
Stade clinique (CDC), n (%)			
A	48 (69.6)	20 (64.5)	0.08*
B	12 (17.4)	10 (32.3)	
C	9 (13)	1 (3.2)	
Charge virale (copies/mL) au baseline, médiane [IQR]	67193.5 [13034 ; 239883]	41541 [12675.75 ; 154621]	0.30**
Taux de CD4+ (cellules/mm³) au baseline, médiane [IQR]	403.5 [271.5 ; 575.25]	386.5 [262.25; 483]	0.49**
Evolution immunovirologique, n (%)			
Bonne	20 (35.7)	17 (60.7)	0.03*
Mauvaise	36 (64.3)	11 (39.3)	
Manquant	13	3	

* Valeur-p du test *Khi-deux*

** Valeur-p du test de *Mann-Whitney*

III.2.4 - Association entre le SNP *SDF1 +801 G>A* et l'évolution immuno-virologique

L'analyse des modèles d'association du SNP *SDF1 +801 G>A* avec l'évolution immunovirologique effectué par l'outil Web SNPStats, a montré que le meilleur modèle d'association correspondant à nos données est le modèle dominant. Selon ce modèle d'association, nous avons regroupé les patients portant le génotype hétérozygote *G/A* et le génotype homozygote muté *A/A* en un seul groupe « porteurs de l'allèle *SDF1 +801A* ». Les patients ont été donc stratifiés en deux groupes : ceux portant le génotype sauvage *G/G* et ceux présentant les génotypes mutés *G/A* ou *A/A*.

Afin d'identifier les facteurs associés à l'évolution immunovirologique, nous avons effectué une régression logistique univariée et multivariée (tableau XXI). L'analyse univariée a montré que le portage de l'allèle *SDF1 +801A* en mode dominant (*G/A + A/A* vs. *G/G* : $p = 0.03$; OR : 2.782 ; IC 95 % [1.092-7.085]) et le sexe féminin ($p = 0.03$; OR : 2.967; IC 95 % [1.081-8.147]) étaient significativement associés à une bonne évolution immunovirologique chez nos patients traités : être de sexe féminin et porteur de l'allèle *SDF1 +801A* augmentent la probabilité d'avoir de bons résultats immunovirologiques. Alors que l'âge, lors du diagnostic, a montré une tendance à être négativement associé à l'évolution immunovirologique ($p = 0.07$; OR : 0.265; IC 95 % [0.062-1.125]).

Nous avons également testé l'association entre le portage de deux allèles mutés *CCR2 +190A* et *SDF1 +801A* et l'évolution immunovirologique chez 68 patients qui ont été testés pour les deux polymorphismes. On a observé que les patients porteurs des deux allèles mutés ont plus de probabilité d'avoir une bonne évolution immunovirologique ($p = 0.03$; OR : 6.562; IC 95 % [1.095-39.324]).

Dans l'analyse multivariée, l'âge a été significativement et indépendamment associé à l'évolution immunovirologique : la probabilité d'avoir une bonne évolution immunovirologique diminue chez les patients âgés de 36 à 45 ans ($p = 0.03$; OR : 0.176; IC 95 % [0.037-0.846]).

L'allèle *SDF1 +801A* en mode dominant ($p = 0.01$; OR : 3.606; IC 95 % [1.271-10.229]), le portage des allèles *SDF1 +801A* et *CCR2 +190A* ($p = 0.02$; OR : 10.260 ; IC 95 % [1.370-76.463]), ainsi que le sexe féminin ($p = 0.02$; OR : 3.580; IC 95 % [1.215-10.549]) restaient

significativement et indépendamment associés à une bonne évolution immunovirologique dans le modèle multivarié.

Tableau XXI : Analyses univariée et multivariée des facteurs associés à l'évolution immunovirologique chez les patients après un an de TAR

	Fréquences*		UNIVARIEE			MULTIVARIEE		
	Bonne EIV	Mauvaise EIV	OR	IC 95%	p-value	OR	IC 95%	p-value
Sexe, n (%) Hommes (n=74) Femmes (n= 26)	23 (62.2) 14 (37.8)	39 (83) 8 (17)	Reference 2.967	- 1.081-8.147	- 0.03	- 3.580	- 1.215-10.549	- 0.02
Age (années), moyenne ± SD	36.7 ± 8.38	34.8 ± 7.13	1.031	0.974-1.092	0.28			
Groupe d'âge, n (%) 18-35 36-45 46-60	20 (54.1) 9 (24.3) 8 (21.6)	26 (55.3) 17 (36.2) 4 (8.5)	0.385 0.265 Reference	0.101-1.461 0.062-1.125 -	0.16 0.07 -	0.325 0.176 -	0.079-1.340 0.037-0.846 -	0.12 0.03 -
Origine ethnique, n (%) Arabe (n= 65) Berbère (n= 29) Arabo-Berbère (n=6)	24 (64.9) 10 (27) 3 (8.1)	30 (63.8) 14 (29.8) 3 (6.4)	0.800 0.714 Reference	0.148-4.327 0.119-4.297 -	0.79 0.71 -			
Stade clinique (CDC), n (%) A (n=69) B (n=21) C (n=10)	22 (59.5) 11 (29.7) 4 (10.8)	33 (70.2) 9 (19.1) 5 (10.6)	0.833 1.528 Reference	0.201-3.452 0.314-7.437 -	0.8 0.6 -			
Intervalles charge virale (copies/mL) au baseline, n (%) < 10000 10000-49999 ≥ 50000	8 (21.6) 10 (27) 19 (51.4)	11 (23.4) 12 (25.5) 24 (51.1)	0.919 1.053 Reference	0.308-2.737 0.375-2.957 -	0.87 0.92 -			
Intervalles taux CD4+ (cellules/mm3) au baseline, n (%) < 200 200-499 ≥ 500	9 (24.3) 19 (51.4) 9 (24.3)	10 (21.3) 19 (40.4) 18 (38.3)	Reference 1.111 0.556	- 0.369-3.346 0.167-1.853	- 0.85 0.33			
Génotypes SDF1, (n/%) G/G (n=69) (G/A +A/A) (n=31)	20 (54.1) 17 (45.9)	36 (76.6) 11 (23.4)	Reference 2.782	- 1.092-7.085	- 0.03	- 3.606	- 1.271-10.229	- 0.01
Génotypes SDF1 +801 G>A & CCR2 +190 G>A, (n/%) ** +801 (G/G) et +190 (G/G) (n=29) +801 (G/A+A/A) et (G/G) (n=12) +801 (G/G) et +190 (G/A+A/A) (n=17) +801 (G/A+A/A) et +190 (G/A+A/A) (n=10)	8 (33.3) 6 (25.0) 3 (12.5) 7 (29.2)	15 (46.8) 5 (15.6) 10 (31.3) 2 (6.3)	Reference 2.250 0.563 6.562	- 0.520-9.732 0.119-2.469 1.095-39.324	- 0.27 0.46 0.03	- 3.931 0.846 10.260	- 0.739-20.906 0.161-4.442 1.370-76.463	- 0.1 0.84 0.02

* 16 données manquantes

** 12 données manquantes pour les 68 patients étudiés

EIV : Evolution Immunovirologique après un an de traitement antirétroviral

Les valeurs en gras sont les valeurs statistiquement significatives (p < 0,05)

III.3 - Discussion

Le rôle du polymorphisme génétique *SDF1 +801 G>A* (rs1801157) dans la prédisposition à l'infection par le VIH-1 ainsi que la progression de la maladie a été décrit dans plusieurs rapports. Cependant, son influence chez les patients suivant une thérapie HAART reste peu claire. Dans la présente étude, nous avons étudié la fréquence du polymorphisme *SDF1 +801 G>A* chez des individus infectés et non infectés par le VIH-1, ainsi que son influence sur la susceptibilité à l'infection par le VIH-1. Par ailleurs, nous avons évalué son association avec la restauration immunologique et le contrôle virologique chez des patients marocains traités.

La distribution du *SDF1 +801 G>A* dans la population mondiale varie considérablement, et la fréquence la plus élevée a été observée dans les populations océaniques. La distribution de l'allèle *SDF1 +801A* obtenue dans notre étude était de 0,16 chez les patients séropositifs pour le VIH-1, contre 0,19 chez les sujets sains séronégatifs pour le VIH-1. La fréquence allélique observée chez les sujets sains était proche des données rapportées chez d'autres populations saines en Hongrie (0.115) [869], l'Inde du Nord (0.204) [871], Russie (0.21) [898], Ukraine (0.20) [898], Brésil (0.18) [899, 900], et relativement plus élevée que celles observées dans le Gabon (0.02) [901], chez les Baïga (0.080) [849] et les Gonds (0.100) [849] en Inde centrale.

En revanche, des fréquences plus élevées ont été rapportées par des études menées en Corée du Sud (0.26) [902], Belgique (0.238) [874], Tunisie (0.428) [903], Koweït (0.259) [904], Jordanie (0.342) [846], Grèce (0.297) [905], Chine (0.573) [906], Bahreïn (0.265) [907], Turquie (0.270) [908], Pologne (0.258) [909], et en Espagne (0.265) [910].

Nos résultats confirment la distribution globale du polymorphisme *SDF1 +801 G>A* rapportée par les études antérieures, allant généralement de 0,029 dans les populations africaines à 0,714 dans les populations océaniques [16]. La fréquence allélique de 0,19 obtenue chez le groupe témoin montre que l'allèle *SDF1 +801A* est plus élevée chez la population marocaine par rapport aux autres pays africains. Cela peut s'expliquer par la structure ethnique hétérogène de la population marocaine.

L'analyse de la distribution génotypique chez les sujets séronégatifs (témoins) et séropositifs pour le VIH-1 (cas) n'a pas montré une déviation significative par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$), ce qui signifie l'absence d'une sélection détectable contre un génotype particulier.

La fréquence allélique du polymorphisme *SDF1 +801 G>A* observée chez le groupe des cas était légèrement plus faible que celle du groupe témoin. Cependant, cette différence n'était pas statistiquement significative ($p > 0,05$).

On suggère alors que l'allèle *SDF1 +801A*, n'a probablement pas d'effet marquant sur la susceptibilité des marocains à l'infection par le VIH-1. Ce résultat est cohérent avec des rapports antérieurs qui ont montré une absence de différence significative dans la distribution de cet allèle entre les individus séronégatifs et les patients infectés par le VIH-1, suggérant ainsi que cet allèle n'a pas d'effet sur la susceptibilité au VIH-1 [874, 911-913]. De même, une méta-analyse de 13 études incluant 2421 cas infectés et 3283 témoins (1399 personnes exposées au VIH-1 mais non infectées et 1884 témoins sains), a suggéré que l'allèle *SDF1 +801A* n'influence significativement pas la susceptibilité au VIH-1 [914].

Une autre méta-analyse récente menée par Ding et al. incluant 16 études avec 2803 patients infectés par le VIH et 3697 individus sains, a rapporté la même conclusion [750].

L'allèle *SDF1 +801A* ne pourrait pas expliquer, à lui seul, la susceptibilité ou la résistance naturelle à l'infection par le VIH-1 chez certains individus, probablement parce que les souches R5 sont celles qui transmettent généralement l'infection, même lorsque les souches X4 prédominent dans l'inoculum viral et que le SDF1 produit par la muqueuse module continuellement à la baisse le CXCR4 sur les cellules cibles résidentes [357]. Néanmoins, certaines études ont révélé une association significative entre le polymorphisme *SDF1 +801 G>A* et la susceptibilité ou la transmission du VIH-1 [740, 741, 915].

L'impact de l'allèle *SDF1 +801A* était plus prononcé au niveau de la progression de la maladie que sur la susceptibilité à l'infection. Toutefois, une controverse existe dans la littérature concernant l'association entre le SNP *SDF1 +801 G>A* et la progression de la maladie vers le SIDA. Dans notre étude, nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative dans les médianes de la charge virale plasmatique et du taux des lymphocytes T CD4+ enregistrées au baseline en fonction du portage de l'allèle mutant *SDF1 +801A* ($p > 0,05$). Par contre, nous avons constaté une tendance vers un effet protecteur contre la progression vers le stade SIDA (catégorie C) chez les patients porteurs de l'allèle muté par rapport au type sauvage (3,2 % des patients portant l'allèle *SDF1 +801A* sont au stade SIDA contre 13% parmi les patients porteurs de l'allèle sauvage *SDF1 +801G*), mais le résultat n'était pas statistiquement significatif ($p = 0,08$). Cette différence non significative est probablement en raison de la taille

limitée de l'échantillon de notre étude. En outre, l'évolution immunovirologique après un an de traitement a différé significativement entre le groupe sauvage (*G/G*) et le groupe muté (*G/A + A/A*) ($p=0.03$). On suggère alors que l'allèle *SDF1 +801A* pourrait être associé à la progression de la maladie en influençant la restauration immunitaire et le contrôle virologique chez les patients sous TAR.

Par ailleurs, l'analyse multivariée des facteurs associés à l'évolution immunovirologique a révélé que le portage de l'allèle *SDF1 +801A* était significativement associé avec une bonne évolution immunovirologique après un an de traitement antirétroviral ($p=0.03$). Nous suggérons donc que cette mutation, seule et indépendamment des autres facteurs prédictifs connus, a probablement un effet protecteur direct sur les niveaux de charge virale et la restauration du nombre des cellules T CD4+ dans notre population, et par conséquent, les patients porteurs de cette mutation peuvent montrer un niveau remarquable de protection ou retardement de la progression vers le stade SIDA.

En accord avec nos résultats, Passam et al. ont rapporté que l'allèle *SDF1 +801A* continue d'avoir une influence positive sur la progression clinique après l'initiation du HAART par une restauration plus rapide des T CD4+ et une tendance à une diminution plus rapide de la charge virale VIH-1 [9]. Cependant, certaines études ont rapporté qu'il y avait une association négative entre *SDF1 +801A* et la réponse au traitement expliquée par une suppression virale plus faible et une progression accélérée vers le SIDA [916, 917] ou bien une faible restauration des cellules T CD4+ chez les patients sous traitement antirétroviral [882, 918].

Par ailleurs, une absence d'influence du polymorphisme *SDF1 +801 G>A* sur le taux des cellules T CD4+ ou le taux d'ARN-VIH-1 plasmatique a été également démontrée [897, 919, 920].

Dans le même ordre d'idées, notre conclusion est cohérente avec celles d'autres études qui ont suggéré que la présence de la mutation *+801 G>A* du *SDF1* est potentiellement impliquée dans la protection contre la progression vers le stade avancé de la maladie [911]. Winkler et al. ont démontré dans une étude d'association génétique portant sur 2857 patients inscrits dans cinq études de cohorte sur le SIDA, que l'effet protecteur de l'allèle *SDF1 +801A* contre le VIH-1 serait deux fois plus efficace que les effets conférés par les variants alléliques des gènes *CCR5* et *CCR2*, mais il diminuerait avec la durée de l'infection [737]. En outre, les résultats d'une méta-analyse récente ont suggéré que les génotypes *G/A+A/A*, *A/A* et *G/A* de la variation *+801*

G>A du *SDF1* semble être associés à un ralentissement de l'évolution de la maladie, et par conséquent, les personnes infectées présentant ces génotypes sont plus protégées contre l'évolution rapide vers le stade SIDA que les patients présentant le génotype sauvage *G/G* [921].

Par ailleurs, il a été rapporté que le nombre de décès au cours de la période de suivi des patients symptomatiques homozygotes et hétérozygotes pour l'allèle *SDF1 +801A* était plus faible, suggérant que les deux génotypes pourraient avoir un effet protecteur tardif sur l'évolution clinique des patients atteints du VIH-1 après le diagnostic du SIDA [744, 920].

A l'opposé de nos résultats, certaines études ont constaté que l'allèle *SDF1 +801A* n'influence pas la progression de l'infection. Par exemple, l'étude de Vidal et al. a révélé que le polymorphisme *SDF1 +801 G>A* ne joue aucun rôle chez les patients LTNP au-delà de 16 ans [910]. Koizumi et al. ont également suggéré qu'il n'y avait pas de différence significative dans la distribution du polymorphisme *SDF1 +801 G>A* entre les personnes à progression lente et les personnes à progression rapide [922]. Une méta-analyse, qui a évalué l'effet de l'allèle *SDF1 +801A* sur le SIDA, la survie et l'ARN du VIH-1, a également suggéré l'absence d'une relation entre eux [857]. En outre, Bogner et al. n'ont pas démontré une association positive claire entre ce polymorphisme et la réponse au traitement [923].

D'autres études ont par contre, démontré que l'homozygotie pour l'allèle *SDF1 +801 G>A* est associée à une diminution plus rapide des cellules T CD4+ et à une progression rapide vers le SIDA [924, 925]. Par ailleurs, Mummidi et al. ont rapporté qu'une population homozygote pour l'allèle *SDF1 +801A* peuvent évoluer rapidement vers la mort, tandis que les personnes portant les génotypes sauvage ou hétérozygote pour cet allèle progressent plus lentement vers le SIDA [678].

L'effet protecteur observé dans notre étude peut être expliqué par le fait que le SDF1, connu comme le ligand naturel unique du CXCR4, représente une barrière à la liaison du VIH-1 à son corécepteur CXCR4, inhibant ainsi l'entrée des souches X4 qui sont associées à l'accélération de la progression vers le stade SIDA surtout à cause du déclin rapide du taux des T CD4+. À cet égard, le polymorphisme du *SDF1* pourraient influencer de manière significative l'évolution et la progression de l'infection. Au niveau moléculaire, de nombreuses études ont suggéré que le polymorphisme *SDF1 +801 G>A*, situé dans un segment de la séquence 3'UTR qui est impliqué dans l'abondance, la synthèse, le transport, la stabilité de la transcription ou

l'abondance du produit d'épissage [926], peut réguler à la hausse le taux plasmatique de la protéine SDF1, en augmentant les niveaux d'ARNm de cette dernière et que les patients portant les génotypes *G/A* et *A/A* peuvent présenter des taux accrus de la protéine SDF1. La surproduction de cette protéine pourrait donc prévenir et inhiber l'apparition des souches R5X4 plus pathogènes, contribuant ainsi à retarder la progression du VIH-1 [927, 928] [4, 928]. Par ailleurs, une analyse transversale préliminaire du taux de SDF1 chez des patients infectés par le VIH-1 présentant un large éventail de numérations absolues des lymphocytes T CD4+, ainsi que chez des sujets immunocompétents non infectés par le VIH-1, a révélé que les taux de SDF1 chez les sujets infectés par le VIH-1, ont été directement corrélés au nombre des cellules T CD4+, l'indicateur primordial de la progression de la maladie [929].

On pense également que puisque la présence de l'allèle *SDF1 +801A* peut augmenter la production de la protéine, ce polymorphisme par conséquent, pourrait induire une chimio-attraction plus élevée des cellules T CD4+ avec une activation et une prolifération subséquentes, conduisant à l'augmentation du taux de ces cellules dans le sang périphérique [930]. En fait, les études qui ont examiné la relation entre le taux de la protéine SDF1 circulante, le polymorphisme *SDF1 +801 G>A* et la progression de la maladie ont obtenu des résultats contrastés. Peterson et al. ont démontré qu'il n'y a pas d'association significative entre les taux plasmatiques spécifiques du SDF1 et la distribution des génotypes *SDF1 +801 G>A* chez les patients séropositifs pour le VIH-1 et les témoins sains [740].

Une autre étude a paradoxalement, révélé que l'homozygotie pour l'allèle *SDF1 +801A*, est associée à des faibles taux plasmatiques de SDF1, avec une absence d'effet retardateur sur la progression de la maladie [931]. Cependant, Ikegawa et al. ont observé que les niveaux plasmatiques de la protéine SDF1 sont négativement corrélés avec le nombre de lymphocytes T CD4+ et positivement corrélés avec la charge d'ARN du VIH-1 dans le plasma [932]. Il a été également signalé que le taux plasmatique de SDF1 peut être affecté par des facteurs épigénétiques tels que la réplication virale du VIH-1 [932]. De plus, d'autres polymorphismes en déséquilibre de liaison avec le SNP *SDF1 +801 G>A*, plutôt que le SNP lui-même, sont responsables de la modification des niveaux de transcription du SDF1. Les résultats incohérents pour le SNP *SDF1 +801 G>A* parmi diverses populations peuvent donc être attribués à différentes structures d'haplotypes, incluant ou excluant des variantes fonctionnelles, pour des groupes ethniques spécifiques [933].

Pour notre population, il est donc extrêmement important de mesurer, dans le futur, le taux plasmatique de SDF1 pour comprendre le mécanisme par lequel l'allèle *SDF1 +801A* joue un rôle protecteur important dans la l'évolution immunovirologique et la progression de la maladie.

Dans le présent travail, nous avons également observé que le portage de deux allèles mutés *CCR2 +190A* et *SDF1 +801A* est un facteur prédictif d'une bonne évolution immunovirologique ($p=0.02$). Nous suggérons donc qu'il existe probablement un effet protecteur cumulatif de ces deux polymorphismes dans notre population. Ceci est cohérent avec le résultat de Vieira et al. qui ont démontré que les sujets sous TAR porteurs de ces deux polymorphismes présentaient une réduction de 53 % du risque de progression vers le stade SIDA [934]. Cette protection était supérieure à celle observée chez les sujets porteurs d'un de ces allèles [934].

D'autres études génétiques ont également révélé que la protection conférée par *CCR2* et *SDF1* est additive dans les cohortes de SIDA, car les patients ayant à la fois des génotypes protecteurs *SDF1 +801A* et *CCR2 +190A* évitent le SIDA plus longtemps que les patients n'ayant qu'une protection monogénique [928]. La bonne évolution immunovirologique observée chez nos patients porteurs de ces deux mutations prouve le rôle de ces derniers, et donc du bagage génétique de la population, sur la progression de la maladie. Nous avons remarqué également que l'utilisation d'une thérapie ARV n'a pas masqué l'effet protecteur du polymorphisme *SDF1 +801 G>A* observé dans notre population.

En plus des facteurs génétiques de l'hôte, l'évolution immunovirologique ainsi que la progression de la maladie chez les patients sous TAR semblent également être influencées par des facteurs démographiques tels que l'âge et le sexe. Dans notre étude, le sexe féminin et l'âge ont été significativement et indépendamment associés à l'évolution immunovirologique dans le modèle multivarié. Certaines études ont trouvé des preuves d'une vitesse plus lente ou d'une magnitude plus faible de restauration des cellules T CD4+, et ainsi de mauvais résultats cliniques chez les adultes âgés infectés par le VIH-1 par rapport aux jeunes patients sous HAART [935-946]. Il a été également rapporté qu'un âge plus élevé peut être indépendamment lié à une faible probabilité de restauration immunitaire [947]. Ceci concorde avec les données rapportées dans notre étude.

En outre, l'analyse multivariée d'une étude menée par Egger et al. a révélé que l'âge est un facteur prédictif du SIDA et du décès [948]. Raffi et al. ont également observé que l'échec de la restauration des T CD4+ a été associé à un âge ≥ 40 ans [949]. En addition, l'étude de Aldrete et al. a révélé que l'âge (> 37 ans) au début du traitement antirétroviral avait un effet significatif sur la restauration des cellules T CD4+ [950]. Cependant, certaines études n'ont révélé aucune différence liée à l'âge dans la restauration des cellules T CD4+ [951-954], ou la réponse virologique [955] après le début du traitement antirétroviral. Une autre étude, par contre, a rapporté une association positive entre l'âge avancé et la restauration accrue des cellules T CD4+ ainsi que la réponse virologique. Mais ce résultat n'était pas statistiquement significatif [956].

L'âge influence l'évolution de l'infection par le VIH-1 car le nombre moyen de lymphocytes T CD4+ diminue avec l'âge et le délai entre l'infection et le développement du SIDA est plus court [957-959]. Même à l'ère de la multithérapie, le délai entre l'infection par le VIH-1 et le SIDA ou le décès est plus court chez les patients âgés [960]. Il a été démontré que l'augmentation plus lente du taux des cellules T CD4+ chez les individus plus âgés, surtout après un an de traitement antirétroviral, est en grande partie le résultat d'une diminution de la fonction thymique impliquée dans la restauration des T CD4+. Par conséquent, les personnes âgées sont plus susceptibles d'avoir une faible réserve thymique et donc une faible probabilité de restauration des T CD4+ à long terme [961, 962], comme cela a été déterminé dans notre étude.

Concernant le sexe, nos résultats sont cohérents avec plusieurs autres études qui ont indiqué que les patients de sexe féminin ont une meilleure et rapide restauration immunitaire par rapport aux hommes [963-965]. Cela peut s'expliquer par l'effet régulateur du nombre des cellules T CD4+. À cet égard, il a été démontré que les femmes ont un taux de T CD4+ comparativement plus élevé que les hommes, car il est régulé par les œstrogènes [966], et avec l'utilisation d'une multithérapie suppressive, cette régulation homéostatique normale du nombre de cellules T CD4+ peut donc conduire à un gain plus élevé de ces cellules chez les femmes que chez les hommes [965]. Par ailleurs, d'autres études ont observé que le sexe masculin a été fortement associé à une mauvaise restauration immunitaire. À titre d'exemple, Gunda et al. ont démontré que les patients masculins sont 1,52 fois plus susceptibles d'avoir une mauvaise restauration immunitaire que les femmes [942].

Nos résultats suggèrent que l'âge et le sexe peuvent être des déterminants importants de l'état de santé des adultes infectés par le VIH-1. Par conséquent, il s'avère nécessaire d'adapter les approches thérapeutiques en fonction de ces facteurs.

En ce qui concerne les résultats discordants entre notre étude et les études précédentes qui n'ont rapporté aucune association entre les résultats immunovirologiques ou la progression de la maladie et la variation du gène *SDF1*, des différences dans la taille des cohortes, la durée du suivi, la conception de l'étude, le nombre des T CD4+ avant l'initiation du traitement antirétroviral et l'origine ethnique, entre autres, peuvent être impliqués dans cette discordance. Une limite éventuelle de notre étude est la rareté des individus présentant le génotype homozygote pour l'allèle *SDF1 +801A* qui peut donner plus d'explication sur l'effet de cette mutation sur l'infection par le VIH-1.

Une autre limite, consistait à ne pas quantifier et à ne pas évaluer le taux plasmatique de la protéine SDF1 et son association d'une part avec les génotypes *SDF1 +801 G>A* et d'autre part avec le taux d'ARN-VIH1 plasmatique et le nombre des cellules T CD4+ comme indicateurs de progression.

Malgré ces réserves, ce travail apporte de nouvelles informations concernant l'impact des facteurs de l'hôte liés aux ligands des corécepteurs du VIH-1 sur l'infection par le VIH-1 et la progression de la maladie chez la population marocaine.

III.4 - Conclusion

Les résultats de ce travail confirment les conclusions de plusieurs études antérieures sur l'association entre le polymorphisme génétique *SDF1 +801 G>A* et la résistance à l'infection par le VIH-1. En sus, nos résultats suggèrent que ce polymorphisme, seul ou en association avec le polymorphisme *CCR2 +190 G>A*, pourrait être un indicateur pronostique puissant de la progression de la maladie chez les patients infectés sous thérapie ARV au Maroc. Le rôle précis de l'allèle *SDF1 +801A* par rapport à l'évolution immunovirologique et au traitement est donc d'un grand intérêt et mérite d'être étudié davantage ultérieurement.

III.5 - Publication

Un article présentant les résultats de ce travail est en cours de soumission :

FARISSI FZ, El Annaz H, El Alaoui MA, Abi R, Boui M, El Fahime EM, Mrani S. Better immunovirological outcomes in moroccan HIV-1 infected patients under HAART due to carriage of *SDF1* +801 G>A (rs1801157) genetic polymorphism.



CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

A ce jour, des progrès considérables ont été réalisés dans l'identification des variations alléliques associées à la susceptibilité au VIH-1 et à la progression ou l'évolution de l'infection. De nombreuses preuves suggèrent qu'il existe une association entre les facteurs génétiques de l'hôte, notamment les polymorphismes *CCR5-Δ32* (rs333), *CCR2 +190 G>A* (Val64Ile, rs1799864), *SDF1 +801 G>A* (rs1801157), et la résistance naturelle à l'infection par le VIH-1. Cependant, les conclusions rapportées sont controversées.

Dans le but de compléter et confirmer les résultats de études antérieures et afin de mieux comprendre la relation entre les facteurs génétiques de l'hôte et l'infection par le VIH-1 au Maroc, nous avons examiné ici les polymorphismes des gènes *CCR5*, *CCR2*, *SDF1* liés au contrôle de l'infection par le VIH-1.

Dans un premier temps, nous avons analysé la prévalence du polymorphisme *CCR5-Δ32* et son association avec la susceptibilité à l'infection par le VIH-1 et la progression de la maladie. Les résultats obtenus ont montré que l'allèle *CCR5-Δ32* n'est pas fréquent dans notre population et que l'hétérozygotie pour cet allèle pourrait ne pas influencer la susceptibilité à l'infection par le VIH-1. Ce résultat confirme les conclusions précédentes de plusieurs études. Par ailleurs, on n'a pas observé un effet protecteur de l'allèle *CCR5-Δ32* contre la progression de la maladie chez les patients marocains. Ce résultat nécessite une confirmation par des études supplémentaires. En fait, la rareté de cet allèle dans notre population rend difficile la révélation de son effet protecteur potentiel contre l'évolution de la maladie. Par conséquent, nous ne pouvons pas garantir, ni rejeter, le rôle du polymorphisme *CCR5-Δ32* comme marqueur génétique de susceptibilité ou de progression de l'infection par le VIH-1, du moins dans la population marocaine.

Dans un second temps, nous avons étudié la prévalence du polymorphisme génétique *CCR2 +190 G>A* (rs1799864) et son impact sur la susceptibilité au VIH-1 et sur l'évolution immunovirologique chez des patients Marocains après un an du traitement antirétroviral. Les résultats que nous avons obtenus démontrent que cet allèle est, par contre, assez fréquent chez les marocains surtout pour le génotype hétérozygote. Néanmoins, cet allèle semble ne pas influencer la résistance à l'infection par le VIH-1. Ceci appuie ce qui a été rapporté lors de précédentes études. Par ailleurs, nous suggérons que l'allèle *CCR2 +190A* ne soit pas un facteur prédictif indépendant du contrôle virologique ou de la restauration immunologique chez les patients marocains sous traitement. Toutefois, vu la rareté du génotype homozygote *A/A* dans notre population, une confirmation par des études ultérieures s'avère nécessaire.

La troisième partie de notre étude a porté sur l'analyse du polymorphisme *SDF1 +801 G>A* et également son association avec la susceptibilité au VIH-1 et l'évolution immunovirologique chez des patients marocains après un an du traitement antirétroviral. Les résultats obtenus montrent que cet allèle est également abondant dans notre population. Comme pour *CCR5-Δ32* et *CCR2 +190A*, l'allèle *SDF1 +801A* n'a pas été un marqueur de susceptibilité à l'infection par le VIH-1. Ceci confirme les conclusions de plusieurs études antérieures. Par ailleurs, nos résultats montrent, que ce polymorphisme pourrait être un facteur pronostique puissant de l'évolution immunovirologique et donc de la progression de la maladie chez les patients infectés sous thérapie ARV au Maroc. Nos résultats suggèrent également un effet protecteur cumulatif des allèles *SDF1 +801A* et *CCR2 +190A*.

Dans l'ensemble, nos travaux permettent d'acquérir de nouvelles connaissances et de donner une vue sur l'influence de la génétique de l'hôte sur l'infection par le VIH-1 dans la population marocaine. De plus, les résultats de notre étude mettent en lumière la possibilité que les marqueurs génétiques (au moins pour le *SDF1 +801A*, seul ou en présence de *CCR2 +190A*) puissent être utiles pour identifier les patients à risque de progresser plus rapidement vers le SIDA, suite à une mauvaise évolution immunovirologique. On peut dire également que l'association entre plusieurs paramètres, tels que la charge virale, le nombre de cellules T CD4+ et les marqueurs génétiques de l'hôte, pourrait (comme pour le gène *SDF1*) augmenter considérablement la possibilité de prédire l'évolution de la maladie. Cela signifie que l'identification du génotype des patients est de plus en plus importante. Toutefois, notre projet a éventuellement certaines limites :

- La rareté des génotypes homozygotes pour les allèles *CCR5-Δ32*, *CCR2 +190A* et *SDF1 +801A* dans notre population ;
- L'absence d'informations sur le tropisme viral chez les patients étudiés ;
- La complexité de l'infection par le VIH-1 et la progression de la maladie qui est due à une combinaison de multiples facteurs.

Pour cela, des études de suivi à long terme d'une large cohorte sont recommandées pour clarifier davantage l'impact de ces polymorphismes sur l'infection par le VIH-1 au Maroc. En fait, notre étude ouvre différentes perspectives. Elle pourrait être suivie par l'analyse d'autres polymorphismes jouant également un rôle important dans la résistance naturelle à l'infection tels que la mutation *CCR5-P59029* de la région promotrice du *CCR5*, et les SNP -28G et -403A

du gène codant pour RANTES qui est un ligand naturel du CCR5. De plus, une étude longitudinale des personnes exposées séronégatives et pouvant être suivies dans le temps sera particulièrement intéressante. Par ailleurs, la quantification et l'étude de l'expression de la chimiokine SDF1 s'avèrent nécessaires pour déterminer le mécanisme de protection conférée par l'allèle *SDF1 +801A*. Il serait également intéressant d'analyser et de déterminer le tropisme viral des patients.

Les expériences menées dans notre étude ainsi que celles proposées ci-dessus, fourniront des informations précieuses sur les mécanismes impliqués dans la résistance à l'infection, l'évolution immunovirologique et ainsi la progression de la maladie, qui pourraient être exploitées pour des nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ainsi, il est très probable que de nouvelles approches de thérapie génique ciblant des chimiokines, notamment la chimiokine SDF1 qui est une excellente nouvelle cible thérapeutique, avec un blocage des points de contrôle immunitaires soient nécessaires pour améliorer la restauration des cellules T CD4+ chez les patients séropositifs à mauvaise évolution immunologique.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. UNAIDS, *UNAIDS DATA*. 2020. Available on https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2020_aids-data-book_en.pdf.
2. Ministère, M.S., *Stratégie Nationale sur les Droits Humains et le VIH/SIDA*. 2018-2021. Available on [https://www.sante.gov.ma/Publications/Guides-Manuels/Documents/2020/Strat%C3%A9gie%20Nationale%20sur%20les%20Droits%20Humains%20et%20le%20VIH_sida%202018-2021%20\(4\)%20final%20\(1\).pdf](https://www.sante.gov.ma/Publications/Guides-Manuels/Documents/2020/Strat%C3%A9gie%20Nationale%20sur%20les%20Droits%20Humains%20et%20le%20VIH_sida%202018-2021%20(4)%20final%20(1).pdf).
3. Kaur, G. and N.J.T.a. Mehra, *Genetic determinants of HIV-1 infection and progression to AIDS: susceptibility to HIV infection*. Tissue Antigens, 2009. **73**(4): p. 289-301.
4. Arenzana-Seisdedos, F. and M. Parmentier, *Genetics of resistance to HIV infection: Role of co-receptors and co-receptor ligands*. Semin Immunol, 2006. **18**(6): p. 387-403.
5. Mulherin, S.A., et al., *Effects of CCR5-Δ32 and CCR2-64I alleles on HIV-1 disease progression: the protection varies with duration of infection*. AIDS, 2003. **17**(3): p. 377-387.
6. Ammaranond, P., et al., *Impact of CCR2 and SDF1 Polymorphisms on Disease Progression in HIV-Infected Subjects in Thailand*. J Clin Lab, 2013. **27**(1): p. 38-44.
7. O'Brien, T.R., et al., *Effect of chemokine receptor gene polymorphisms on the response to potent antiretroviral therapy*. AIDS, 2000. **14**(7): p. 821-826.
8. Van Vaerenbergh, K., et al., *Initiation of HAART in drug-naïve HIV type 1 patients prevents viral breakthrough for a median period of 35.5 months in 60% of the patients*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2002. **18**(6): p. 419-426.
9. Passam, A.M., et al., *CCR2-64I and CXCL12 3' A alleles confer a favorable prognosis to AIDS patients undergoing HAART therapy*. J Clin Virol, 2005. **34**(4): p. 302-309.
10. O'Brien, S.J. and J.P. Moore, *The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS*. Immunol Rev, 2000. **177**(1): p. 99-111.
11. Laurichesse, J., et al., *Improved virological response to highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients carrying the CCR5 Δ32 deletion*. HIV Med, 2007. **8**(4): p. 213-219.
12. Wit, F.W., et al., *CC chemokine receptor 5 Δ32 and CC chemokine receptor 2 64I polymorphisms do not influence the virologic and immunologic response to antiretroviral combination therapy in human immunodeficiency virus type 1-infected patients*. J Infect Dis, 2002. **186**(12): p. 1726-1732.
13. Ioannidis, J.P., et al., *Effects of CCR5-Δ 32, CCR2-64I, and SDF-1 3' A alleles on HIV-1 disease progression: an international meta-analysis of individual-patient data*. Ann Intern Med, 2001. **135**(9): p. 782-795.
14. Martinson, J.J., et al., *Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion*. Nat Genet, 1997. **16**(1): p. 100-103.
15. Martinson, J.J., et al., *Global distribution of the CCR2-64I/CCR5-59653T HIV-1 disease-protective haplotype*. AIDS, 2000. **14**(5): p. 483-489.
16. Su, B., et al., *Distribution of three HIV-1 resistance-conferring polymorphisms (SDF1-3' A, CCR2-64I, and CCR5-Δ32) in global populations*. Eur J Hum Genet, 2000. **8**(12): p. 975-979.
17. Elharti, E., et al., *Frequency of the CCR5delta32 allele in the Moroccan population*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2000. **16**(1): p. 87-89.
18. Gottlieb, M.S., et al., *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency*. New England Journal of Medicine, 1981. **305**(24): p. 1425-1431.
19. Control, C.f.D., *Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States*. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 1982. **31**(37): p. 507.
20. Barré-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-871.
21. Popovic, M., et al., *Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS*. Science, 1984. **224**(4648): p. 497-500.

22. Alizon, M., et al., *Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients*. Cell, 1986. **46**(1): p. 63-74.
23. Gao, F., et al., *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 436-441.
24. Peeters, M., M.-L. Chaix, and E. Delaporte, *Phylogénie des SIV et des VIH-Mieux comprendre l'origine des VIH*. médecine/sciences, 2008. **24**(6-7): p. 621-628.
25. King, A.M., et al., *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Vol. 9. 2011: Elsevier.
26. Sattentau, Q.J., et al., *The human and simian immunodeficiency viruses HIV-1, HIV-2 and SIV interact with similar epitopes on their cellular receptor, the CD4 molecule*. AIDS (London, England), 1988. **2**(2): p. 101-105.
27. Briggs, J.A., et al., *Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores*. The EMBO journal, 2003. **22**(7): p. 1707-1715.
28. Ott, D.E., *Cellular proteins in HIV virions*. Reviews in medical virology, 1997. **7**(3): p. 167-180.
29. Zhu, P., et al., *Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 847-852.
30. Checkley, M.A., B.G. Luttge, and E.O. Freed, *HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation*. Journal of molecular biology, 2011. **410**(4): p. 582-608.
31. Turner, B.G. and M.F. Summers, *Structural biology of HIV*. Journal of molecular biology, 1999. **285**(1): p. 1-32.
32. Sundquist, W.I. and H.-G. Kräusslich, *HIV-1 assembly, budding, and maturation*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2012. **2**(7): p. a006924.
33. Hureau, J., et al., *Traité de virologie médicale 2003*. Edition ESTEM. France.
34. Ratner, L., et al., *Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III*. Nature, 1985. **313**(6000): p. 277-284.
35. Frankel, A.D. and J.A. Young, *HIV-1: fifteen proteins and an RNA*. 1998, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.
36. Krebs, F.C., et al., *Lentiviral LTR-directed expression, sequence variation, and disease pathogenesis*. HIV sequence compendium, 2001: p. 29-70.
37. Coffin, J.M., S.H. Hughes, and H.E. Varmus, *Retroviral Virions and Genomes--Retroviruses*. 1997: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
38. Montagnier, L., *25 years after HIV discovery: prospects for cure and vaccine*. Virology, 2010. **397**(2): p. 248-254.
39. Freed, E.O., *HIV-1 assembly, release and maturation*. Nature Reviews Microbiology, 2015. **13**(8): p. 484-496.
40. Peterlin, B.M. and D. Trono, *Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(2): p. 97-107.
41. Stein, B. and E. Engleman, *Intracellular processing of the gp160 HIV-1 envelope precursor. Endoproteolytic cleavage occurs in a cis or medial compartment of the Golgi complex*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(5): p. 2640-2649.
42. Freed, E., D. Myers, and R. Risser, *Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160*. Journal of virology, 1989. **63**(11): p. 4670-4675.
43. Coffin, J., *Retroviridae and their replication*. Virology, 1990: p. 1437-1500.
44. Laspsia, M.F., A.P. Rice, and M.B. Mathews, *HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation*. Cell, 1989. **59**(2): p. 283-292.
45. Steffy, K. and F. Wong-Staal, *Genetic regulation of human immunodeficiency virus*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1991. **55**(2): p. 193-205.

46. Greene, W., *The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection*. The New England journal of medicine, 1991. **324**(5): p. 308-317.
47. Allan, J., et al., *Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III*. Science, 1985. **228**(4703): p. 1091-1094.
48. Robey, W.G., et al., *Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients*. Science, 1985. **228**(4699): p. 593-595.
49. Prabakaran, P., et al., *Structure and function of the HIV envelope glycoprotein as entry mediator, vaccine immunogen, and target for inhibitors*. Advances in pharmacology, 2007. **55**: p. 33-97.
50. Lu, M., S.C. Blacklow, and P.S. Kim, *A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein*. Nature structural biology, 1995. **2**(12): p. 1075-1082.
51. Wyatt, R., et al., *The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein*. Nature, 1998. **393**(6686): p. 705-711.
52. Farzan, M., et al., *Stabilization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers by disulfide bonds introduced into the gp41 glycoprotein ectodomain*. Journal of virology, 1998. **72**(9): p. 7620-7625.
53. Zhu, P., et al., *Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(26): p. 15812-15817.
54. Brandenberg, O.F., et al., *Different infectivity of HIV-1 strains is linked to number of envelope trimers required for entry*. PLoS pathogens, 2015. **11**(1).
55. Kwong, P.D., et al., *Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody*. Nature, 1998. **393**(6686): p. 648-659.
56. Hartley, O., et al., *V3: HIV's switch-hitter*. AIDS Research Human Retroviruses 2005. **21**(2): p. 171-189.
57. Hwang, S.S., et al., *Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1*. Science, 1991. **253**(5015): p. 71-74.
58. Sullivan, N., et al., *Determinants of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein activation by soluble CD4 and monoclonal antibodies*. J Virol, 1998. **72**(8): p. 6332-6338.
59. Javaherian, K., et al., *Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1*. Science, 1990. **250**(4987): p. 1590-1593.
60. Gao, F., et al., *Antigenicity and immunogenicity of a synthetic human immunodeficiency virus type 1 group m consensus envelope glycoprotein*. J Virol, 2005. **79**(2): p. 1154-1163.
61. LaRosa, G.J., et al., *Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant*. Science, 1990. **249**(4971): p. 932-935.
62. LaRosa, G.J., et al., *Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant: further clarifications*. Science, 1991. **253**(5024): p. 1146-1147.
63. Freed, E.O., D.J. Myers, and R. Risser, *Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990. **87**(12): p. 4650-4654.
64. Freed, E.O., et al., *A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(1): p. 70-74.
65. Garg, H., et al., *Targeting HIV-1 gp41-induced fusion and pathogenesis for anti-viral therapy*. Current topics in medicinal chemistry, 2011. **11**(24): p. 2947-2958.
66. Weissenhorn, W., et al., *Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41*. Nature, 1997. **387**(6631): p. 426-430.
67. Chan, D.C., et al., *Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein*. Cell, 1997. **89**(2): p. 263-273.

68. Shang, L., L. Yue, and E. Hunter, *Role of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in cell-cell fusion and virus infection*. Journal of virology, 2008. **82**(11): p. 5417-5428.
69. Yue, L., L. Shang, and E. Hunter, *Truncation of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein defines elements required for fusion, incorporation, and infectivity*. Journal of virology, 2009. **83**(22): p. 11588-11598.
70. VENABLE, R.M., et al., *Theoretically determined three-dimensional structures for amphipathic segments of the HIV-1 gp41 envelope protein*. AIDS research and human retroviruses, 1989. **5**(1): p. 7-22.
71. Eisenberg, D. and M. Wesson, *The most highly amphiphilic α -helices include two amino acid segments in human immunodeficiency virus glycoprotein 41*. Biopolymers: Original Research on Biomolecules, 1990. **29**(1): p. 171-177.
72. Kalia, V., et al., *Rational site-directed mutations of the LLP-1 and LLP-2 lentivirus lytic peptide domains in the intracytoplasmic tail of human immunodeficiency virus type 1 gp41 indicate common functions in cell-cell fusion but distinct roles in virion envelope incorporation*. Journal of virology, 2003. **77**(6): p. 3634-3646.
73. Lee, S.-F., et al., *Effect of point mutations in the N terminus of the lentivirus lytic peptide-1 sequence of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41 on Env stability*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(18): p. 15363-15375.
74. Lee, S.-F., et al., *Multimerization potential of the cytoplasmic domain of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(21): p. 15809-15819.
75. Bültmann, A., et al., *Identification of two sequences in the cytoplasmic tail of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that inhibit cell surface expression*. Journal of virology, 2001. **75**(11): p. 5263-5276.
76. Piller, S.C., et al., *Mutational analysis of conserved domains within the cytoplasmic tail of gp41 from human immunodeficiency virus type 1: effects on glycoprotein incorporation and infectivity*. Journal of virology, 2000. **74**(24): p. 11717-11723.
77. Tran, E.E., et al., *Structural mechanism of trimeric HIV-1 envelope glycoprotein activation*. PLoS pathogens, 2012. **8**(7).
78. Li, G. and E. De Clercq, *HIV genome-wide protein associations: a review of 30 years of research*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2016. **80**(3): p. 679-731.
79. Blumenthal, R., S. Durell, and M. Viard, *HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(49): p. 40841-40849.
80. Nermut, M.V., et al., *Fullerene-like organization of HIV gag-protein shell in virus-like particles produced by recombinant baculovirus*. Virology, 1994. **198**(1): p. 288-296.
81. Massiah, M.A., et al., *Comparison of the NMR and X-ray structures of the HIV-1 matrix protein: Evidence for conformational changes during viral assembly*. Protein science, 1996. **5**(12): p. 2391-2398.
82. Freed, E.O., G. Englund, and M.A. Martin, *Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection*. Journal of virology, 1995. **69**(6): p. 3949-3954.
83. Fiorentini, S., et al., *Functions of the HIV-1 matrix protein p17*. Microbiologica-Quarterly Journal of Microbiological Sciences, 2006. **29**(1): p. 1-10.
84. Hill, C.P., et al., *Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(7): p. 3099-3104.
85. Chen, B., *HIV capsid assembly, mechanism, and structure*. Biochemistry, 2016. **55**(18): p. 2539-2552.

86. Pornillos, O., B.K. Ganser-Pornillos, and M. Yeager, *Atomic-level modelling of the HIV capsid*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 424-427.
87. Henderson, L.E., et al., *Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences*. Journal of Virology, 1992. **66**(4): p. 1856-1865.
88. Summers, M.F., et al., *Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1*. Protein Science, 1992. **1**(5): p. 563-574.
89. Darlix, J.-L., et al., *First glimpses at structure-function relationships of the nucleocapsid protein of retroviruses*. Journal of molecular biology, 1995. **254**(4): p. 523-537.
90. Levin, J.G., et al., *Nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein: Critical role in reverse transcription and molecular mechanism*. Progress in nucleic acid research and molecular biology, 2005. **80**: p. 217-286.
91. Levin, J.G., et al., *Role of HIV-1 nucleocapsid protein in HIV-1 reverse transcription*. RNA biology, 2010. **7**(6): p. 754-774.
92. Göttlinger, H.G., et al., *Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(8): p. 3195-3199.
93. Garrus, J.E., et al., *Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding*. Cell, 2001. **107**(1): p. 55-65.
94. Strack, B., et al., *AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding*. Cell, 2003. **114**(6): p. 689-699.
95. Fossen, T., et al., *Solution structure of the human immunodeficiency virus type 1 p6 protein*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(52): p. 42515-42527.
96. Kondo, E. and H. Göttlinger, *A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6gag required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr*. Journal of virology, 1996. **70**(1): p. 159-164.
97. Garnier, L., et al., *Particle size determinants in the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein*. Journal of virology, 1998. **72**(6): p. 4667-4677.
98. Pearl, L.H. and W.R. Taylor, *A structural model for the retroviral proteases*. Nature, 1987. **329**(6137): p. 351-354.
99. Navia, M.A., et al., *Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1*. Nature, 1989. **337**(6208): p. 615-620.
100. Mager, P.P., *The active site of HIV-1 protease*. Medicinal research reviews, 2001. **21**(4): p. 348-353.
101. Trylska, J., et al., *HIV-1 protease substrate binding and product release pathways explored with coarse-grained molecular dynamics*. Biophysical journal, 2007. **92**(12): p. 4179-4187.
102. Gulnik, S., J.W. Erickson, and D. Xie, *HIV protease: enzyme function and drug resistance*. 2000.
103. Venkatakrishnan, B., et al., *Mining the protein data bank to differentiate error from structural variation in clustered static structures: an examination of HIV protease*. Viruses, 2012. **4**(3): p. 348-362.
104. Sarafianos, S.G., et al., *Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition*. Journal of molecular biology, 2009. **385**(3): p. 693-713.
105. di Marzo Veronese, F., et al., *Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV*. Science, 1986. **231**(4743): p. 1289-1291.
106. Lightfoote, M.M., et al., *Structural characterization of reverse transcriptase and endonuclease polypeptides of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus*. Journal of virology, 1986. **60**(2): p. 771-775.

107. Hostomsky, Z., et al., *Reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1: functionality of subunits of the heterodimer in DNA synthesis*. Journal of virology, 1992. **66**(5): p. 3179-3182.
108. Sarafianos, S.G., et al., *Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA: DNA*. The EMBO journal, 2001. **20**(6): p. 1449-1461.
109. Esposito, D. and R. Craigie, *HIV integrase structure and function*, in *Advances in virus research*. 1999, Elsevier. p. 319-333.
110. Zheng, R., T.M. Jenkins, and R. Craigie, *Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(24): p. 13659-13664.
111. Chen, J.C.-H., et al., *Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: a model for viral DNA binding*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(15): p. 8233-8238.
112. Maignan, S., et al., *Crystal structures of the catalytic domain of HIV-1 integrase free and complexed with its metal cofactor: high level of similarity of the active site with other viral integrases*. Journal of molecular biology, 1998. **282**(2): p. 359-368.
113. Wang, J.Y., et al., *Structure of a two-domain fragment of HIV-1 integrase: implications for domain organization in the intact protein*. The EMBO journal, 2001. **20**(24): p. 7333-7343.
114. Eijkelenboom, A.P., et al., *The DNA-binding domain of HIV-1 integrase has an SH3-like fold*. Nature structural biology, 1995. **2**(9): p. 807-810.
115. Craigie, R., *HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(26): p. 23213-23216.
116. Romani, B., S. Engelbrecht, and R.H. Glashoff, *Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1*. Journal of general virology, 2010. **91**(1): p. 1-12.
117. Kuppuswamy, M., et al., *Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis*. Nucleic acids research, 1989. **17**(9): p. 3551-3561.
118. Madore, S.J. and B.R. Cullen, *Genetic analysis of the cofactor requirement for human immunodeficiency virus type 1 Tat function*. Journal of virology, 1993. **67**(7): p. 3703-3711.
119. Herrmann, C.H. and A.P. Rice, *Specific interaction of the human immunodeficiency virus Tat proteins with a cellular protein kinase*. Virology, 1993. **197**(2): p. 601-608.
120. Zhang, J., et al., *HIV-1 TAR RNA enhances the interaction between Tat and cyclin T1*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(44): p. 34314-34319.
121. Zhou, M., et al., *The Tat/TAR-dependent phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain stimulates cotranscriptional capping of HIV-1 mRNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(22): p. 12666-12671.
122. Mayol, K., et al., *Design and characterization of an HIV-1 Tat mutant: inactivation of viral and cellular functions but not antigenicity*. Vaccine, 2007. **25**(32): p. 6047-6060.
123. Stettner, M.R., et al., *SMAD proteins of oligodendroglial cells regulate transcription of JC virus early and late genes coordinately with the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1*. The Journal of general virology, 2009. **90**(Pt 8): p. 2005.
124. Lin, Z., Y. Yi-da, and L. Guo-cai, *Extracellular HIV Tat and Tat cysteine rich peptide increase CCR5 expression in monocytes*. Journal of Zhejiang University Science B, 2005. **6**(7): p. 668-672.
125. Matsui, M., et al., *Effects of HIV-1 Tat on expression of HLA class I molecules*. JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, 1996. **11**(3): p. 233-240.
126. Ju, S.M., et al., *Extracellular HIV-1 Tat up-regulates expression of matrix metalloproteinase-9 via a MAPK-NF- κ B dependent pathway in human astrocytes*. Experimental & molecular medicine, 2009. **41**(2): p. 86-93.
127. Bagashev, A. and B.E. Sawaya, *Roles and functions of HIV-1 Tat protein in the CNS: an overview*. Virology journal, 2013. **10**(1): p. 358.

128. Gupta, S., et al., *HIV-1 Tat suppresses gp120-specific T cell response in IL-10-dependent manner*. The Journal of Immunology, 2008. **180**(1): p. 79-88.
129. Bartz, S.R. and M. Emerman, *Human immunodeficiency virus type 1 Tat induces apoptosis and increases sensitivity to apoptotic signals by up-regulating FLICE/caspase-8*. Journal of virology, 1999. **73**(3): p. 1956-1963.
130. Zauli, G., et al., *The human immunodeficiency virus type-1 Tat protein upregulates Bcl-2 gene expression in Jurkat T-cell lines and primary peripheral blood mononuclear cells*. 1995.
131. Zheng, L., et al., *HIV Tat protein increases Bcl-2 expression in monocytes which inhibits monocyte apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-induced ligand*. Intervirology, 2007. **50**(3): p. 224-228.
132. Hwang, S., et al., *Discovery of a small molecule Tat-trans-activation-responsive RNA antagonist that potently inhibits human immunodeficiency virus-1 replication*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(40): p. 39092-39103.
133. Felber, B.K., et al., *rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989. **86**(5): p. 1495-1499.
134. Hammarskjöld, M., et al., *Regulation of human immunodeficiency virus env expression by the rev gene product*. Journal of virology, 1989. **63**(5): p. 1959-1966.
135. Malim, M.H., et al., *The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA*. Nature, 1989. **338**(6212): p. 254-257.
136. Perkins, A., et al., *Structural and functional characterization of the human immunodeficiency virus rev protein*. Journal of acquired immune deficiency syndromes, 1989. **2**(3): p. 256-263.
137. Zapp, M.L. and M.R. Green, *Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein*. Nature, 1989. **342**(6250): p. 714-716.
138. Pollard, V.W. and M.H. Malim, *The HIV-1 rev protein*. Annual review of microbiology, 1998. **52**(1): p. 491-532.
139. Bogerd, H. and W. Greene, *Dominant negative mutants of human T-cell leukemia virus type I Rex and human immunodeficiency virus type 1 Rev fail to multimerize in vivo*. Journal of Virology, 1993. **67**(5): p. 2496-2502.
140. Madore, S.J., et al., *Sequence requirements for Rev multimerization in vivo*. Virology, 1994. **202**(1): p. 186-194.
141. Hope, T.J., et al., *Effector domains of human immunodeficiency virus type 1 Rev and human T-cell leukemia virus type I Rex are functionally interchangeable and share an essential peptide motif*. Journal of Virology, 1991. **65**(11): p. 6001-6007.
142. Fischer, U., et al., *The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs*. Cell, 1995. **82**(3): p. 475-483.
143. Rausch, J.W. and S.F. Le Grice, *HIV Rev assembly on the Rev response element (RRE): a structural perspective*. Viruses, 2015. **7**(6): p. 3053-3075.
144. DiMattia, M.A., et al., *Implications of the HIV-1 Rev dimer structure at 3.2 Å resolution for multimeric binding to the Rev response element*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(13): p. 5810-5814.
145. Kestier III, H.W., et al., *Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS*. Cell, 1991. **65**(4): p. 651-662.
146. Chowes, M.Y., et al., *Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene*. Journal of virology, 1994. **68**(5): p. 2906-2914.
147. de Ronde, A., et al., *Natural HIV-1 NEF accelerates virus replication in primary human lymphocytes*. Virology, 1992. **188**(1): p. 391-395.
148. Foster, J.L., et al., *Mechanisms of HIV-1 Nef function and intracellular signaling*. Journal of Neuroimmune Pharmacology, 2011. **6**(2): p. 230-246.

149. Geyer, M., O.T. Fackler, and B.M. Peterlin, *Structure–function relationships in HIV-1 Nef*. EMBO reports, 2001. **2**(7): p. 580-585.
150. Aiken, C., et al., *Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain*. Cell, 1994. **76**(5): p. 853-864.
151. Piguet, V., et al., *The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruses: a paradigm for the modulation of cell surface receptors*. Immunological reviews, 1999. **168**(1): p. 51-63.
152. Luis, L., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein targets CD4 to the multivesicular body pathway*. Journal of virology, 2009. **83**(13): p. 6578-6590.
153. Baur, A.S., et al., *HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization*. Immunity, 1994. **1**(5): p. 373-384.
154. Arold, S.T. and A.S. Baur, *Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein*. Trends in biochemical sciences, 2001. **26**(6): p. 356-363.
155. Goncalves, J., P. Jallepalli, and D.H. Gabuzda, *Subcellular localization of the Vif protein of human immunodeficiency virus type 1*. Journal of virology, 1994. **68**(2): p. 704-712.
156. MICHAELS, F.H., et al., *The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vif protein is located in the cytoplasm of infected cells and its effect on viral replication is equivalent in HIV-2*. AIDS research and human retroviruses, 1993. **9**(10): p. 1025-1030.
157. Yang, S., Y. Sun, and H. Zhang, *The Multimerization of Human Immunodeficiency Virus Type I Vif Protein A REQUIREMENT FOR Vif FUNCTION IN THE VIRAL LIFE CYCLE*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(7): p. 4889-4893.
158. Borman, A.M., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Vif-mutant particles from restrictive cells: role of Vif in correct particle assembly and infectivity*. Journal of virology, 1995. **69**(4): p. 2058-2067.
159. Gabuzda, D.H., et al., *Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes*. Journal of virology, 1992. **66**(11): p. 6489-6495.
160. Sheehy, A.M., et al., *Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein*. Nature, 2002. **418**(6898): p. 646-650.
161. Shirakawa, K., et al., *Ubiquitination of APOBEC3 proteins by the Vif–Cullin5–ElonginB–ElonginC complex*. Virology, 2006. **344**(2): p. 263-266.
162. Yu, X., et al., *Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif–Cul5–SCF complex*. Science, 2003. **302**(5647): p. 1056-1060.
163. Stopak, K., et al., *HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability*. Molecular cell, 2003. **12**(3): p. 591-601.
164. Öhagen, Å. and D. Gabuzda, *Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core*. Journal of virology, 2000. **74**(23): p. 11055-11066.
165. Izumi, T., et al., *HIV-1 viral infectivity factor interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(48): p. 20798-20803.
166. Henriët, S., et al., *Vif is a RNA chaperone that could temporally regulate RNA dimerization and the early steps of HIV-1 reverse transcription*. Nucleic acids research, 2007. **35**(15): p. 5141-5153.
167. Dettenhofer, M., et al., *Association of human immunodeficiency virus type 1 Vif with RNA and its role in reverse transcription*. Journal of virology, 2000. **74**(19): p. 8938-8945.
168. Russell, R.A. and V.K. Pathak, *Identification of two distinct human immunodeficiency virus type 1 Vif determinants critical for interactions with human APOBEC3G and APOBEC3F*. Journal of virology, 2007. **81**(15): p. 8201-8210.
169. Baraz, L., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Vif binds the viral protease by interaction with its N-terminal region*. Journal of general virology, 2002. **83**(9): p. 2225-2230.

170. Mehle, A., et al., *A zinc-binding region in Vif binds Cul5 and determines cullin selection*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(25): p. 17259-17265.
171. Stanley, B.J., et al., *Structural insight into the human immunodeficiency virus Vif SOCS box and its role in human E3 ubiquitin ligase assembly*. Journal of virology, 2008. **82**(17): p. 8656-8663.
172. Bouyac, M., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein binds to the Pr55Gag precursor*. Journal of Virology, 1997. **71**(12): p. 9358-9365.
173. Santa-Marta, M., et al., *HIV-1 Vif can directly inhibit apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G-mediated cytidine deamination by using a single amino acid interaction and without protein degradation*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(10): p. 8765-8775.
174. Goncalves, J., et al., *Biological activity of human immunodeficiency virus type 1 Vif requires membrane targeting by C-terminal basic domains*. Journal of virology, 1995. **69**(11): p. 7196-7204.
175. Cohen, E.A., et al., *Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1*. Nature, 1988. **334**(6182): p. 532-534.
176. Schwartz, S., et al., *Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs*. Journal of virology, 1990. **64**(11): p. 5448-5456.
177. Nomaguchi, M., M. Fujita, and A. Adachi, *Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis*. Microbes and infection, 2008. **10**(9): p. 960-967.
178. Strebel, K., T. Klimkait, and M.A. Martin, *A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product*. Science, 1988. **241**(4870): p. 1221-1223.
179. Schubert, U., et al., *The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains*. Journal of virology, 1996. **70**(2): p. 809-819.
180. Schubert, U., et al., *The human immunodeficiency virus type 1 encoded Vpu protein is phosphorylated by casein kinase-2 (CK-2) at positions Ser52 and Ser56 within a predicted α -helix-turn- α -helix-motif*. 1994, Elsevier.
181. Schubert, U., et al., *CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway*. Journal of virology, 1998. **72**(3): p. 2280-2288.
182. Neil, S.J., T. Zang, and P.D. Bieniasz, *Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu*. Nature, 2008. **451**(7177): p. 425-430.
183. Perez-Caballero, D., et al., *Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells*. Cell, 2009. **139**(3): p. 499-511.
184. Van Damme, N., et al., *The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein*. Cell host & microbe, 2008. **3**(4): p. 245-252.
185. Goffinet, C., et al., *HIV-1 antagonism of CD317 is species specific and involves Vpu-mediated proteasomal degradation of the restriction factor*. Cell host & microbe, 2009. **5**(3): p. 285-297.
186. Lewinski, M.K., et al., *Membrane anchoring by a C-terminal tryptophan enables HIV-1 Vpu to displace bone marrow stromal antigen 2 (BST2) from sites of viral assembly*. Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(17): p. 10919-10933.
187. Tristem, M., et al., *Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpx and vpr*. The EMBO journal, 1992. **11**(9): p. 3405-3412.
188. Le Rouzic, E. and S. Benichou, *The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle*. Retrovirology, 2005. **2**(1): p. 11.
189. Bachand, F., et al., *Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(13): p. 9083-9091.
190. Morellet, N., et al., *NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR*. Journal of molecular biology, 2003. **327**(1): p. 215-227.

191. Fritz, J.V., et al., *Direct Vpr-Vpr interaction in cells monitored by two photon fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence lifetime imaging*. *Retrovirology*, 2008. **5**(1): p. 87.
192. Popov, S., et al., *Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex*. *The EMBO journal*, 1998. **17**(4): p. 909-917.
193. Jowett, J., et al., *The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2+ M phase of the cell cycle*. *Journal of virology*, 1995. **69**(10): p. 6304-6313.
194. Jacotot, E., et al., *The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore*. *The Journal of experimental medicine*, 2000. **191**(1): p. 33-46.
195. Heinzinger, N.K., et al., *The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994. **91**(15): p. 7311-7315.
196. Lyonnais, S., et al., *A protein ballet around the viral genome orchestrated by HIV-1 reverse transcriptase leads to an architectural switch: from nucleocapsid-condensed RNA to Vpr-bridged DNA*. *Virus research*, 2013. **171**(2): p. 287-303.
197. Hrimech, M., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr functions as an immediate-early protein during HIV-1 infection*. *Journal of virology*, 1999. **73**(5): p. 4101-4109.
198. Bleul, C.C., et al., *The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. **94**(5): p. 1925-1930.
199. Rudnicka, D., et al., *Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses*. *Journal of virology*, 2009. **83**(12): p. 6234-6246.
200. Bracq, L., et al., *Mechanisms for cell-to-cell transmission of HIV-1*. *Frontiers in immunology*, 2018. **9**: p. 260.
201. Zhou, Y., et al., *Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 decay following entry into resting CD4+ T cells*. *Journal of virology*, 2005. **79**(4): p. 2199-2210.
202. Robinson, S.P., et al., *Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells*. *European journal of immunology*, 1999. **29**(9): p. 2769-2778.
203. Donaghy, H., J. Wilkinson, and A.L. Cunningham, *HIV interactions with dendritic cells: has our focus been too narrow?* *Journal of leukocyte biology*, 2006. **80**(5): p. 1001-1012.
204. Vernazza, P.L., et al., *Sexual transmission of HIV: infectiousness and prevention*. *Aids*, 1999. **13**(2): p. 155-166.
205. Turville, S.G., et al., *Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets*. *Nature immunology*, 2002. **3**(10): p. 975-983.
206. Gorry, P.R., et al., *Pathogenesis of macrophage tropic HIV-1*. *Current HIV research*, 2005. **3**(1): p. 53-60.
207. Zaitseva, M., et al., *Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection*. *Nature medicine*, 1997. **3**(12): p. 1369-1375.
208. Sattentau, Q.J. and M. Stevenson, *Macrophages and HIV-1: an unhealthy constellation*. *Cell host & microbe*, 2016. **19**(3): p. 304-310.
209. Siliciano, R.F. and W.C. Greene, *HIV latency*. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2011. **1**(1): p. a007096.
210. Kumar, A., W. Abbas, and G. Herbein, *HIV-1 latency in monocytes/macrophages*. *Viruses*, 2014. **6**(4): p. 1837-1860.
211. Wong, M.E., A. Jaworowski, and A.C. Hearps, *Corrigendum: The HIV Reservoir in Monocytes and Macrophages*. *Frontiers in immunology*, 2019. **10**: p. 2517.
212. Fois, A.F. and B.J. Brew, *The potential of the CNS as a reservoir for HIV-1 infection: implications for HIV eradication*. *Current HIV/AIDS Reports*, 2015. **12**(2): p. 299-303.

213. Bowers, K., et al., *CD4: a co-receptor in the immune response and HIV infection*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(6): p. 871-875.
214. Hanna, Z., et al., *Specific expression of the human CD4 gene in mature CD4+ CD8-and immature CD4+ CD8+ T cells and in macrophages of transgenic mice*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(2): p. 1084-1094.
215. Killeen, N. and D.J.T.C.M. Littman, *The regulation and function of the CD4 coreceptor during T lymphocyte development*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996: p. 89-106.
216. Benoist, C. and D.J.C.B. Mathis, *T-Cell Co-Receptors: The end of a frustrating search*. Curr Biol, 1994. **4**(9): p. 821-823.
217. Maddon, P.J., et al., *The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family*. Cell, 1985. **42**(1): p. 93-104.
218. Williams, A.F. and A.N.J.A.r.o.i. Barclay, *The immunoglobulin superfamily—domains for cell surface recognition*. Annu Rev Immunol, 1988. **6**(1): p. 381-405.
219. Wang, J., et al., *Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains*. Nature, 1990. **348**(6300): p. 411-418.
220. Ryu, S.-E., et al., *Crystal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4*. Nature, 1990. **348**(6300): p. 419-426.
221. Crise, B. and J.J.J.o.B.C. Rose, *Identification of palmitoylation sites on CD4, the human immunodeficiency virus receptor*. J Biol Chem, 1992. **267**(19): p. 13593-13597.
222. Cymer, F., A. Veerappan, and D.J.B.e.B.A.-B. Schneider, *Transmembrane helix-helix interactions are modulated by the sequence context and by lipid bilayer properties*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818**(4): p. 963-973.
223. Parrish, H.L., et al., *A Transmembrane Domain GGxxG Motif in CD4 Contributes to Its Lck-Independent Function but Does Not Mediate CD4 Dimerization*. PLOS ONE, 2015. **10**(7): p. e0132333.
224. Fleury, S.G., et al., *La molécule CD4: un récepteur aux multiples interactions*. médecine/sciences 1992.
225. Bernstein, H.B., et al., *CD4 expression on activated NK cells: ligation of CD4 induces cytokine expression and cell migration*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3669-3676.
226. Zhen, A., et al., *CD4 ligation on human blood monocytes triggers macrophage differentiation and enhances HIV infection*. J Virol, 2014. **88**(17): p. 9934-9946.
227. Janeway Jr, C.A.J.A.r.o.i., *The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation*. Annu Rev Immunol, 1992. **10**(1): p. 645-674.
228. Straus, D.B. and A.J.C. Weiss, *Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor*. Cell, 1992. **70**(4): p. 585-593.
229. Straus, D. and A.J.T.J.o.e.m. Weiss, *The CD3 chains of the T cell antigen receptor associate with the ZAP-70 tyrosine kinase and are tyrosine phosphorylated after receptor stimulation*. Exp Med, 1993. **178**(5): p. 1523-1530.
230. Artyomov, M.N., et al., *CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(39): p. 16916-16921.
231. Marsh, M. and A.J.T.C.M. Pelchen-Matthews, *Endocytic and exocytic regulation of CD4 expression and function*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996: p. 107-135.
232. McDougal, J., et al., *Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule*. Science, 1986. **231**(4736): p. 382-385.
233. Dagleish, A.G., et al., *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus*. 1984. **312**(5996): p. 763-767.
234. Klatzmann, D., et al., *T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 767-768.

235. Weiss, R.A., *Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retrovirus entry*, in *The retroviridae*. 1993, Springer. p. 1-108.
236. Kwong, P.D., et al., *Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody*. *Nature*, 1998. **393**(6686): p. 648-659.
237. Trono, D.J.C., *HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast*. *Cell*, 1995. **82**(2): p. 189-192.
238. Fauci, A.S., *Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease*. *Nature*, 1996. **384**(6609): p. 529-34.
239. Doranz, B.J., et al., *A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors*. *Cell*, 1996. **85**(7): p. 1149-1158.
240. Choe, H., et al., *The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1*. *J Virol*, 1998. **72**(7): p. 6113-6118.
241. Jinno, A., et al., *Identification of the chemokine receptor TER1/CCR8 expressed in brain-derived cells and T cells as a new coreceptor for HIV-1 infection*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **243**(2): p. 497-502.
242. Walz, D.A., et al., *Primary structure of human platelet factor 4*. *Thromb Res*, 1977. **11**(6): p. 893-898.
243. Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors*. *Pharmacol Rev*, 2000. **52**(1): p. 145-176.
244. Combadiere, C., et al., *Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES*. *J Leukoc Biol*, 1996. **60**(1): p. 147-152.
245. Rottman, J.B., et al., *Cellular localization of the chemokine receptor CCR5. Correlation to cellular targets of HIV-1 infection*. *Am J Pathol*, 1997. **151**(5): p. 1341.
246. Nibbs, R.J., et al., *LD78 β , a non-allelic variant of human MIP-1 α (LD78 α), has enhanced receptor interactions and potent HIV suppressive activity*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(25): p. 17478-17483.
247. Raport, C.J., et al., *Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1 β , and MIP-1 α* . *J Biol Chem*, 1996. **271**(29): p. 17161-17166.
248. Samson, M., et al., *Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene*. *Biochemistry*, 1996. **35**(11): p. 3362-3367.
249. Gong, W., et al., *Monocyte chemotactic protein-2 activates CCR5 and blocks CD4/CCR5-mediated HIV-1 entry/replication*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(8): p. 4289-4292.
250. Contento, R.L., et al., *CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(29): p. 10101-10106.
251. Taub, D.D., et al., *β chemokines costimulate lymphocyte cytolysis, proliferation, and lymphokine production*. *J Leukoc Biol*, 1996. **59**(1): p. 81-89.
252. Dragic, T., et al., *HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5*. *Nature*, 1996. **381**(6584): p. 667-673.
253. Deng, H., et al., *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1*. *Nature*, 1996. **381**(6584): p. 661-666.
254. Dragic, T., et al., *Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry*. *J Virol*, 1998. **72**(1): p. 279-285.
255. Rabut, G.E., et al., *Alanine substitutions of polar and nonpolar residues in the amino-terminal domain of CCR5 differently impair entry of macrophage- and dualtropic isolates of human immunodeficiency virus type 1*. *J Virol*, 1998. **72**(4): p. 3464-3468.
256. Farzan, M., et al., *Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry*. *Cell*, 1999. **96**(5): p. 667-676.

257. Blanpain, C., et al., *Multiple charged and aromatic residues in CCR5 amino-terminal domain are involved in high affinity binding of both chemokines and HIV-1 Env protein*. J Biol Chem, 1999. **274**(49): p. 34719-34727.
258. Blanpain, C., et al., *Extracellular cysteines of CCR5 are required for chemokine binding, but dispensable for HIV-1 coreceptor activity*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 18902-18908.
259. Oppermann, M.J.C.s., *Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation*. Cell Signal, 2004. **16**(11): p. 1201-1210.
260. Dohlman, H.G., et al., *Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the beta. 2-adrenergic receptor*. Biochemistry, 1990. **29**(9): p. 2335-2342.
261. Perlman, J.H., et al., *A disulfide bond between conserved extracellular cysteines in the thyrotropin-releasing hormone receptor is critical for binding*. J Biol Chem, 1995. **270**(42): p. 24682-24685.
262. Baggiolini, M., B. Dewald, and B.J.A.r.o.i. Moser, *Human chemokines: an update*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**(1): p. 675-705.
263. Blanpain, C., et al., *Palmitoylation of CCR5 is critical for receptor trafficking and efficient activation of intracellular signaling pathways*. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 23795-23804.
264. Percherancier, Y., et al., *Palmitoylation-dependent control of degradation, life span, and membrane expression of the CCR5 receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31936-31944.
265. Kraft, K., et al., *Characterization of sequence determinants within the carboxyl-terminal domain of chemokine receptor CCR5 that regulate signaling and receptor internalization*. J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 34408-34418.
266. Oppermann, M., et al., *Differential effects of CC chemokines on CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation and identification of phosphorylation sites on the CCR5 carboxyl terminus*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8875-8885.
267. Mueller, A., P.G.J.T.i.j.o.b. Strange, and c. biology, *The chemokine receptor, CCR5*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(1): p. 35-38.
268. Moore, J.P.J.S., *Coreceptors--Implications for HIV Pathogenesis and Therapy*. Science, 1997. **276**(5309): p. 51-52.
269. Tuttle, D.L., et al., *Expression of CCR5 increases during monocyte differentiation and directly mediates macrophage susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1998. **72**(6): p. 4962-4969.
270. Wu, L., et al., *CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro*. J Exp Med, 1997. **185**(9): p. 1681-1692.
271. Platt, E.J., et al., *Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 2855-2864.
272. Ostrowski, M.A., et al., *Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-infected and uninfected individuals*. J Immunol, 1998. **161**(6): p. 3195-3201.
273. Lin, Y.-L., et al., *The chemokine CCL5 regulates the in vivo cell surface expression of its receptor, CCR5*. AIDS, 2008. **22**(3): p. 430-432.
274. Signoret, N., et al., *Endocytosis and recycling of the HIV coreceptor CCR5*. J Cell Biol, 2000. **151**(6): p. 1281-1294.
275. Kinter, A., et al., *Chemokines, cytokines and HIV: a complex network of interactions that influence HIV pathogenesis*. Immunol Rev, 2000. **177**: p. 88-98.
276. Ebert, L.M. and S.R.J.T.J.o.I. McColl, *Up-regulation of CCR5 and CCR6 on distinct subpopulations of antigen-activated CD4+ T lymphocytes*. J Immunol, 2002. **168**(1): p. 65-72.
277. Carroll, R.G., et al., *Differential regulation of HIV-1 fusion cofactor expression by CD28 costimulation of CD4+ T cells*. Science, 1997. **276**(5310): p. 273-276.

278. Vassiliadou, N., L. Tucker, and D.J.J.T.J.o.I. Anderson, *Progesterone-induced inhibition of chemokine receptor expression on peripheral blood mononuclear cells correlates with reduced HIV-1 infectability in vitro*. J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7510-7518.
279. Reynes, J., et al., *CD4+ T cell surface CCR5 density as a determining factor of virus load in persons infected with human immunodeficiency virus type 1*. J Infect Dis, 2000. **181**(3): p. 927-932.
280. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. Science, 1996. **272**(5263): p. 872-877.
281. Zlotnik, A.J.I. and i.i.o. oncogenesis, *Involvement of chemokine receptors in organ-specific metastasis*. Contrib Microbiol, 2006. **13**: p. 191-199.
282. Murdoch, C.J.I.r., *CXCR4: chemokine receptor extraordinaire*. Immunol Rev, 2000. **177**: p. 175-184.
283. Bachelierie, F., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors*. Pharmacol Rev, 2014. **66**(1): p. 1-79.
284. Caruz, A., et al., *Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene 1*. J Biol Chem, 1998. **426**(2): p. 271-278.
285. Loetscher, M., et al., *Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes*. J Biol Chem, 1994. **269**(1): p. 232-237.
286. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. Science, 1996. **272**(5263): p. 872-7.
287. Oberlin, E., et al., *The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1*. Nature, 1996. **382**(6594): p. 833-835.
288. Wu, B., et al., *Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists*. Science, 2010. **330**(6007): p. 1066-71.
289. Kufareva, I., et al., *Stoichiometry and geometry of the CXC chemokine receptor 4 complex with CXC ligand 12: Molecular modeling and experimental validation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(50): p. E5363-E5372.
290. Kremer, K.N., et al., *Stromal cell-derived factor-1 signaling via the CXCR4-TCR heterodimer requires phospholipase C- β 3 and phospholipase C- γ 1 for distinct cellular responses*. J Immunol, 2011. **187**(3): p. 1440-1447.
291. Décaillot, F.M., et al., *CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration*. J Biol Chem, 2011. **286**(37): p. 32188-97.
292. Gerlach, L.O., et al., *Molecular interactions of cyclam and bicyclam non-peptide antagonists with the CXCR4 chemokine receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 14153-14160.
293. Rossi, D. and A.J.A.r.o.i. Zlotnik, *The biology of chemokines and their receptors*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**(1): p. 217-242.
294. Werner, L., H. Guzner-Gur, and I.J.T. Dotan, *Involvement of CXCR4/CXCR7/CXCL12 Interactions in Inflammatory bowel disease*. Theranostics, 2013. **3**(1): p. 40.
295. Moriuchi, M., et al., *Cloning and analysis of the promoter region of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry*. J Immunol, 1997. **159**(9): p. 4322-4329.
296. Wegner, S.A., et al., *Genomic organization and functional characterization of the chemokine receptor CXCR4, a major entry co-receptor for human immunodeficiency virus type 1*. J Biol Chem, 1998. **273**(8): p. 4754-4760.
297. Moriuchi, M., et al., *USF/c-Myc enhances, while Yin-Yang 1 suppresses, the promoter activity of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 5986-5992.
298. Cristillo, A.D., et al., *Up-regulation of HIV coreceptor CXCR4 expression in human T lymphocytes is mediated in part by a cAMP-responsive element*. FASEB J, 2002. **16**(3): p. 354-364.
299. Jourdan, P., et al., *Cytokines and cell surface molecules independently induce CXCR4 expression on CD4+ CCR7+ human memory T cells*. J Immunol, 2000. **165**(2): p. 716-724.

300. Wang, J., et al., *Role of tyrosine phosphorylation in ligand-independent sequestration of CXCR4 in human primary monocytes-macrophages*. J Biol Chem, 2001. **276**(52): p. 49236-49243.
301. Feil, C., H.G.J.B. Augustin, and b.r. communications, *Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**(1): p. 38-45.
302. Salcedo, R., et al., *Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: in vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1 α* . Am J Pathol, 1999. **154**(4): p. 1125-1135.
303. Phillips, R.J., et al., *Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1 α* . J Biol Chem, 2005. **280**(23): p. 22473-22481.
304. Han, Y., et al., *TNF- α down-regulates CXCR4 expression in primary murine astrocytes*. Brain Res, 2001. **888**(1): p. 1-10.
305. Gupta, S.K., et al., *Chemokine receptors in human endothelial cells: functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines*. J Biol Chem, 1998. **273**(7): p. 4282-4287.
306. Moriuchi, M., H. Moriuchi, and A.S.J.J.J.o.A.I.D.S. Fauci, *HTLV-I TAX ACTIVATION OF THE CXCR4 PROMOTER BY ASSOCIATION WITH NUCLEAR RESPIRATORY FACTOR 1*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1999. **20**(4): p. A77.
307. Yasukawa, M., et al., *Down-regulation of CXCR4 by human herpesvirus 6 (HHV-6) and HHV-7*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5417-5422.
308. Berson, J.F., et al., *A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 6288-6295.
309. Wang, J., et al., *N-linked glycosylation in the CXCR4 N-terminus inhibits binding to HIV-1 envelope glycoproteins*. Virology, 2004. **324**(1): p. 140-150.
310. Thorsden, I., S. Polzer, and M.J.B.i.d. Schreiber, *Infection of cells expressing CXCR4 mutants lacking N-glycosylation at the N-terminal extracellular domain is enhanced for R5X4-dualtropic human immunodeficiency virus type-1*. BMC Infect Dis, 2002. **2**(1): p. 1-11.
311. Farzan, M., et al., *The role of post-translational modifications of the CXCR4 amino terminus in stromal-derived factor 1 α association and HIV-1 entry*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 29484-29489.
312. Preobrazhensky, A.A., et al., *Monocyte chemotactic protein-1 receptor CCR2B is a glycoprotein that has tyrosine sulfation in a conserved extracellular N-terminal region*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 5295-5303.
313. Farzan, M., et al., *Tyrosine-sulfated peptides functionally reconstitute a CCR5 variant lacking a critical amino-terminal region*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 40397-40402.
314. Fong, A.M., et al., *CX3CR1 tyrosine sulfation enhances fractalkine-induced cell adhesion*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19418-19423.
315. Veldkamp, C.T., et al., *Recognition of a CXCR4 sulfotyrosine by the chemokine stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α /CXCL12)*. J Mol Biol, 2006. **359**(5): p. 1400-1409.
316. Shirozu, M., et al., *Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene*. Genomics, 1995. **28**(3): p. 495-500.
317. Yu, L., et al., *Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1*. Gene, 2006. **374**: p. 174-179.
318. Crump, M.P., et al., *Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1*. EMBO J, 1997. **16**(23): p. 6996-7007.

319. Rajagopalan, L. and K.J.B.r. Rajarathnam, *Structural basis of chemokine receptor function—a model for binding affinity and ligand selectivity*. *Biosci Rep* 2006. **26**(5): p. 325-339.
320. Wells, T.N., et al., *Selectivity and antagonism of chemokine receptors*. *J Leukoc Biol*, 1996. **59**(1): p. 53-60.
321. Seibert, C., et al., *Sequential tyrosine sulfation of CXCR4 by tyrosylprotein sulfotransferases*. *Biochemistry*, 2008. **47**(43): p. 11251-11262.
322. Veldkamp, C.T., et al., *Structural basis of CXCR4 sulfotyrosine recognition by the chemokine SDF-1/CXCL12*. *Sci Signal*, 2008. **1**(37): p. ra4-ra4.
323. Pawig, L., et al., *Diversity and inter-connections in the CXCR4 chemokine receptor/ligand family: molecular perspectives*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 429.
324. Santiago, B., et al., *CXCL12 gene expression is upregulated by hypoxia and growth arrest but not by inflammatory cytokines in rheumatoid synovial fibroblasts*. *Cytokine*, 2011. **53**(2): p. 184-190.
325. De Falco, E., et al., *SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells*. *Blood*, 2004. **104**(12): p. 3472-3482.
326. Ceradini, D.J., et al., *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1*. *Nat Med*, 2004. **10**(8): p. 858-864.
327. Kryczek, I., et al., *CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers*. *Cancer Res*, 2005. **65**(2): p. 465-472.
328. Schioppa, T., et al., *Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia*. *J Exp Med*, 2004. **196**(1): p. 8.
329. Schutyser, E., et al., *Hypoxia enhances CXCR4 expression in human microvascular endothelial cells and human melanoma cells*. *Eur Cytokine Netw*, 2007. **18**(2): p. 59.
330. Esencay, M., Y. Sarfraz, and D.J.B.c. Zagzag, *CXCR7 is induced by hypoxia and mediates glioma cell migration towards SDF-1 α* . *BMC Cancer*, 2013. **13**(1): p. 1-9.
331. Liu, H., et al., *Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1 α in MSCs*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **401**(4): p. 509-515.
332. Yu, P., et al., *Downregulation of CXCL12 in mesenchymal stromal cells by TGF β promotes breast cancer metastasis*. *Oncogene*, 2017. **36**(6): p. 840-849.
333. Altenburg, J.D., et al., *A naturally occurring splice variant of CXCL12/stromal cell-derived factor 1 is a potent human immunodeficiency virus type 1 inhibitor with weak chemotaxis and cell survival activities*. *J Virol*, 2007. **81**(15): p. 8140-8148.
334. Laguri, C., et al., *The novel CXCL12 γ isoform encodes an unstructured cationic domain which regulates bioactivity and interaction with both glycosaminoglycans and CXCR4*. *PLoS One*, 2007. **2**(10): p. e1110.
335. Connell, B.J., et al., *Heparan sulfate differentially controls CXCL12 α -and CXCL12 γ -mediated cell migration through differential presentation to their receptor CXCR4*. *Sci Signal*, 2016. **9**(452): p. ra107-ra107.
336. Rueda, P., et al., *The CXCL12 γ chemokine displays unprecedented structural and functional properties that make it a paradigm of chemoattractant proteins*. *PLoS One*, 2008. **3**(7): p. e2543.
337. Huang, Z., et al., *miR-141 Regulates colonic leukocytic trafficking by targeting CXCL12 β during murine colitis and human Crohn's disease*. *Gut*, 2014. **63**(8): p. 1247-1257.
338. Naumann, U., et al., *CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11*. *PLoS One*, 2010. **5**(2): p. e9175.
339. Balabanian, K., et al., *The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(42): p. 35760-35766.
340. Boldajipour, B., et al., *Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration*. *Cell*, 2008. **132**(3): p. 463-473.
341. Luker, K.E., et al., *Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells*. *Oncogene*, 2012. **31**(45): p. 4750-4758.

342. McCandless, E.E., et al., *Pathological expression of CXCL12 at the blood-brain barrier correlates with severity of multiple sclerosis*. Am J Pathol, 2008. **172**(3): p. 799-808.
343. Gouwy, M., et al., *Possible mechanisms involved in chemokine synergy fine tuning the inflammatory response*. Immunol Lett, 2012. **145**(1-2): p. 10-14.
344. Gouwy, M., et al., *Chemokines and other GPCR ligands synergize in receptor-mediated migration of monocyte-derived immature and mature dendritic cells*. Immunobiology, 2014. **219**(3): p. 218-229.
345. Schiraldi, M., et al., *HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4*. J Exp Med, 2012. **209**(3): p. 551-563.
346. Peled, A., et al., *The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34+ cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3289-3296.
347. Lataillade, J.-J., et al., *Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34+ cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival*. Blood, 2000. **95**(3): p. 756-768.
348. Lee, Y., et al., *Enhancement of intracellular signaling associated with hematopoietic progenitor cell survival in response to SDF-1/CXCL12 in synergy with other cytokines*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4307-4317.
349. Eash, K.J., et al., *CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow*. J Clin Invest, 2010. **120**(7): p. 2423-2431.
350. Saxena, A., et al., *Stromal cell-derived factor-1alpha is cardioprotective after myocardial infarction*. Circulation, 2008. **117**(17): p. 2224-31.
351. Schuh, A., et al., *Myocardial regeneration by transplantation of modified endothelial progenitor cells expressing SDF-1 in a rat model*. J Cell Mol Med, 2012. **16**(10): p. 2311-20.
352. Jie, W., et al., *SDF-1alpha/CXCR4 axis is involved in glucose-potentiated proliferation and chemotaxis in rat vascular smooth muscle cells*. Int J Exp Pathol, 2010. **91**(5): p. 436-444.
353. Serrano-Pertierra, E., et al., *Increased natural killer cell chemotaxis to CXCL12 in patients with multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2015. **282**: p. 39-44.
354. Bleul, C.C., et al., *The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry*. Nature, 1996. **382**(6594): p. 829-833.
355. Tan, S., et al., *A novel CXCR4 targeting protein SDF-1/54 as an HIV-1 entry inhibitor*. Viruses, 2019. **11**(9): p. 874.
356. Amara, A., et al., *HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication*. J Exp Med, 1997. **186**(1): p. 139-146.
357. Agace, W., et al., *Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation*. Curr Biol, 2000. **10**(6): p. 325-328.
358. Deng, H., et al., *Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses*. Nature, 1997. **388**(6639): p. 296-300.
359. Edinger, A.L., et al., *Use of GPR1, GPR15, and STRL33 as coreceptors by diverse human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus envelope proteins*. Virology, 1998. **249**(2): p. 367-378.
360. Krumbiegel, M. and F.J.J.o.g.v. Kirchhoff, *Coreceptor usage of BOB/GPR15 and Bonzo/STRL33 by primary isolates of human immunodeficiency virus type 1*. J Gen Virol, 1999. **80**(5): p. 1241-1251.
361. Lee, S., et al., *CCR8 on human thymocytes functions as a human immunodeficiency virus type 1 coreceptor*. J Virol, 2000. **74**(15): p. 6946-6952.
362. Sharron, M., et al., *Expression and coreceptor activity of STRL33/Bonzo on primary peripheral blood lymphocytes*. Blood, 2000. **96**(1): p. 41-49.
363. Zhang, Y.-J., et al., *HIV type 1 molecular clones able to use the Bonzo/STRL-33 coreceptor for virus entry*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2001. **17**(3): p. 217-227.

364. Shimizu, N., et al., *A formylpeptide receptor, FPRL1, acts as an efficient coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus*. *Retrovirology*, 2008. **5**(1): p. 1-14.
365. Hoffman, T.L., et al., *HIV type I envelope determinants for use of the CCR2b, CCR3, STRL33, and APJ coreceptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(19): p. 11360-11365.
366. Neil, S.J., et al., *The promiscuous CC chemokine receptor D6 is a functional coreceptor for primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2 on astrocytes*. *J Virol*, 2005. **79**(15): p. 9618-9624.
367. Jiang, C., et al., *Primary infection by a human immunodeficiency virus with atypical coreceptor tropism*. *J Virol*, 2011. **85**(20): p. 10669-10681.
368. Charo, I.F.J.C.i., *CCR2: from cloning to the creation of knockout mice*. *Chem Immunol*, 1999. **72**: p. 30.
369. Charo, I.F., et al., *Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(7): p. 2752-2756.
370. Frade, J., et al., *The amino-terminal domain of the CCR2 chemokine receptor acts as coreceptor for HIV-1 infection*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(3): p. 497-502.
371. Wong, L.-M., et al., *Organization and differential expression of the human monocyte chemoattractant protein 1 receptor gene: evidence for the role of the carboxyl-terminal tail in receptor trafficking*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(2): p. 1038-1045.
372. Yamasaki, R., et al., *Role of CCR2 in immunobiology and neurobiology*. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, 2012. **3**(1): p. 16-29.
373. Hogaboam, C.M., et al., *Differential monocyte chemoattractant protein-1 and chemokine receptor 2 expression by murine lung fibroblasts derived from Th1-and Th2-type pulmonary granuloma models*. *J Immunol*, 1999. **163**(4): p. 2193-2201.
374. Sozzani, S., et al., *MCP-1 and CCR2 in HIV infection: regulation of agonist and receptor expression*. *J Leukoc Biol*, 1997. **62**(1): p. 30-33.
375. Polentarutti, N., et al., *IL-2-regulated expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor (CCR2) in human NK cells: characterization of a predominant 3.4-kilobase transcript containing CCR2B and CCR2A sequences*. *J Immunol*, 1997. **158**(6): p. 2689-2694.
376. Loetscher, P., et al., *Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes*. *J Exp Med*, 1996. **184**(2): p. 569-577.
377. Perera, L.P., C.K. Goldman, and T.A.J.T.J.o.I. Waldmann, *IL-15 induces the expression of chemokines and their receptors in T lymphocytes*. *J Immunol*, 1999. **162**(5): p. 2606-2612.
378. Han, K.H., et al., *Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes: a regulatory role for plasma LDL*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(12): p. 1983-1991.
379. Sica, A., et al., *Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes*. *J Exp Med*, 1997. **185**(5): p. 969-974.
380. Zhou, Y., et al., *LPS down-regulates the expression of chemokine receptor CCR2 in mice and abolishes macrophage infiltration in acute inflammation*. *J Leukoc Biol*, 1999. **65**(2): p. 265-269.
381. Saccani, A., et al., *Redox regulation of chemokine receptor expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(6): p. 2761-2766.
382. Weber, C., et al., *Downregulation by tumor necrosis factor- α of monocyte CCR2 expression and monocyte chemotactic protein-1-induced transendothelial migration is antagonized by oxidized low-density lipoprotein: A potential mechanism of monocyte retention in atherosclerotic lesions*. *Atherosclerosis*, 1999. **145**(1): p. 115-123.
383. Gong, X., et al., *Monocyte chemotactic protein-2 (MCP-2) uses CCR1 and CCR2B as its functional receptors*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(18): p. 11682-11685.

384. Ben-Baruch, A., et al., *Monocyte chemotactic protein-3 (MCP3) interacts with multiple leukocyte receptors: CC CKR1, a receptor for macrophage inflammatory protein-1 α /Rantes, is also a functional receptor for MCP3*. J Biol Chem, 1995. **270**(38): p. 22123-22128.
385. Garcia-Zepeda, E.A., et al., *Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and-3*. J Immunol, 1996. **157**(12): p. 5613-5626.
386. Nomiyama, H., et al., *Human CC chemokine liver-expressed chemokine/CCL16 is a functional ligand for CCR1, CCR2 and CCR5, and constitutively expressed by hepatocytes*. Int Immunol, 2001. **13**(8): p. 1021-1029.
387. O'Connor, T., et al., *CCL2-CCR2 signaling in disease pathogenesis*. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2015. **15**(2): p. 105-118.
388. Lim, S.Y., et al., *Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis*. Oncotarget, 2016. **7**(19): p. 28697.
389. Solari, R., J.E. Pease, and M.J.E.j.o.p. Begg, *Chemokine receptors as therapeutic targets: why aren't there more drugs?* Eur J Pharmacol, 2015. **746**: p. 363-367.
390. Serbina, N.V. and E.G.J.N.i. Pamer, *Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2*. Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 311-317.
391. De Paula, V., et al., *Structural basis for the interaction of human β -defensin 6 and its putative chemokine receptor CCR2 and breast cancer microvesicles*. J Mol Biol, 2013. **425**(22): p. 4479-4495.
392. Bakos, E., et al., *CCR2 Regulates the Immune Response by Modulating the Interconversion and Function of Effector and Regulatory T Cells*. J Immunol, 2017. **198**(12): p. 4659-4671.
393. Aili, A., et al., *CCR2 Signal Facilitates Thymic Egress by Priming Thymocyte Responses to Sphingosine-1-Phosphate*. Front Immunol, 2018. **9**(1263).
394. Wu, X.-B., et al., *Chemokine receptor CCR2 contributes to neuropathic pain and the associated depression via increasing NR2B-mediated currents in both D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in the nucleus accumbens shell*. Neuropsychopharmacology, 2018. **43**(11): p. 2320-2330.
395. Mengozzi, M., et al., *Human immunodeficiency virus replication induces monocyte chemotactic protein-1 in human macrophages and U937 promonocytic cells*. Blood, 1999. **93**(6): p. 1851-1857.
396. Wetzel, M.A., et al., *The effect of X4 and R5 HIV-1 on C, CC, and CXC chemokines during the early stages of infection in human PBMCs*. Virology, 2002. **292**(1): p. 6-15.
397. Bethel-Brown, C., et al., *Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB-mediated induction of monocyte chemoattractant protein 1 in human astrocytes: implications for HIV-associated neuroinflammation*. J Neuroinflammation, 2012. **9**(1): p. 1-14.
398. Tan, S., et al., *HIV-1 impairs human retinal pigment epithelial barrier function: possible association with the pathogenesis of HIV-associated retinopathy*. Lab Invest, 2014. **94**(7): p. 777-787.
399. Ansari, A.W., et al., *Host chemokine (CC motif) ligand-2 (CCL2) is differentially regulated in HIV type 1 (HIV-1)-infected individuals*. Int Immunol, 2006. **18**(10): p. 1443-1451.
400. Pulliam, L., B. Sun, and H.J.J.o.n. Rempel, *Invasive chronic inflammatory monocyte phenotype in subjects with high HIV-1 viral load*. J Neuroimmunol, 2004. **157**(1-2): p. 93-98.
401. Van den Bergh, R., et al., *Transcriptome analysis of monocyte-HIV interactions*. Retrovirology, 2010. **7**(1): p. 1-16.
402. Gekonge, B., et al., *Constitutive gene expression in monocytes from chronic HIV-1 infection overlaps with acute Toll-like receptor induced monocyte activation profiles*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41153.

403. Duskova, K., et al., *MicroRNA regulation and its effects on cellular transcriptome in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infected individuals with distinct viral load and CD4 cell counts.* BMC Infect Dis, 2013. **13**(1): p. 1-18.
404. Fantuzzi, L., et al., *Endogenous CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) modulates human immunodeficiency virus type-1 replication and affects cytoskeleton organization in human monocyte-derived macrophages.* Blood, 2003. **102**(7): p. 2334-2337.
405. Schwartzkopff, F., et al., *Platelet factor 4 (CXCL4) facilitates human macrophage infection with HIV-1 and potentiates virus replication.* Innate Immun, 2009. **15**(6): p. 368-379.
406. Rollenhagen, C. and S.J.M.i. Asin, *Enhanced HIV-1 replication in ex vivo ectocervical tissues from post-menopausal women correlates with increased inflammatory responses.* Mucosal Immunol, 2011. **4**(6): p. 671-681.
407. Eugenin, E.A., et al., *CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 mediates enhanced transmigration of human immunodeficiency virus (HIV)-infected leukocytes across the blood-brain barrier: a potential mechanism of HIV-CNS invasion and NeuroAIDS.* J Neurosci, 2006. **26**(4): p. 1098-1106.
408. Cota, M., et al., *Upregulated expression of interleukin-8, RANTES and chemokine receptors in human astrocytic cells infected with HIV-1.* J Neurovirol, 2000. **6**(1): p. 75-83.
409. Ganor, Y., et al., *The adult penile urethra is a novel entry site for HIV-1 that preferentially targets resident urethral macrophages.* Mucosal Immunol, 2013. **6**(4): p. 776-786.
410. Tuyama, A.C., et al., *Human immunodeficiency virus (HIV)-1 infects human hepatic stellate cells and promotes collagen I and monocyte chemoattractant protein-1 expression: Implications for the pathogenesis of HIV/hepatitis C virus-induced liver fibrosis.* Hepatology, 2010. **52**(2): p. 612-622.
411. Del Corno, M., et al., *HIV-1 gp120 and chemokine activation of Pyk2 and mitogen-activated protein kinases in primary macrophages mediated by calcium-dependent, pertussis toxin-insensitive chemokine receptor signaling.* Blood, 2001. **98**(10): p. 2909-2916.
412. Del Corno, M., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 gp120 and other activation stimuli are highly effective in triggering alpha interferon and CC chemokine production in circulating plasmacytoid but not myeloid dendritic cells.* J Virol, 2005. **79**(19): p. 12597-12601.
413. Kapasi, A., P. Bhat, and P.C.J.I. Singhal, *Tubular cell and HIV-1 gp120 interaction products promote migration of monocytes.* Inflammation, 1998. **22**(2): p. 137-144.
414. Lehmann, M.H., et al., *HIV-1 Nef upregulates CCL2/MCP-1 expression in astrocytes in a myristoylation- and calmodulin-dependent manner.* J Cell Sci, 2006. **119**(21): p. 4520-4530.
415. Marini, E., et al., *HIV-1 matrix protein p17 binds to monocytes and selectively stimulates MCP-1 secretion: role of transcriptional factor AP-1.* Cell Microbiol, 2008. **10**(3): p. 655-666.
416. Khiati, A., et al., *Induction of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) gene expression by human immunodeficiency virus-1 Tat in human astrocytes is CDK9 dependent.* J Neurovirol, 2010. **16**(2): p. 150-167.
417. Conant, K., et al., *Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in HIV-1 Tat-stimulated astrocytes and elevation in AIDS dementia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3117-3121.
418. Lim, S.P. and A.J.J.o.v. Garzino-Demo, *The human immunodeficiency virus type 1 Tat protein up-regulates the promoter activity of the beta-chemokine monocyte chemoattractant protein 1 in the human astrocytoma cell line U-87 MG: role of SP-1, AP-1, and NF-κB consensus sites.* J Virol, 2000. **74**(4): p. 1632-1640.
419. Eugenin, E.A., et al., *HIV-1 tat protein induces a migratory phenotype in human fetal microglia by a CCL2 (MCP-1)-dependent mechanism: Possible role in NeuroAIDS.* Glia, 2005. **49**(4): p. 501-510.
420. Kelly, G.D., et al., *Purified Tat induces inflammatory response genes in Kaposi's sarcoma cells.* AIDS, 1998. **12**(14): p. 1753-1761.
421. Lee, Y.W., et al., *Estrogen-mediated protection against HIV Tat protein-induced inflammatory pathways in human vascular endothelial cells.* Cardiovasc Res, 2004. **63**(1): p. 139-148.

422. Park, I.-W., J.-F. Wang, and J.E.J.B. Groopman, *The Journal of the American Society of Hematology*, *HIV-1 Tat promotes monocyte chemoattractant protein-1 secretion followed by transmigration of monocytes*. *Blood*, 2001. **97**(2): p. 352-358.
423. Fantuzzi, L., et al., *HIV-1 gp120 stimulates the production of β -chemokines in human peripheral blood monocytes through a CD4-independent mechanism*. *J Immunol*, 2001. **166**(9): p. 5381-5387.
424. Weiss, J.M., et al., *HIV-1 Tat induces monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocyte transmigration across a model of the human blood-brain barrier and up-regulates CCR5 expression on human monocytes*. *J Immunol*, 1999. **163**(5): p. 2953-2959.
425. Bernasconi, S., et al., *Selective elevation of monocyte chemotactic protein-1 in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with cytomegalovirus encephalitis*. *J Infect Dis*, 1996. **174**(5): p. 1098-1100.
426. Cinque, P., et al., *Elevated cerebrospinal fluid levels of monocyte chemotactic protein-1 correlate with HIV-1 encephalitis and local viral replication*. *AIDS*, 1998. **12**(11): p. 1327-1332.
427. Chang, C.C., et al., *Chemokine levels and chemokine receptor expression in the blood and the cerebrospinal fluid of HIV-infected patients with cryptococcal meningitis and cryptococcosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome*. *J Infect Dis*, 2013. **208**(10): p. 1604-1612.
428. Joven, J., et al., *The influence of HIV infection on the correlation between plasma concentrations of monocyte chemoattractant protein-1 and carotid atherosclerosis*. *Clin Chim Acta*, 2006. **368**(1-2): p. 114-119.
429. Floris-Moore, M.A., et al., *Association of HIV viral load with monocyte chemoattractant protein-1 and atherosclerosis burden measured by magnetic resonance imaging*. *AIDS*, 2009. **23**(8): p. 941.
430. Kelder, W., et al., *β -Chemokines MCP-1 and RANTES are selectively increased in cerebrospinal fluid of patients with human immunodeficiency virus-associated dementia*. *Ann Neurol*, 1998. **44**(5): p. 831-835.
431. Yuan, L., et al., *Cytokines in CSF correlate with HIV-associated neurocognitive disorders in the post-HAART era in China*. *J Neurovirol*, 2013. **19**(2): p. 144-149.
432. Wang, S.X., et al., *Peripheral neuropathy in primary HIV infection associates with systemic and CNS immune activation*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2014. **66**(3): p. 303.
433. Weiss, L., et al., *Plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 but not those of macrophage inhibitory protein-1 α and RANTES correlate with virus load in human immunodeficiency virus infection*. *J Infect Dis*, 1997. **176**(6): p. 1621-1624.
434. Miller, T.L., et al., *Metabolic abnormalities and viral replication are associated with biomarkers of vascular dysfunction in HIV-infected children*. *HIV Med*, 2012. **13**(5): p. 264-275.
435. Mukura, L.R., et al., *Genital tract viral load in HIV type 1-positive women correlates with specific cytokine levels in cervical-vaginal secretions but is not a determinant of infectious virus or anti-HIV activity*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2012. **28**(11): p. 1533-1539.
436. Campbell, G.R. and S.A.J.J.o.B.C. Spector, *CCL2 increases X4-tropic HIV-1 entry into resting CD4+ T cells*. *Biol Chem*, 2008. **283**(45): p. 30745-30753.
437. Tersmette, M., et al., *Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex*. *J Virol*, 1988. **62**(6): p. 2026-2032.
438. Berger, E.A., et al., *A new classification for HIV-1*. *Nature*, 1998. **391**(6664): p. 240-240.
439. Richman, D.D. and S.A.J.J.o.I.D. Bozzette, *The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression*. *J Infect Dis*, 1994. **169**(5): p. 968-974.
440. Simmons, G., et al., *Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry*. *J Virol*, 1996. **70**(12): p. 8355-8360.

441. Berger, E.A., P.M. Murphy, and J.M.J.A.r.o.i. Farber, *Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease*. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**(1): p. 657-700.
442. Regoes, R.R. and S.J.T.i.m. Bonhoeffer, *The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective*. *Trends Microbiol*, 2005. **13**(6): p. 269-277.
443. Tersmette, M. and F.J.A. Miedema, *Interactions between HIV and the host immune system in the pathogenesis of AIDS*. *AIDS*, 1990. **4**(1): p. S67.
444. Miedema, F., M. Tersmette, and R.W.J.I.t. van Lier, *AIDS pathogenesis: a dynamic interaction between HIV and the immune system*. *Immunol Today*, 1990. **11**: p. 293-297.
445. Weinberger, A.D., A.S.J.M.b. Perelson, and e. MBE, *Persistence and emergence of X₄ virus in HIV infection*. *Math Biosci Eng*, 2011. **8**(2): p. 605.
446. Zhang, Z.-Q., et al., *Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD₄⁺ T cells*. *Science*, 1999. **286**(5443): p. 1353-1357.
447. Lee, B., et al., *Quantification of CD₄, CCR₅, and CXCR₄ levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(9): p. 5215-5220.
448. Bleul, C.C., et al., *The HIV coreceptors CXCR₄ and CCR₅ are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(5): p. 1925-1930.
449. Benito, J.M., et al., *Quantitative alterations of the functionally distinct subsets of CD₄ and CD8 T lymphocytes in asymptomatic HIV infection: changes in the expression of CD45RO, CD45RA, CD11b, CD38, HLA-DR, and CD25 antigens*. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1997. **14**(2): p. 128-135.
450. Freed, E.O., *HIV-1 replication*. *Somatic cell and molecular genetics*, 2001. **26**(1-6): p. 13-33.
451. Engelman, A. and P.J.N.R.M. Cherepanov, *The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights*. *Nat Rev Microbiol*, 2012. **10**(4): p. 279-290.
452. Moore, J.P. and R.W.J.P.o.t.N.A.o.S. Doms, *The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(19): p. 10598-10602.
453. Saphire, A.C., et al., *Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages*. *J Virol*, 2001. **75**(19): p. 9187-9200.
454. Arthos, J., et al., *HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin $\alpha 4 \beta 7$, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(3): p. 301-309.
455. Cicala, C., et al., *The integrin $\alpha 4 \beta 7$ forms a complex with cell-surface CD₄ and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(49): p. 20877-20882.
456. Geijtenbeek, T.B., et al., *DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells*. *Cell*, 2000. **100**(5): p. 587-597.
457. Clapham, P.R. and Á.J.J.o.G.V. McKnight, *Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses*. *J Gen Virol*, 2002. **83**(8): p. 1809-1829.
458. Sweet, R.W., A. Truneh, and W.A.J.C.o.i.b. Hendrickson, *CD₄: its structure, role in immune function and AIDS pathogenesis, and potential as a pharmacological target*. *Curr Opin Biotechnol*, 1991. **2**(4): p. 622-633.
459. Chen, B., et al., *Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core*. *Nature*, 2005. **433**(7028): p. 834-841.
460. Myszka, D.G., et al., *Energetics of the HIV gp120-CD₄ binding reaction*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(16): p. 9026-9031.
461. Clapham, P.R.J.T.i.c.b., *HIV and chemokines: ligands sharing cell-surface receptors*. *Trends Cell Biol*, 1997. **7**(7): p. 264-268.
462. Rizzuto, C., J.J.A.r. Sodroski, and h. retroviruses, *Fine definition of a conserved CCR₅-binding region on the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2000. **16**(8): p. 741-749.

463. Rizzuto, C.D., et al., *A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding*. Science, 1998. **280**(5371): p. 1949-1953.
464. Cormier, E.G. and T.J.J.o.v. Dragic, *The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor*. J Virol, 2002. **76**(17): p. 8953-8957.
465. Baribaud, F., et al., *Antigenically distinct conformations of CXCR4*. J Virol, 2001. **75**(19): p. 8957-8967.
466. Lee, B., et al., *Epitope mapping of CCR5 reveals multiple conformational states and distinct but overlapping structures involved in chemokine and coreceptor function*. J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9617-9626.
467. Lapham, C.K., et al., *Fusion of monocytes and macrophages with HIV-1 correlates with biochemical properties of CXCR4 and CCR5*. Nat Med, 1999. **5**(3): p. 303-308.
468. Wu, B., et al., *Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists*. Science, 2010. **330**(6007): p. 1066-1071.
469. Picard, L., et al., *Role of the amino-terminal extracellular domain of CXCR-4 in human immunodeficiency virus type 1 entry*. Virology, 1997. **231**(1): p. 105-111.
470. Brelot, A., et al., *Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities*. J Biol Chem, 2000. **275**(31): p. 23736-23744.
471. Brelot, A., et al., *Role of the first and third extracellular domains of CXCR-4 in human immunodeficiency virus coreceptor activity*. J Virol, 1997. **71**(6): p. 4744-4751.
472. Choi, W.-T., J.J.E.B. An, and Medicine, *Biology and clinical relevance of chemokines and chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in human diseases*. Exp Biol Med (Maywood), 2011. **236**(6): p. 637-647.
473. Wang, Z.-x., et al., *CXCR4 sequences involved in coreceptor determination of human immunodeficiency virus type-1 tropism: unmasking of activity with M-tropic Env glycoproteins*. J Biol Chem, 1998. **273**(24): p. 15007-15015.
474. Doranz, B.J., S.S. Baik, and R.W. Doms, *Use of a gp120 binding assay to dissect the requirements and kinetics of human immunodeficiency virus fusion events*. J Virol, 1999. **73**(12): p. 10346-58.
475. Wu, L., et al., *CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5*. Nature, 1996. **384**(6605): p. 179-183.
476. Babcock, G.J., et al., *Ligand binding characteristics of CXCR4 incorporated into paramagnetic proteoliposomes*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38433-38440.
477. Hoffman, T.L., et al., *A biosensor assay for studying ligand-membrane receptor interactions: binding of antibodies and HIV-1 Env to chemokine receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(21): p. 11215-20.
478. Shaik, M.M., et al., *Structural basis of coreceptor recognition by HIV-1 envelope spike*. Nature, 2019. **565**(7739): p. 318-323.
479. Rizzuto, C.D., et al., *A Conserved HIV gp120 Glycoprotein Structure Involved in Chemokine Receptor Binding*. Science, 1998. **280**(5371): p. 1949-1953.
480. Tan, Q., et al., *Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex*. Science, 2013. **341**(6152): p. 1387-1390.
481. Ozorowski, G., et al., *Open and closed structures reveal allostery and pliability in the HIV-1 envelope spike*. Nature, 2017. **547**(7663): p. 360-363.
482. Farzan, M., et al., *A tyrosine-rich region in the N terminus of CCR5 is important for human immunodeficiency virus type 1 entry and mediates an association between gp120 and CCR5*. J Virol, 1998. **72**(2): p. 1160-1164.
483. Trkola, A., et al., *CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5*. Nature, 1996. **384**(6605): p. 184-187.

484. Wu, L., et al., *CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5*. *Nature*, 1996. **384**(6605): p. 179-183.
485. Fouchier, R., et al., *Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule*. *J Virol*, 1992. **66**(5): p. 3183-3187.
486. Scarlatti, G., et al., *In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression*. *Nat Med*, 1997. **3**(11): p. 1259-1265.
487. De Jong, J., et al., *Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution*. *J Virol*, 1992. **66**(11): p. 6777-6780.
488. Shioda, T., J.A. Levy, and C.J.P.o.t.N.A.o.S. Cheng-Mayer, *Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1*. 1992. **89**(20): p. 9434-9438.
489. Delobel, P., et al., *Population-based sequencing of the V3 region of env for predicting the coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies*. *J Clin Microbiol*, 2007. **45**(5): p. 1572-1580.
490. Raymond, S., et al., *Improved V3 genotyping with duplicate PCR amplification for determining HIV-1 tropism*. *J Antimicrob Chemother*, 2011. **66**(9): p. 1972-1975.
491. Julien, J.-P., et al., *Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer*. *Science*, 2013. **342**(6165): p. 1477-1483.
492. Lee, J.H., G. Ozorowski, and A.B.J.S. Ward, *Cryo-EM structure of a native, fully glycosylated, cleaved HIV-1 envelope trimer*. *Science*, 2016. **351**(6277): p. 1043-1048.
493. Pancera, M., et al., *Structure and immune recognition of trimeric pre-fusion HIV-1 Env*. *Nature*, 2014. **514**(7523): p. 455-461.
494. Lyumkis, D., et al., *Cryo-EM structure of a fully glycosylated soluble cleaved HIV-1 envelope trimer*. *Science*, 2013. **342**(6165): p. 1484-1490.
495. Moore, J.P., et al., *Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4*. *Science*, 1990. **250**(4984): p. 1139-1142.
496. Chang, M.I., et al., *Single-molecule analysis of human immunodeficiency virus type 1 gp120-receptor interactions in living cells*. *J Virol*, 2005. **79**(23): p. 14748-14755.
497. Dobrowsky, T.M., et al., *Monitoring early fusion dynamics of human immunodeficiency virus type 1 at single-molecule resolution*. *J Virol*, 2008. **82**(14): p. 7022-7033.
498. Lehmann, M.J., et al., *Actin-and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells*. *J Cell Biol*, 2005. **170**(2): p. 317-325.
499. Sherer, N.M., J. Jin, and W.J.J.o.v. Mothes, *Directional spread of surface-associated retroviruses regulated by differential virus-cell interactions*. *J Virol*, 2010. **84**(7): p. 3248-3258.
500. Miyauchi, K., et al., *HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes*. *Cell*, 2009. **137**(3): p. 433-444.
501. Melikyan, G.B., et al., *Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion*. *J Cell Biol*, 2000. **151**(2): p. 413-424.
502. Melikyan, G.B.J.R., *Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm*. *Retrovirology*, 2008. **5**(1): p. 1-13.
503. Isel, C., et al., *Structural basis for the specificity of the initiation of HIV-1 reverse transcription*. *EMBO J*, 1999. **18**(4): p. 1038-1048.
504. Mamede, J.I., et al., *Early cytoplasmic uncoating is associated with infectivity of HIV-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. **114**(34): p. E7169-E7178.
505. Francis, A.C., et al., *Time-resolved imaging of single HIV-1 uncoating in vitro and in living cells*. *PLoS Pathog*, 2016. **12**(6): p. e1005709.

506. Hulme, A.E., O. Perez, and T.J.J.P.o.t.N.A.o.S. Hope, *Complementary assays reveal a relationship between HIV-1 uncoating and reverse transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(24): p. 9975-9980.
507. Francis, A.C., G.B.J.C.h. Melikyan, and microbe, *Single HIV-1 imaging reveals progression of infection through CA-dependent steps of docking at the nuclear pore, uncoating, and nuclear transport*. Cell Host Microbe, 2018. **23**(4): p. 536-548. e6.
508. Arhel, N.J., et al., *HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore*. EMBO J, 2007. **26**(12): p. 3025-3037.
509. Burdick, R.C., et al., *HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(10): p. 5486-5493.
510. Isel, C., et al., *Specific initiation and switch to elongation of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription require the post-transcriptional modifications of primer tRNA₃Lys*. EMBO J, 1996. **15**(4): p. 917-924.
511. Zennou, V., et al., *HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap*. Cell, 2000. **101**(2): p. 173-185.
512. Craigie, R. and F.D.J.C.S.H.p.i.m. Bushman, *Hiv dna integration*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(7): p. a006890.
513. Brady, T., et al., *HIV integration site distributions in resting and activated CD4+ T cells infected in culture*. AIDS, 2009. **23**(12): p. 1461.
514. Ciuffi, A. and F.D.J.T.i.G. Bushman, *Retroviral DNA integration: HIV and the role of LEDGF/p75*. Trends Genet, 2006. **22**(7): p. 388-395.
515. Karn, J. and C.M.J.C.S.H.p.i.m. Stoltzfus, *Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(2): p. a006916.
516. Kim, S., et al., *Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression*. J Virol, 1989. **63**(9): p. 3708-3713.
517. Rojas-Araya, B., T. Ohlmann, and R.J.V. Soto-Rifo, *Translational control of the HIV unspliced genomic RNA*. Viruses, 2015. **7**(8): p. 4326-4351.
518. Ganser-Pornillos, B.K., M. Yeager, and W.I.J.C.o.i.s.b. Sundquist, *The structural biology of HIV assembly*. Curr Opin Struct Biol, 2008. **18**(2): p. 203-217.
519. Benaroch, P., et al., *HIV-1 assembly in macrophages*. Retrovirology, 2010. **7**(1): p. 1-10.
520. Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, and M.J.T.J.o.c.b. Marsh, *Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages*. J Cell Biol, 2003. **162**(3): p. 443-455.
521. Jolly, C. and Q.J.J.J.o.v. Sattentau, *Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains*. J Virol, 2007. **81**(15): p. 7873-7884.
522. Carlson, L.-A., et al., *Three-dimensional analysis of budding sites and released virus suggests a revised model for HIV-1 morphogenesis*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(6): p. 592-599.
523. Pornillos, O., et al., *Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(11): p. 812-817.
524. Zhai, Q., et al., *Structural and functional studies of ALIX interactions with YPX n L late domains of HIV-1 and EIAV*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(1): p. 43-49.
525. Bouamr, F., et al., *PPPYEPTAP motif is the late domain of human T-cell leukemia virus type 1 Gag and mediates its functional interaction with cellular proteins Nedd4 and Tsg101*. J Virol, 2003. **77**(22): p. 11882-11895.
526. Wollert, T., et al., *Membrane scission by the ESCRT-III complex*. Nature, 2009. **458**(7235): p. 172-177.
527. Freed, E.O.J.N.R.M., *HIV-1 assembly, release and maturation*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(8): p. 484-496.

528. Ganser-Pornillos, B., M. Yeager, and O. Pornillos, *Assembly and architecture of HIV*. *Adv Exp Med Biol* 726: 441-465. 2012, Adv Exp Med Biol.
529. Wieggers, K., et al., *Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites*. *J Virol*, 1998. **72**(4): p. 2846-2854.
530. Pettit, S.C., et al., *The regulation of sequential processing of HIV-1 Gag by the viral protease*, in *Aspartic Proteinases*, A.E.M. Biol, Editor. 1998, Springer. p. 15-25.
531. Sundquist, W.I. and H.-G.J.C.S.H.p.i.m. Kräusslich, *HIV-1 assembly, budding, and maturation*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(7): p. a006924.
532. Ariën, K.K., et al., *The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates*. *J Virol*, 2005. **79**(14): p. 8979-8990.
533. Troyer, R.M., et al., *Variable fitness impact of HIV-1 escape mutations to cytotoxic T lymphocyte (CTL) response*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(4): p. e1000365.
534. Burke, D.S.J.E.i.d., *Recombination in HIV: an important viral evolutionary strategy*. *Emerg Infect Dis*, 1997. **3**(3): p. 253.
535. Plantier, J.-C., et al., *A new human immunodeficiency virus derived from gorillas*. *Nat Med*, 2009. **15**(8): p. 871-872.
536. Vallari, A., et al., *Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon*. *J Virol*, 2011. **85**(3): p. 1403-1407.
537. Perrin, L., L. Kaiser, and S.J.T.L.i.d. Yerly, *Travel and the spread of HIV-1 genetic variants*. *Lancet Infect Dis*, 2003. **3**(1): p. 22-27.
538. Nerrienet, E., et al., *Simian immunodeficiency virus infection in wild-caught chimpanzees from Cameroon*. *J Virol*, 2005. **79**(2): p. 1312-1319.
539. Keele, B.F., et al., *Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1*. *Science*, 2006. **313**(5786): p. 523-526.
540. Nerrienet, E., et al., *Simian immunodeficiency virus infection in wild-caught chimpanzees from Cameroon*. 2005. **79**(2): p. 1312-1319.
541. Van Heuverswyn, F., et al., *SIV infection in wild gorillas*. *Nature*, 2006. **444**(7116): p. 164-164.
542. Worobey, M., et al., *Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960*. *Nature*, 2008. **455**(7213): p. 661-664.
543. Korber, B., et al., *Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains*. *Science*, 2000. **288**(5472): p. 1789-1796.
544. Wertheim, J.O. and M.J.P.C.B. Worobey, *Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2*. *PLoS Comput Biol*, 2009. **5**(5): p. e1000377.
545. Ariën, K.K., G. Vanham, and E.J.J.N.R.M. Arts, *Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans?* *Nat Rev Microbiol*, 2007. **5**(2): p. 141-151.
546. Lau, K.A., B. Wang, and N.K.J.A.R. Saksena, *Emerging trends of HIV epidemiology in Asia*. *AIDS Rev*, 2007. **9**(4): p. 218-29.
547. Roberts, J.D., K. Bebenek, and T.A.J.S. Kunkel, *The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1*. *Science*, 1988. **242**(4882): p. 1171-1173.
548. De Clercq, E.J.C.o.i.p., *Antiretroviral drugs*. *Curr Opin Pharmacol*, 2010. **10**(5): p. 507-515.
549. Wei, X., et al., *Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection*. *Nature*, 1995. **373**(6510): p. 117-122.
550. Hu, W.-S. and H.M.J.S. Temin, *Retroviral recombination and reverse transcription*. *Science*, 1990. **250**(4985): p. 1227-1233.
551. Moutouh, L., J. Corbeil, and D.D.J.P.o.t.N.A.o.S. Richman, *Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(12): p. 6106-6111.

552. Kellam, P. and B.A.J.J.o.v. Larder, *Retroviral recombination can lead to linkage of reverse transcriptase mutations that confer increased zidovudine resistance*. J Virol, 1995. **69**(2): p. 669-674.
553. Hemelaar, J., et al., *Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis*. Lancet Infect Dis, 2019. **19**(2): p. 143-155.
554. Martínez-Cajas, J.L., et al., *Role of genetic diversity amongst HIV-1 non-B subtypes in drug resistance: a systematic review of virologic and biochemical evidence*. AIDS Rev, 2008. **10**(4): p. 212-223.
555. Wainberg, M.A., G.J. Zaharatos, and B.G.J.N.E.J.o.M. Brenner, *Development of antiretroviral drug resistance*. N Engl J Med, 2011. **365**(7): p. 637-646.
556. Marcelin, A.-G., et al., *Tipranavir-ritonavir genotypic resistance score in protease inhibitor-experienced patients*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(9): p. 3237-3243.
557. Miller, M.D., et al., *K65R development among subtype C HIV-1-infected patients in tenofovir DF clinical trials*. AIDS, 2007. **21**(2): p. 265-266.
558. Abecasis, A.B., et al., *Protease mutation M89I/V is linked to therapy failure in patients infected with the HIV-1 non-B subtypes C, F or G*. AIDS, 2005. **19**(16): p. 1799-1806.
559. Kinomoto, M., et al., *HIV-1 proteases from drug-naïve West African patients are differentially less susceptible to protease inhibitors*. Clin Infect Dis, 2005. **41**(2): p. 243-251.
560. Atlas, A., et al., *Impact of HIV type 1 genetic subtype on the outcome of antiretroviral therapy*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2005. **21**(3): p. 221-227.
561. Bocket, L., et al., *Impact of human immunodeficiency virus type 1 subtype on first-line antiretroviral therapy effectiveness*. Antivir Ther, 2005. **10**(2): p. 247-54.
562. Frater, A.J., et al., *Comparative response of African HIV-1-infected individuals to highly active antiretroviral therapy*. AIDS, 2002. **16**(8): p. 1139-1146.
563. De Wit, S., et al., *Viral load and CD4 cell response to protease inhibitor-containing regimens in subtype B versus non-B treatment-naïve HIV-1 patients*. AIDS, 2004. **18**(17): p. 2330-2331.
564. Laurent, C., et al., *Effectiveness and safety of a generic fixed-dose combination of nevirapine, stavudine, and lamivudine in HIV-1-infected adults in Cameroon: open-label multicentre trial*. Lancet, 2004. **364**(9428): p. 29-34.
565. Kabugo, C., et al., *Long-term experience providing antiretroviral drugs in a fee-for-service HIV clinic in Uganda: evidence of extended virologic and CD4+ cell count responses*. Acquir Immune Defic Syndr, 2005. **38**(5): p. 578-583.
566. Laurent, C., et al., *Long-term benefits of highly active antiretroviral therapy in Senegalese HIV-1-infected adults*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2005. **38**(1): p. 14-17.
567. Baeten, J.M., et al., *HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads*. J Infect Dis, 2007. **195**(8): p. 1177-1180.
568. Kaleebu, P., et al., *Relationship between HIV-1 Env subtypes A and D and disease progression in a rural Ugandan cohort*. AIDS, 2001. **15**(3): p. 293-299.
569. Kaleebu, P., et al., *Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1–positive persons in Uganda*. J Infect Dis, 2002. **185**(9): p. 1244-1250.
570. Kanki, P.J., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression*. Virology, 1999. **179**(1): p. 68-73.
571. Kiwanuka, N., et al., *Effect of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection*. J Infect Dis, 2008. **197**(5): p. 707-13.
572. Vasan, A., et al., *Different rates of disease progression of HIV type 1 infection in Tanzania based on infecting subtype*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(6): p. 843-852.

573. Easterbrook, P.J., et al., *Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy*. J Int AIDS Soc, 2010. **13**(1): p. 1-9.
574. Sacktor, N., et al., *HIV subtype D is associated with dementia, compared with subtype A, in immunosuppressed individuals at risk of cognitive impairment in Kampala, Uganda*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(5): p. 780-786.
575. Touloumi, G., et al., *Impact of HIV-1 subtype on CD4 count at HIV seroconversion, rate of decline, and viral load set point in European seroconverter cohorts*. Clin Infect Dis, 2013. **56**(6): p. 888-897.
576. Kiwanuka, N., et al., *HIV-1 subtypes and differences in heterosexual HIV transmission among HIV-discordant couples in Rakai, Uganda*. AIDS, 2009. **23**(18): p. 2479.
577. Ahuja, S.K., et al., *CCL3L1-CCR5 genotype influences durability of immune recovery during antiretroviral therapy of HIV-1-infected individuals*. Nat Med, 2008. **14**(4): p. 413-420.
578. Johnston, M.I. and A.S.J.N.E.J.o.M. Fauci, *An HIV vaccine—evolving concepts*. N Engl J Med, 2007. **356**(20): p. 2073-2081.
579. Goulder, P.J., et al., *Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 334-338.
580. Kwong, P.D., et al., *HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites*. Nature, 2002. **420**(6916): p. 678-682.
581. Flynn, N., D. Forthal, and C.J. Harro, *Placebocontrolled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection*. J Infect Dis, 2005. **191**: p. 654-65.
582. Pitisuttithum, P., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand*. J Infect Dis, 2006. **194**(12): p. 1661-1671.
583. Buchbinder, S.P., et al., *Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial*. Lancet, 2008. **372**(9653): p. 1881-1893.
584. O'Brien, K.L., et al., *Adenovirus-specific immunity after immunization with an Ad5 HIV-1 vaccine candidate in humans*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 873-875.
585. McElrath, M.J., et al., *HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis*. Lancet, 2008. **372**(9653): p. 1894-1905.
586. Rerks-Ngarm, S., et al., *Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand*. N Engl J Med, 2009. **361**(23): p. 2209-2220.
587. de Souza, M.S., et al., *The Thai phase III trial (RV144) vaccine regimen induces T cell responses that preferentially target epitopes within the V2 region of HIV-1 envelope*. J Immunol, 2012. **188**(10): p. 5166-5176.
588. Royce, R.A., et al., *Sexual transmission of HIV*. N Engl J Med 1997. **336**(15): p. 1072-1078.
589. Fox, J. and S.J.A.r. Fidler, *Sexual transmission of HIV-1*. Antiviral Res, 2010. **85**(1): p. 276-285.
590. Nicolosi, A., et al., *The efficiency of male-to-female and female-to-male sexual transmission of the human immunodeficiency virus: a study of 730 stable couples*. Epidemiology, 1994: p. 570-575.
591. El-Sadr, W.M., K.H. Mayer, and S.L.J.T.N.E.j.o.m. Hodder, *AIDS in America—forgotten but not gone*. N Engl J Med, 2010. **362**(11): p. 967.
592. Boily, M.-C., et al., *Heterosexual risk of HIV-1 infection per sexual act: systematic review and meta-analysis of observational studies*. Lancet Infect Dis, 2009. **9**(2): p. 118-129.
593. Powers, K.A., et al., *Rethinking the heterosexual infectivity of HIV-1: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Infect Dis, 2008. **8**(9): p. 553-563.
594. Fideli, Ü.S., et al., *Virologic and immunologic determinants of heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 in Africa*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2001. **17**(10): p. 901-910.
595. Miller, W.C., et al., *The role of acute and early HIV infection in the sexual transmission of HIV*. Curr Opin HIV AIDS, 2010. **5**(4): p. 277.

596. Galvin, S.R. and M.S.J.N.R.M. Cohen, *The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(1): p. 33-42.
597. Mugo, N.R., et al., *Increased risk of HIV-1 transmission in pregnancy: a prospective study among African HIV-1 serodiscordant couples*. AIDS, 2011. **25**(15): p. 1887.
598. Auvert, B., et al., *Randomized, controlled intervention trial of male circumcision for reduction of HIV infection risk: the ANRS 1265 Trial*. PLoS Med, 2005. **2**(11): p. e298.
599. Bailey, R.C., et al., *Male circumcision for HIV prevention in young men in Kisumu, Kenya: a randomised controlled trial*. Lancet, 2007. **369**(9562): p. 643-656.
600. Gray, R.H., et al., *Male circumcision for HIV prevention in men in Rakai, Uganda: a randomised trial*. Lancet, 2007. **369**(9562): p. 657-666.
601. Quinn, T.C.J.C.o.i.d., *Circumcision and HIV transmission*. Curr Opin Infect Dis, 2007. **20**(1): p. 33-38.
602. Olapade-Olaopa, E.O., M.A. Salami, and T.A.J.A.J.o.U. Lawal, *Male circumcision and global HIV/AIDS epidemic challenges*. 2019. **25**(1): p. 1-7.
603. Fauci, A.S., et al., *Immunopathogenic mechanisms of HIV infection*. Ann Intern Med, 1996. **124**(7): p. 654-663.
604. Cohen, M.S., et al., *Acute HIV-1 infection*. N Engl J Med, 2011. **364**(20): p. 1943-1954.
605. Quinn, T.C.J.J., *Acute primary HIV infection*. JAMA, 1997. **278**(1): p. 58-62.
606. Pantaleo, G., et al., *HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease*. Nature, 1993. **362**(6418): p. 355-358.
607. Touloumi, G. and A.J.C.i.d. Hatzakis, *Natural history of HIV-1 infection*. Clin Dermatol, 2000. **18**(4): p. 389-399.
608. Knipe, D. and P. Howley, *Fields virology 5 th edition*. 2007, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
609. Deeks, S.G., et al., *HIV infection*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**(1): p. 1-22.
610. Garrait, V. and J.J.R.d.p. Molina, *Infection par le VIH*. 2000. **50**(9): p. 1003-1010.
611. Organization, W.H., *WHO case definitions of HIV for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children*. 2007: World Health Organization.
612. To, S.W.-C., J.H.-K. Chen, and W.-C.J.F.V. Yam, *Current assays for HIV-1 diagnostics and antiretroviral therapy monitoring: challenges and possibilities*. 2013. **8**(4): p. 405-419.
613. Ananworanich, J., et al., *A novel acute HIV infection staging system based on 4 th generation immunoassay*. Retrovirology, 2013. **10**(1): p. 1-6.
614. Fiebig, E.W., et al., *Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection*. AIDS, 2003. **17**(13): p. 1871-1879.
615. Tavakoli, A., et al., *Current diagnostic methods for HIV*. FUTURE VIROLOGY, 2017. **12**(3): p. 141-155.
616. Hecht, F.M., et al., *HIV RNA level in early infection is predicted by viral load in the transmission source*. AIDS, 2010. **24**(7): p. 941.
617. Mei, Y., L. Wang, and S.J.S.i.m. Holte, *A comparison of methods for determining HIV viral set point*. Stat Med, 2008. **27**(1): p. 121-139.
618. Tomaras, G.D., et al., *Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia*. J Virol, 2008. **82**(24): p. 12449-12463.
619. Mitchell, E.O., et al., *Performance comparison of the 4th generation bio-rad laboratories GS HIV combo Ag/Ab EIA on the EVOLIS™ automated system versus Abbott ARCHITECT HIV Ag/Ab combo, Ortho anti-HIV 1+ 2 EIA on Vitros ECi and Siemens HIV-1/O/2 enhanced on Advia centaur*. J Clin Virol, 2013. **58**: p. e79-e84.

620. Hocini, H. and L.J.R.F.d.l. Andreoletti, *Méthodes d'analyse et de suivi de l'infection par les virus de l'immunodéficience humaine. Évolutions récentes en microbiologie*, 2009. **2009**(417): p. 39-48.
621. Blood, G.A.C.J.T.M. and Hemotherapy, *Human immunodeficiency virus (HIV)*. Transfus Med Hemother, 2016. **43**(3): p. 203.
622. Baliga, C.S., et al., *HIV infection and acquired immunodeficiency syndrome*, in *Clinical Immunology*. 2008, Elsevier. p. 561-584.
623. Urdea, M.S., et al., *Direct and quantitative detection of HIV-1 RNA in human plasma with a branched DNA signal amplification assay*. AIDS, 1993. **7**: p. S11-4.
624. Yeni, P.J.M.-S., *Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH. Recommandations du groupe d'experts.: Flammarion*. 2006.
625. Belan, A.G., et al., *Suivi biologique de l'infection à VIH chez l'adulte*. Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, 2008. **23**(2): p. 95-102.
626. Yamashita, T.E., et al., *Immunologic and virologic response to highly active antiretroviral therapy in the Multicenter AIDS Cohort Study*. AIDS, 2001. **15**(6): p. 735-746.
627. Moore, R.D., et al., *An improvement in virologic response to highly active antiretroviral therapy in clinical practice from 1996 through 2002*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2005. **39**(2): p. 195-198.
628. García, F., et al., *Long-term CD4+ T-cell response to highly active antiretroviral therapy according to baseline CD4+ T-cell count*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2004. **36**(2): p. 702-713.
629. Patel, P.H. and H.J.S. Zulfiqar, *Reverse transcriptase inhibitors*. Treasure Island, 2020.
630. Arts, E.J. and D.J.J.C.S.H.p.i.m. Hazuda, *HIV-1 antiretroviral drug therapy*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(4): p. a007161.
631. Verma, A.S., et al., *HIV: biology to treatment*, in *NanoBioMedicine*, NanoBioMedicine, Editor. 2020, Springer. p. 167-197.
632. Saag, M.S., et al., *Antiretroviral drugs for treatment and prevention of HIV infection in adults: 2018 recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel*. JAMA, 2018. **320**(4): p. 379-396.
633. Kondru, R., et al., *Molecular interactions of CCR5 with major classes of small-molecule anti-HIV CCR5 antagonists*. Mol Pharmacol, 2008. **73**(3): p. 789-800.
634. Paxton, W.A., et al., *Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposures*. Nat Med, 1996. **2**(4): p. 412-417.
635. Pantaleo, G. and A.J.A.r.o.m. Fauci, *Immunopathogenesis of HIV infection*. Annu Rev Microbiol, 1996. **50**(1): p. 825-854.
636. Deacon, N., et al., *Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients*. Science, 1995. **270**(5238): p. 988-991.
637. Daar, E.S., et al., *Baseline HIV type 1 coreceptor tropism predicts disease progression*. Clin Infect Dis, 2007. **45**(5): p. 643-649.
638. Koot, M., et al., *Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS*. Ann Intern Med, 1993. **118**(9): p. 681-688.
639. Pai, N.P., S. Shivkumar, and J.M.J.J.J.o.A.I.D.S. Cajas, *Does Genetic Diversity of HIV-1 Non-B Subtypes Differentially Impact Disease Progression in Treatment-Naive HIV-1-Infected Individuals? A Systematic Review of Evidence: 1996-2010*. Acquir Immune Defic Syndr, 2012. **59**(4): p. 382-388.
640. Hodcroft, E., et al., *The contribution of viral genotype to plasma viral set-point in HIV infection*. PLoS Pathog, 2014. **10**(5): p. e1004112.
641. Bartha, I., et al., *Estimating the Respective Contributions of Human and Viral Genetic Variation to HIV Control*. PLOS Computational Biology, 2017. **13**(2): p. e1005339.

642. Bertels, F., et al., *Dissecting HIV virulence: heritability of setpoint viral load, CD4+ T-cell decline, and per-parasite pathogenicity*. *Mol Biol Evol*, 2018. **35**(1): p. 27-37.
643. Polgreen, P.M., et al., *GB virus type C/hepatitis G virus: a non-pathogenic flavivirus associated with prolonged survival in HIV-infected individuals*. *Microbes Infect*, 2003. **5**(13): p. 1255-1261.
644. Williams, C.F., et al., *Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(10): p. 981-990.
645. Xiang, J., et al., *Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(10): p. 707-714.
646. Yeo, A.E., et al., *Effect of hepatitis G virus infection on progression of HIV infection in patients with hemophilia*. *Ann Intern Med*, 2000. **132**(12): p. 959-963.
647. Xiang, J., et al., *Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , and SDF-1*. 2004. **363**(9426): p. 2040-2046.
648. Mummidi, S., et al., *The human CC chemokine receptor 5 (CCR5) gene: multiple transcripts with 5'-end heterogeneity, dual promoter usage, and evidence for polymorphisms within the regulatory regions and noncoding exons*. *Biol Chem*, 1997. **272**(49): p. 30662-30671.
649. Maho, A., et al., *Mapping of the CCXCR1, CX3CR1, CCBP2 and CCR9 genes to the CCR cluster within the 3p21.3 region of the human genome*. *Cytogenet Cell Genet*, 1999. **87**(3-4): p. 265-268.
650. Mummidi, S., et al., *Production of specific mRNA transcripts, usage of an alternate promoter, and octamer-binding transcription factors influence the surface expression levels of the HIV coreceptor CCR5 on primary T cells*. *J Immunol*, 2007. **178**(9): p. 5668-5681.
651. Barmania, F., M.S.J.A. Pepper, and t. genomics, *CC chemokine receptor type five (CCR5): an emerging target for the control of HIV infection*. *Appl Transl Genom*, 2013. **2**: p. 3-16.
652. Samson, M., et al., *Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene*. *Nature*, 1996. **382**(6593): p. 722-725.
653. Liu, R., et al., *Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection*. 1996. **86**(3): p. 367-377.
654. Rana, S., et al., *Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the delta ccr5 mutation*. *J Virol*, 1997. **71**(4): p. 3219-3227.
655. Psomas, K., P. Corbeau, and J.J.A. Reynes, *Antagonistes du récepteur CCR5 et infection par le VIH-1: bases et conséquences de cette approche thérapeutique*. *Antibiotiques (Paris)*, 2010. **12**(1): p. 27-41.
656. Liu, R., et al., *Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection*. *Cell*, 1996. **86**(3): p. 367-377.
657. Dean, M., et al., *Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene*. *Science*, 1996. **273**(5283): p. 1856-1862.
658. Kupfer, B., et al., *Protection against parenteral HIV-1 infection by homozygous deletion in the CC chemokine receptor 5 gene*. *AIDS*, 1999. **13**(9): p. 1025-1028.
659. Balotta, C., et al., *Homozygous $\Delta 32$ deletion of the CCR-5 chemokine receptor gene in an HIV-1-infected patient*. *AIDS*, 1997. **11**(10): p. F67-F71.
660. Meyer, L., et al., *HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR5 $\Delta 32$* . 1997. **9060**(349): p. 1219-1220.
661. O'Brien, T.R., et al., *HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5 $\Delta 32$* . *Lancet*, 1997. **349**(9060): p. 1219.
662. Biti, R., et al., *HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele*. *Nat Med*, 1997. **3**(3): p. 252-253.
663. Heiken, H., et al., *HIV-1 infection in a heterosexual man homozygous for CCR-5 $\Delta 32$* . *AIDS*, 1999. **13**(4): p. 529.

664. Michael, N.L., et al., *Exclusive and persistent use of the entry coreceptor CXCR4 by human immunodeficiency virus type 1 from a subject homozygous for CCR5 Δ32*. J Virol, 1998. **72**(7): p. 6040-6047.
665. Sheppard, H.W., et al., *HIV-1 infection in individuals with the CCR5-Delta32/Delta32 genotype: acquisition of syncytium-inducing virus at seroconversion*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2002. **29**(3): p. 307-313.
666. Kuipers, H., et al., *An HIV-1-infected individual homozygous for the CCR-5 D32 allele and the SDF-1 3¢ A allele*. AIDS, 1999. **13**(3): p. 433.
667. Ballana, E., et al., *HLA class I protective alleles in an HIV-1-infected subject homozygous for CCR5-Δ32/Δ32*. Immunobiology, 2013. **218**(4): p. 543-547.
668. Smoleń-Dzirba, J., et al., *HIV-1 infection in persons homozygous for CCR5-Δ32 allele: the next case and the review*. AIDS Rev, 2017. **19**(4): p. 219-230.
669. Margolis, L. and R.J.N.R.M. Shattock, *Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the 'gatekeeper' problem resolved?* Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(4): p. 312-317.
670. Agrawal, L., et al., *CCR5Δ32 protein expression and stability are critical for resistance to human immunodeficiency virus type 1 in vivo*. J Virol, 2007. **81**(15): p. 8041-8049.
671. Jin, Q., et al., *CCR5Δ32 59537-G/A promoter polymorphism is associated with low translational efficiency and the loss of CCR5Δ32 protective effects*. J Virol, 2008. **82**(5): p. 2418-2426.
672. Huang, Y., et al., *The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression*. Nat Med, 1996. **2**(11): p. 1240-1243.
673. Zimmerman, P.A., et al., *Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk*. Mol Med, 1997. **3**(1): p. 23-36.
674. Michael, N.L., et al., *The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression*. Nat Med, 1997. **3**(3): p. 338-340.
675. Hendel, H., et al., *Distinctive effects of CCR5, CCR2, and SDF1 genetic polymorphisms in AIDS progression*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1998. **19**(4): p. 381-386.
676. Balfe, P., et al., *Association between a defective CCR-5 gene and progression to disease in HIV infection*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1998. **14**(14): p. 1229-1234.
677. Stewart, G.J., et al., *Increased frequency of CCR-5 Δ32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection*. AIDS, 1997. **11**(15): p. 1833-1838.
678. Mummidi, S., et al., *Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression*. Nat Med, 1998. **4**(7): p. 786-793.
679. Pasi, K., et al., *The effects of the 32-bp CCR-5 deletion on HIV transmission and HIV disease progression in individuals with haemophilia*. Br J Haematol, 2000. **111**(1): p. 136-142.
680. Marmor, M., et al., *Homozygous and Heterozygous CCR5-Δ32 Genotypes Are Associated With Resistance to HIV Infection*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2001. **27**(5): p. 472-481.
681. Eskild, A., et al., *The estimated impact of the CCR-5 Δ32 gene deletion on HIV disease progression varies with study design*. AIDS, 1998. **12**(17): p. 2271-2247.
682. Wilkinson, D.A., et al., *A 32-bp deletion within the CCR5 locus protects against transmission of parenterally acquired human immunodeficiency virus but does not affect progression to AIDS-defining illness*. J Infect Dis, 1998. **178**(4): p. 1163-1166.
683. Schinkel, J., et al., *No evidence for an effect of the CCR5 Δ32/+ and CCR2b 64I/+ mutations on human immunodeficiency virus (HIV)-1 disease progression among HIV-1-infected injecting drug users*. J Infect Dis, 1999. **179**(4): p. 825-831.
684. Hoffman, T.L., et al., *CCR5 genotypes in sexually active couples discordant for human immunodeficiency virus type 1 infection status*. J Infect Dis, 1997. **176**(4): p. 1093-1096.

685. Rabkin, C.S., et al., *Chemokine and chemokine receptor gene variants and risk of non-Hodgkin's lymphoma in human immunodeficiency virus-1-infected individuals*. *Blood*, 1999. **93**(6): p. 1838-1842.
686. Dean, M., et al., *Reduced risk of AIDS lymphoma in individuals heterozygous for the CCR5-Δ32 mutation*. *Cancer Res*, 1999. **59**(15): p. 3561-3564.
687. van Rij, R.P., et al., *Reduced prevalence of the CCR5 delta32 heterozygous genotype in human immunodeficiency virus-infected individuals with AIDS dementia complex*. *J Infect Dis*, 1999. **180**(3): p. 854-7.
688. Springael, J.-Y., et al., *Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005. **16**(6): p. 611-623.
689. Benkirane, M., et al., *Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5Δ32*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(49): p. 30603-30606.
690. Libert, F., et al., *The Δ CCR5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe*. *Hum Mol Genet*, 1998. **7**(3): p. 399-406.
691. Lucotte, G. and G. Mercier, *Distribution of the CCR5 gene 32-bp deletion in Europe*. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1998. **19**(2): p. 174-177.
692. Papa, A., et al., *HIV-1 co-receptor CCR5 and CCR2 mutations among Greeks*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000. **28**(1): p. 87-89.
693. Kalev, I., et al., *High frequency of the HIV-1 protective CCR5 Δ32 deletion in native Estonians*. *Eur J Epidemiol*, 2000. **16**(12): p. 1107-1109.
694. Lu, Y., et al., *Genotype and allele frequency of a 32-base pair deletion mutation in the CCR5 gene in various ethnic groups: absence of mutation among Asians and Pacific Islanders*. *Int J Infect Dis*, 1999. **3**(4): p. 186-191.
695. Stephens, J.C., et al., *Dating the origin of the CCR5-Δ32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes*. *Am J Hum Genet*, 1998. **62**(6): p. 1507-1515.
696. Blanpain, C., et al., *Multiple nonfunctional alleles of CCR5 are frequent in various human populations*. *Blood*, 2000. **96**(5): p. 1638-1645.
697. Ansari-Lari, M.A., et al., *The extent of genetic variation in the CCR5 gene*. *Nat Genet*, 1997. **16**(3): p. 221-222.
698. Carrington, M., et al., *Genetics of HIV-1 infection: chemokine receptor CCR5 polymorphism and its consequences*. *Hum Mol Genet*, 1999. **8**(10): p. 1939-1945.
699. Howard, O.Z., et al., *Naturally occurring CCR5 extracellular and transmembrane domain variants affect HIV-1 Co-receptor and ligand binding function*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(23): p. 16228-16234.
700. Carrington, M., et al., *Novel alleles of the chemokine-receptor gene CCR5*. *Am J Hum Genet*, 1997. **61**(6): p. 1261-1267.
701. Quillent, C., et al., *HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene*. *Lancet*, 1998. **351**(9095): p. 14-18.
702. Magierowska, M., et al., *Novel variant of the CCR5 gene in a Vietnamese population*. *Microbes Infect*, 1999. **1**(2): p. 123-124.
703. Capoulade-Métay, C., et al., *New CCR5 variants associated with reduced HIV coreceptor function in southeast Asia*. *AIDS*, 2004. **18**(17): p. 2243-2252.
704. Zhao, X.-Y., et al., *Functional analysis of naturally occurring mutations in the open reading frame of CCR5 in HIV-infected Chinese patients and healthy controls*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2005. **38**(5): p. 509-517.
705. Martin, M.P., et al., *Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5*. *Science*, 1998. **282**(5395): p. 1907-1911.
706. McDermott, D.H., et al., *CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression*. *Lancet*, 1998. **352**(9131): p. 866-870.

707. Shieh, B., et al., *Influence of nucleotide polymorphisms in the CCR2 gene and the CCR5 promoter on the expression of cell surface CCR5 and CXCR4*. *Int Immunol*, 2000. **12**(9): p. 1311-1318.
708. De Souza, P., et al., *CCR5 promoter polymorphisms and HIV-1 perinatal transmission in Brazilian children*. *J Reprod Immunol*, 2006. **69**(1): p. 77-84.
709. Bream, J.H.J.S., *Promoter Alleles and Specific DNA Binding Factors CCR5*. *Science*, 1999. **284**: p. 223a-223.
710. Smith, M.W., et al., *Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression*. *Science*, 1997. **277**(5328): p. 959-965.
711. Carrington, M., G. Nelson, and S.J.J.I.I. O'Brien, *Considering genetic profiles in functional studies of immune responsiveness to HIV-1*. *Immunol Lett*, 2001. **79**(1-2): p. 131-140.
712. Ding, D.-L., S.-J. Liu, and H.-Z.J.M.m.r. Zhu, *Association between the CCR2-Val64Ile polymorphism and susceptibility to HIV-1 infection: a meta-analysis*. *Mol Med Rep*, 2011. **4**(1): p. 181-186.
713. Hladik, F., et al., *Combined effect of CCR5-Δ32 heterozygosity and the CCR5 promoter polymorphism– 2459 A/G on CCR5 expression and resistance to human immunodeficiency virus type 1 transmission*. *J Virol*, 2005. **79**(18): p. 11677-11684.
714. Zapata, W., et al., *Influence of CCR5 and CCR2 genetic variants in the resistance/susceptibility to HIV in serodiscordant couples from Colombia*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2013. **29**(12): p. 1594-1603.
715. Rizzardì, G.P., et al., *CCR2 polymorphism and HIV disease*. *Nat Med*, 1998. **4**(3): p. 252-253.
716. Easterbrook, P.J., et al., *Chemokine receptor polymorphisms and human immunodeficiency virus disease progression*. *J Infect Dis*, 1999. **180**(4): p. 1096-1105.
717. Ammaranond, P., et al., *Impact of CCR2 and SDF1 Polymorphisms on Disease Progression in HIV-Infected Subjects in Thailand*. *J Clin Lab Anal*, 2013. **27**(1): p. 38-44.
718. Magierowska, M., et al., *Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals*. *Blood*, 1999. **93**(3): p. 936-941.
719. Michael, N.L., et al., *The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression*. *Nat Med*, 1997. **3**(10): p. 1160-1162.
720. Ioannidis, J.P., et al., *Effects of CCR5-Δ 32, CCR2-64I, and SDF-1 3' A alleles on HIV-1 disease progression: an international meta-analysis of individual-patient data*. *Ann Intern Med*, 2001. **135**(9): p. 782-795.
721. Lee, B., et al., *Influence of the CCR2-V64I polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 coreceptor activity and on chemokine receptor function of CCR2b, CCR3, CCR5, and CXCR4*. *J Virol*, 1998. **72**(9): p. 7450-7458.
722. Gupta, S.K. and K. Pillarisetti, *Cutting edge: CXCR4-Lo: molecular cloning and functional expression of a novel human CXCR4 splice variant*. *J Immunol*, 1999. **163**(5): p. 2368-72.
723. Cohen, O.J., et al., *CXCR4 and CCR5 genetic polymorphisms in long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection: lack of association with mutations other than CCR5-Δ32*. *J Virol*, 1998. **72**(7): p. 6215-6217.
724. Alvarez, V., C. López-Larrea, and E.J.H.g. Coto, *Mutational analysis of the CCR5 and CXCR4 genes (HIV-1 co-receptors) in resistance to HIV-1 infection and AIDS development among intravenous drug users*. *Hum Genet*, 1998. **102**(4): p. 483-486.
725. Martin, M.P., et al., *CXCR4 polymorphisms and HIV-1 pathogenesis*. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1998. **19**(4): p. 430.
726. Hernandez, P.A., et al., *Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease*. *Nat Genet*, 2003. **34**(1): p. 70-74.

727. Combadiere, C., et al., *Identification of CX₃CR₁: A CHEMOTACTIC RECEPTOR FOR THE HUMAN CX₃CHEMOKINE FRACTALKINE AND A FUSION CORECEPTOR FOR HIV-1*. J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 23799-23804.
728. Faure, S., et al., *Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX₃CR₁*. Science, 2000. **287**(5461): p. 2274-2277.
729. McDermott, D.H., et al., *Genetic polymorphism in CX₃CR₁ and risk of HIV disease*. Science, 2000. **290**(5499): p. 2031.
730. Tremblay, K., et al., *Association study between the CX₃CR₁ gene and asthma*. Genes Immun, 2006. **7**(8): p. 632-639.
731. Arenzana-Seisdedos, F., et al., *HIV blocked by chemokine antagonist*. Nature, 1996. **383**(6599): p. 400-400.
732. Liu, H., et al., *Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4581-4585.
733. Zhao, J., et al., *The effects of RANTES polymorphisms on susceptibility to HIV-1 infection and disease progression: evidence from an updated meta-analysis*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2016. **32**(6): p. 517-528.
734. An, P., et al., *Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(15): p. 10002-10007.
735. Hong, X., et al., *SDF-1 and CXCR₄ are up-regulated by VEGF and contribute to glioma cell invasion*. Cancer Lett, 2006. **236**(1): p. 39-45.
736. Tashiro, K., et al., *Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins*. Science, 1993. **261**(5121): p. 600-603.
737. Winkler, C., et al., *Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant*. Science, 1998. **279**(5349): p. 389-393.
738. Ma, L., et al., *Distribution of CCR2-64I and SDF1-3'A alleles and HIV status in 7 ethnic populations of Cameroon*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2005. **40**(1): p. 89-95.
739. Chaudhary, O., et al., *P2.191 DC-SIGN,DC-SIGNR and SDF-1 Polymorphism in High Risk Seronegative Sexually Transmitted Disease Patients from North Indian*. Sexually Transmitted Infections, 2013. **89**(Suppl 1): p. A146-A146.
740. Petersen, D.C., et al., *Risk for HIV-1 infection associated with a common CXCL12 (SDF1) polymorphism and CXCR₄ variation in an African population*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2005. **40**(5): p. 521.
741. Wang, Y., et al., *SDF1-3'A gene mutation is correlated with increased susceptibility to HIV type 1 infection by sexual transmission in Han Chinese*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2008. **24**(11): p. 1341-1345.
742. Sarkar, K., et al., *HIV infection and host genetic mutation among injecting drug-users of northeastern states of India*. J Health Popul Nutr, 2010. **28**(2): p. 130.
743. Tan, X.-h., et al., *Distribution of CCR5-Δ32, CCR5m303A, CCR2-64I and SDF1-3'A in HIV-1 infected and uninfected high-risk Uighurs in Xinjiang, China*. Infect Genet Evol, 2010. **10**(2): p. 268-272.
744. V Reiche, E., et al., *Genetic polymorphisms in the chemokine and chemokine receptors: impact on clinical course and therapy of the human immunodeficiency virus type 1 infection (HIV-1)*. Curr Med Chem, 2007. **14**(12): p. 1325-1334.
745. Li, H., T.-J. Liu, and Z.-H. Hong, *Gene polymorphisms in CCR5, CCR2, SDF1 and RANTES among Chinese Han population with HIV-1 infection*. 2014. **24**: p. 99-104.
746. van Rij, R.P., et al., *The role of a stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant in the clinical course of HIV-1 infection*. Aids, 1998. **12**(9): p. F85-F90.
747. Meyer, L., et al., *CC-chemokine receptor variants, SDF-1 polymorphism, and disease progression in 720 HIV-infected patient*. Aids, 1999. **13**(5): p. 624.

748. Mangano, A., et al., *Protective effect of CCR2-64I and not of CCR5-delta32 and SDF1-3'A in pediatric HIV-1 infection.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2000. **23**(1): p. 52-57.
749. Data, I.-P., *Effects of CCR5-32, CCR2-64I, and SDF-1 3 A Alleles on HIV-1 Disease Progression: An International Meta-Analysis of Individual-Patient Data.* Ann Intern Med, 2001. **135**: p. 782-795.
750. Ding, J., et al., *Association of gene polymorphism of SDF1 (CXCR12) with susceptibility to HIV-1 infection and AIDS disease progression: A meta-analysis.* PloS one, 2018. **13**(2): p. e0191930.
751. Kimura, R., et al., *Allele-specific transcript quantification detects haplotypic variation in the levels of the SDF-1 transcripts.* Hum Mol Genet, 2005. **14**(12): p. 1579-1585.
752. Doherty, P.C. and R.M. Zinkernagel, *Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex.* Nature, 1975. **256**(5512): p. 50-52.
753. Zinkernagel, R.M., *Immunology taught by viruses.* Science, 1996. **271**(5246): p. 173-178.
754. Carrington, M., et al., *HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B* 35-Cw* 04 disadvantage.* Science, 1999. **283**(5408): p. 1748-1752.
755. Tang, J., et al., *HLA class I homozygosity accelerates disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection.* AIDS Res Hum Retroviruses, 1999. **15**(4): p. 317-324.
756. Just, J.J., *Genetic predisposition to HIV-1 infection and acquired immune deficiency virus syndrome: a review of the literature examining associations with HLA.* Hum Immunol, 1995. **44**(3): p. 156-169.
757. Carrington, M. and S.J. O'Brien, *The influence of HLA genotype on AIDS.* Annu Rev Med, 2003. **54**(1): p. 535-551.
758. Gao, X., et al., *AIDS restriction HLA allotypes target distinct intervals of HIV-1 pathogenesis.* Nat Med, 2005. **11**(12): p. 1290-1292.
759. Phillips, R.E., et al., *Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition.* Nature, 1991. **354**(6353): p. 453-459.
760. Goulder, P.J., et al., *Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS.* Nat Med, 1997. **3**(2): p. 212-217.
761. Migueles, S.A., et al., *HLA B* 5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(6): p. 2709-2714.
762. O'Connor, D.H., et al., *Acute phase cytotoxic T lymphocyte escape is a hallmark of simian immunodeficiency virus infection.* Nat Med, 2002. **8**(5): p. 493-499.
763. D'andrea, A., et al., *Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes.* J Immunol, 1995. **155**(5): p. 2306-2310.
764. Flores-Villanueva, P.O., et al., *Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 5140-5145.
765. Shiga, H., et al., *Identification of multiple HIV-1 cytotoxic T-cell epitopes presented by human leukocyte antigen B35 molecules.* AIDS, 1996. **10**(10): p. 1075-1083.
766. Tomiyama, H., et al., *Evidence of presentation of multiple HIV-1 cytotoxic T lymphocyte epitopes by HLA-B* 3501 molecules that are associated with the accelerated progression of AIDS.* J Immunol, 1997. **158**(10): p. 5026-5034.
767. Gao, X., et al., *Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS.* n Engl J Med, 2001. **344**(22): p. 1668-1675.
768. Han, X., et al., *Synergistic stimulatory effects of tumour necrosis factor α and interferon γ on replication of human immunodeficiency virus type 1 and on apoptosis of HIV-1-infected host cells.* Eur J Clin Invest, 1996. **26**(4): p. 286-292.
769. Naif, H.M., et al., *The state of maturation of monocytes into macrophages determines the effects of IL-4 and IL-13 on HIV replication.* J Immunol, 1997. **158**(1): p. 501-511.
770. Vassalli, P., *The pathophysiology of tumor necrosis factors.* Annu Rev Immunol, 1992. **10**(1): p. 411-452.

771. Brennan, F.M. and M. Feldmann, *Cytokines in autoimmunity*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(6): p. 872-877.
772. Brinkman, B.M., et al., *Polymorphisms within the human tumor necrosis factor- α promoter region in human immunodeficiency virus type 1-seropositive persons*. Journal of Infectious Diseases 1997. **175**(1): p. 188-190.
773. Wilson, A., et al., *An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles*. J Exp Med, 1993. **177**(2): p. 557-560.
774. D'Alfonso, S. and P.M. Richiardi, *A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region*. J Immunogenetics, 1994. **39**(2): p. 150-154.
775. Hamann, A., et al., *Genetic variability in the TNF- α promoter is not associated with type II diabetes mellitus (NIDDM)*. BBRC 1995. **211**(3): p. 833-839.
776. Knuchel, M.C., et al., *Analysis of a biallelic polymorphism in the tumor necrosis factor α promoter and HIV type 1 disease progression*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1998. **14**(4): p. 305-309.
777. Khoo, S.H., et al., *Tumour necrosis factor c2 microsatellite allele is associated with the rate of HIV disease progression*. AIDS, 1997. **11**(4): p. 423-428.
778. Sen, G.C., *Viruses and interferons*. Annu Rev Microbiol, 2001. **55**(1): p. 255-281.
779. Kim, S.H., et al., *Mammalian type I interferon receptors consists of two subunits: IFNAR1 and IFNAR2*. Gene, 1997. **196**(1-2): p. 279-286.
780. Diop, G., et al., *Exhaustive genotyping of the interferon alpha receptor 1 (IFNAR1) gene and association of an IFNAR1 protein variant with AIDS progression or susceptibility to HIV-1 infection in a French AIDS cohort*. Biomed Pharmacother, 2006. **60**(9): p. 569-577.
781. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages*. j immunol, 1991. **147**(11): p. 3815-3822.
782. Kollmann, T.R., et al., *Inhibition of acute in vivo human immunodeficiency virus infection by human interleukin 10 treatment of SCID mice implanted with human fetal thymus and liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(7): p. 3126-3131.
783. Schols, D. and E. De Clercq, *Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces anergy in human peripheral blood lymphocytes by inducing interleukin-10 production*. J Virol, 1996. **70**(8): p. 4953-4960.
784. Rosenwasser, L.J. and L. Borish, *Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (IL-4 and IL-10)*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(4): p. S152-S155.
785. Chatterjee, A., et al., *Genetic association of IL-10 gene promoter polymorphism and HIV-1 infection in North Indians*. J Clin Immunol, 2009. **29**(1): p. 71-77.
786. Mahajan, S.D., et al., *Role of chemokine and cytokine polymorphisms in the progression of HIV-1 disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(2): p. 348-352.
787. Risma, K.A., et al., *V75R576 IL-4 receptor α is associated with allergic asthma and enhanced IL-4 receptor function*. j immunol, 2002. **169**(3): p. 1604-1610.
788. Soriano, A., et al., *Polymorphisms in the interleukin-4 receptor α chain gene influence susceptibility to HIV-1 infection and its progression to AIDS*. J Immunogenetics, 2005. **57**(9): p. 644-654.
789. Turner, M.W., *Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system*. Immunol Today, 1996. **17**(11): p. 532-540.
790. Lipscombe, R., et al., *High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene*. Hum Mol Genet, 1992. **1**(9): p. 709-715.
791. Madsen, H.O., et al., *A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein*. J Immunogenetics, 1994. **40**(1): p. 37-44.

792. Garred, P., et al., *Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin*. The Lancet, 1997. **349**(9047): p. 236-240.
793. Pastinen, T., et al., *Contribution of the CCR5 and MBL genes to susceptibility to HIV type 1 infection in the Finnish population*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1998. **14**(8): p. 695-698.
794. Tan, Y., et al., *Association between mannose-binding lectin and HIV infection and progression in a Chinese population*. Mol Immunol, 2009. **47**(2-3): p. 632-638.
795. Vallinoto, A.C.R., et al., *Mannose-binding lectin gene polymorphism and its impact on human immunodeficiency virus 1 infection*. Mol Immunol, 2006. **43**(9): p. 1358-1362.
796. Maas, J., et al., *Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progression to AIDS*. AIDS, 1998. **12**(17): p. 2275-2280.
797. Biron, C.A. and L. Brossay, *NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(4): p. 458-464.
798. Martin, M.P., et al., *Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS*. Nat Genet, 2002. **31**(4): p. 429-434.
799. Qi, Y., et al., *KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections*. PLoS Pathog, 2006. **2**(8): p. e79.
800. Martin, M.P., et al., *Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1*. Nat Genet, 2007. **39**(6): p. 733-740.
801. Bleiber, G., et al., *Use of a combined ex vivo/in vivo population approach for screening of human genes involved in the human immunodeficiency virus type 1 life cycle for variants influencing disease progression*. J Virol, 2005. **79**(20): p. 12674-12680.
802. Harris, R.S., et al., *DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection*. Cell, 2003. **113**(6): p. 803-809.
803. Lecossier, D., et al., *Hypermethylation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein*. Science, 2003. **300**(5622): p. 1112-1112.
804. Mangeat, B., et al., *Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts*. Nature, 2003. **424**(6944): p. 99-103.
805. An, P., et al., *APOBEC3G genetic variants and their influence on the progression to AIDS*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 11070-11076.
806. MacGinnitie, A.J., S. Anant, and N.O. Davidson, *Mutagenesis of apobec-1, the catalytic subunit of the mammalian apolipoprotein B mRNA editing enzyme, reveals distinct domains that mediate cytosine nucleoside deaminase, RNA binding, and RNA editing activity*. J Biol Chem, 1995. **270**(24): p. 14768-75.
807. Báfica, A., et al., *Influence of coinfecting pathogens on HIV expression: evidence for a role of Toll-like receptors*. 2004. **172**(12): p. 7229-7234.
808. Finberg, R.W., J.P. Wang, and E.A. Kurt-Jones, *Toll like receptors and viruses*. Rev Med Virol, 2007. **17**(1): p. 35-43.
809. Bochud, P.-Y., et al., *Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection*. AIDS, 2007. **21**(4): p. 441-446.
810. Ravetch, J.V. and S. Bolland, *IgG fc receptors*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**(1): p. 275-290.
811. Takai, T., *Roles of Fc receptors in autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 580-592.
812. Warmerdam, P., et al., *A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding*. 1991. **147**(4): p. 1338-1343.
813. Forthal, D.N., et al., *FcyRIIa genotype predicts progression of HIV infection*. J IMMUNOL, 2007. **179**(11): p. 7916-7923.
814. Brouwer, K.C., et al., *Polymorphism of Fc receptor IIa for immunoglobulin G is associated with placental malaria in HIV-1-positive women in western Kenya*. J Infect Dis, 2004. **190**(6): p. 1192-1198.

815. Brouwer, K.C., et al., *Polymorphism of Fc receptor IIa for IgG in infants is associated with susceptibility to perinatal HIV-1 infection*. AIDS, 2004. **18**(8): p. 1187-1194.
816. Brenner, B.G., et al., *High rates of forward transmission events after acute/early HIV-1 infection*. J Infect Dis, 2007. **195**(7): p. 951-959.
817. Wawer, M.J., et al., *Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda*. J Infect Dis, 2005. **191**(9): p. 1403-1409.
818. Darby, I., et al., *Importance of age at infection with HIV-1 for survival and development of AIDS in UK haemophilia population*. The Lancet, 1996. **347**(9015): p. 1573-1579.
819. Operskalski, E.A., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 infection: relationship of risk group and age to rate of progression to AIDS*. J Infect Dis, 1995. **172**(3): p. 648-655.
820. A, P., P. P, and C. Collaboration, *Short-term risk of AIDS according to current CD4 cell count and viral load in antiretroviral drug-naïve individuals and those treated in the monotherapy era*. AIDS, 2004. **18**(1): p. 51-58.
821. Touloumi, G., et al., *Effects of age at seroconversion and baseline HIV RNA level on the loss of CD4+ cells among persons with hemophilia*. AIDS, 1998. **12**(13): p. 1691-1697.
822. Geskus, R.B., et al., *Causal pathways of the effects of age and the CCR5-Δ32, CCR2-64I, and SDF-1 3' A alleles on AIDS development*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2005. **39**(3): p. 321-326.
823. Porter K, et al., *Determinants of survival following HIV-1 seroconversion after the introduction of HAART*. The Lancet, 2003. **362**(9392): p. 1267-1274.
824. Prins, M., et al., *Do gender differences in CD4 cell counts matter?* AIDS, 1999. **13**(17): p. 2361-2364.
825. Farzadegan, H., et al., *Sex differences in HIV-1 viral load and progression to AIDS*. The Lancet, 1998. **352**(9139): p. 1510-1514.
826. Sterling, T.R., et al., *Sex differences in longitudinal human immunodeficiency virus type 1 RNA levels among seroconverters*. J Infect Dis, 1999. **180**(3): p. 666-672.
827. Moore, R.D. and L. Cheever, *Lack of sex difference in CD4 to HIV-1 RNA viral load ratio*. The Lancet, 1999. **353**(9151): p. 463-464.
828. Lepri, A.C., et al., *HIV disease progression in 854 women and men infected through injecting drug use and heterosexual sex and followed for up to nine years from seroconversion*. BMJ, 1994. **309**(6968): p. 1537-1542.
829. Ironson, G., et al., *Psychosocial factors predict CD4 and viral load change in men and women with human immunodeficiency virus in the era of highly active antiretroviral treatment*. Psychosom Med, 2005. **67**(6): p. 1013-21.
830. Leserman, J., et al., *Impact of stressful life events, depression, social support, coping, and cortisol on progression to AIDS*. Am J Psychiatry, 2000. **157**(8): p. 1221-8.
831. Leserman, J., et al., *Progression to AIDS, a clinical AIDS condition and mortality: psychosocial and physiological predictors*. Psychol Med, 2002. **32**(6): p. 1059.
832. Ashton, E., et al., *Social support and maladaptive coping as predictors of the change in physical health symptoms among persons living with HIV/AIDS*. AIDS Patient Care, 2005. **19**(9): p. 587-598.
833. Anastos, K., et al., *The association of race, sociodemographic, and behavioral characteristics with response to highly active antiretroviral therapy in women*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2005. **39**(5): p. 537-544.
834. Parruti, G., et al., *Long-term adherence to first-line highly active antiretroviral therapy in a hospital-based cohort: predictors and impact on virologic response and relapse*. AIDS Patient Care, 2006. **20**(1): p. 48-56.
835. Schweitzer, A.-M., M.B. Mizwa, and M.W. Ross, *Psychosocial aspects of HIV/AIDS adults*. Baylor Int Ped AIDS Initiative 2010: p. 334-49.

836. Pontali, E., et al., *Antiretroviral Treatment in Resource-limited Settings*. Journal of Health Management, 2003. **5**(2): p. 315-326.
837. Solé, X., et al., *SNPStats: a web tool for the analysis of association studies*. 2006. **22**(15): p. 1928-1929.
838. Degerli, N., E. Yilmaz, and F. Bardakci, *The $\Delta 32$ allele distribution of the CCR5 gene and its relationship with certain cancers in a Turkish population*. Clinical biochemistry 2005. **38**(3): p. 248-252.
839. Sabeti, P.C., et al., *The case for selection at CCR5- $\Delta 32$* . PLoS Biol 2005. **3**(11): p. e378.
840. Kim, H.S., et al., *CCR2-64I and CCR5 $\Delta 32$ Polymorphisms in Korean Patients with Myasthenia Gravis*. J Clin Neurol, 2007. **3**(3): p. 133-138.
841. Weiss, R.A., *Thirty years on: HIV receptor gymnastics and the prevention of infection*. BMC biology 2013. **11**(1): p. 1-5.
842. Li, H., T.-J. Liu, and Z.-H. Hong, *Gene polymorphisms in CCR5, CCR2, SDF1 and RANTES among Chinese Han population with HIV-1 infection*. Infect Genet Evol, 2014. **24**: p. 99-104.
843. Solloch, U.V., et al., *Frequencies of gene variant CCR5- $\Delta 32$ in 87 countries based on next-generation sequencing of 1.3 million individuals sampled from 3 national DKMS donor centers*. Hum Immunol, 2017. **78**(11-12): p. 710-717.
844. Jawdat, D., et al., *82-p: the prevalence of CCR5 delta 32 mutation in Saudi Arabia*. Hum Immunol, 2013. **74**: p. 108.
845. Rahimi, H., M.M. Farajollahi, and A. Hosseini, *Distribution of the mutated delta 32 allele of CCR5 co-receptor gene in Iranian population*. MJIRI, 2014. **28**: p. 140.
846. Khabour, O.F., L.J. Abu-Haweleh, and K.H. Alzoubi, *Distribution Of CCR-5 $\Delta 32$, CCR2-64I, and SDF-1-3' A Alleles Among Jordanians*. AIDS Res Hum Retroviruses 2013. **29**(1): p. 151-155.
847. Nkenfou, C.N., et al., *Distribution of CCR5-Delta32, CCR5 promoter 59029 A/G, CCR2-64I and SDF1-3'A genetic polymorphisms in HIV-1 infected and uninfected patients in the west region of Cameroon*. BMC Res Notes, 2013. **6**: p. 288.
848. Gupta, A. and H. Padh, *Analysis of CCR5 and SDF-1 genetic variants and HIV infection in Indian population*. Int J Immunogenet, 2015. **42**(4): p. 270-278.
849. Bharti, D., et al., *Low prevalence of CCR5- $\Delta 32$, CCR2-64I and SDF1-3' A alleles in the Baiga and Gond tribes of Central India*. SpringerPlus 2015. **4**(1): p. 1-5.
850. Ting, K.-H., et al., *Relationship of genetic polymorphisms of the chemokine, CCL5, and its receptor, CCR5, with coronary artery disease in Taiwan*. Evidence-Based Complementary Alternative Medicine 2015. **2015**.
851. Veloso, S., et al., *Effect of TNF- α genetic variants and CCR5 $\Delta 32$ on the vulnerability to HIV-1 infection and disease progression in Caucasian Spaniards*. BMC Med Genet, 2010. **11**(1): p. 1-10.
852. Admas, A. and N. Berhane, *The Frequency and Effects of CCR5 Delta 32 Allele in Gondar Population*. Molecular Biology 2016.
853. Heydarifard, Z., A. Tabarraei, and A. Moradi, *Polymorphisms in CCR5 $\Delta 32$ and Risk of HIV-1 Infection in the Southeast of Caspian Sea, Iran*. Disease markers 2017. **2017**.
854. Liu, S., et al., *Effect of CCR5- $\Delta 32$ Heterozygosity on HIV-1 Susceptibility: A Meta-Analysis*. PLOS ONE, 2012. **7**(4): p. e35020.
855. Jlizi, A., et al., *Identification of the CCR5- $\Delta 32$ HIV resistance allele and new mutations of the CCR5 gene in different Tunisian populations*. Hum Immunol, 2007. **68**(12): p. 993-1000.
856. Badie, B., et al., *Frequency of CCR5 Delta 32 Polymorphism and its Relation to Disease Progression in Iranian HIV-1 Positive Individuals*. Hum Virol Retrovirol, 2015. **2**: p. 00059.
857. Ioannidis, J.P., et al., *Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data*. Ann Intern Med, 2001. **135**(9): p. 782-95.

858. Meyer, L., et al., *Early protective effect of CCR-5 delta 32 heterozygosity on HIV-1 disease progression: relationship with viral load. The SEROCO Study Group.* Aids, 1997. **11**(11): p. F73-8.
859. de Mendoza, C., et al., *Prevalence of X4 tropic viruses in patients recently infected with HIV-1 and lack of association with transmission of drug resistance.* J Antimicrob Chemother, 2007. **59**(4): p. 698-704.
860. Shepherd, J., et al., *Emergence and persistence of CXCR4-tropic HIV-1 in a population of men from the multicenter AIDS cohort study.* Journal of Infectious Diseases 2008. **198**(8): p. 1104-1112.
861. Metallidis, S., et al., *Older HIV-infected patients—an underestimated population in northern Greece: epidemiology, risk of disease progression and death.* Int J Infect Dis, 2013. **17**(10): p. e883-e891.
862. Konrad, S., et al., *HIV Disease Progression to CD4 Count <200 Cells/ μ L and Death in Saskatoon, Saskatchewan.* Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, 2013. **24**: p. 780852.
863. Campbell, G.R., et al., *The glutamine-rich region of the HIV-1 Tat protein is involved in T-cell apoptosis.* J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 48197-48204.
864. Cavarelli, M. and G. Scarlatti, *Phenotype Variation in Human Immunodeficiency virus Type 1 Transmission and Disease Progression.* Disease Markers, 2009. **27**: p. 685608.
865. Raymond, S., et al., *CXCR4-using viruses in plasma and peripheral blood mononuclear cells during primary HIV-1 infection and impact on disease progression.* AIDS, 2010. **24**(15): p. 2305-2312.
866. Gharagozloo, M., et al., *The frequency of CCR5 Δ 32 and CCR2-64I in southern Iranian normal population.* Immunol Lett, 2005. **96**(2): p. 277-281.
867. Nkenfou, C.N., et al., *Distribution of CCR5-Delta32, CCR5 promoter 59029 A/G, CCR2-64I and SDF1-3'A genetic polymorphisms in HIV-1 infected and uninfected patients in the west region of Cameroon.* BMC Res Notes, 2013. **6**(1): p. 1-8.
868. Ferreira-Fernandes, H., et al., *Prevalence of CCR5- Δ 32 and CCR2-V64I polymorphisms in a mixed population from northeastern Brazil.* Genet Mol Res 2015. **14**(4): p. 11710-11718.
869. Juhász, E., et al., *The Consequence of a Founder Effect: CCR5- Δ 32, CCR2-64I and SDF1-3'A Polymorphism in Vlach Gypsy Population in Hungary.* Pathol Oncol Res, 2012. **18**(2): p. 177-182.
870. Balci, A., Z. Yegin, and H. Koc, *Prevalence of HIV/AIDS Protective Alleles (CCR5- Δ 32, CCR2-64I, and SDF1-3'A) in Turkish Population.* Research Journal of Biology, 2017.
871. Verma, R., et al., *Distribution of CCR5 Δ 32, CCR2-64I and SDF1-3'A and plasma levels of SDF-1 in HIV-1 seronegative North Indians.* J Clin Virol, 2007. **38**(3): p. 198-203.
872. Kaur, G., et al., *Distribution of CCR2 polymorphism in HIV-1-infected and healthy subjects in North India.* Int J Immunogenet, 2007. **34**(3): p. 153-156.
873. Parczewski, M., et al., *Sequence variants of chemokine receptor genes and susceptibility to HIV-1 infection.* J Appl Genet, 2009. **50**(2): p. 159-166.
874. Roman, F., et al., *Prevalence of HIV co-receptor polymorphisms in HIV-infected patients and uninfected volunteers in Luxembourg.* HIV Clin Trials, 2002. **3**(3): p. 195-201.
875. Shrestha, S., et al., *Behavioral risk exposure and host genetics of susceptibility to HIV-1 infection.* J Infect Dis, 2006. **193**(1): p. 16-26.
876. Zwolińska, K., et al., *The effects of killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes on susceptibility to HIV-1 infection in the Polish population.* Immunogenetics, 2016. **68**(5): p. 327-337.
877. Xu, L., et al., *CCR2-64I allele is associated with the progression of AIDS in a Han Chinese population.* Mol Biol Rep, 2010. **37**(1): p. 311-316.
878. Singh, K.K., et al., *Genetic influence of CCR5, CCR2 and SDF1 variants on human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-related disease progression and neurological impairment, in children with symptomatic HIV-1 infection.* J Infect Dis, 2003. **188**(10): p. 1461-1472.

879. Philpott, S., et al., *CCR2 Genotype and Disease Progression in a Treated Population of HIV Type 1-Infected Women*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(6): p. 861-865.
880. Roy, P. and S. Chakrabarti, *The Distribution of CCR2-64I, SDF1-3' A and MCP1-2518 G/A Genes Polymorphism in a Specific High Risk Group from the Northeastern States West Bengal, and Gorkha Population in India*. Indian J Virol, 2012. **23**(3): p. 286-293.
881. Puissant, B., et al., *Analysis of CCR5, CCR2, CX3CR1, and SDF1 polymorphisms in HIV-positive treated patients: impact on response to HAART and on peripheral T lymphocyte counts*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2006. **22**(2): p. 153-162.
882. Restrepo, C., et al., *Genetic variation in CCR2 and CXCL12 genes impacts on CD4 restoration in patients initiating cART with advanced immunosuppression*. PloS one, 2019. **14**(3): p. e0214421.
883. Spire, B., et al., *Adherence to antiretroviral therapy in patients enrolled in a comprehensive care program in Cambodia: a 24-month follow-up assessment*. Antivir Ther, 2008.
884. Sumari-de Boer, I.M., et al., *HIV Stigma and Depressive Symptoms are Related to Adherence and Virological Response to Antiretroviral Treatment Among Immigrant and Indigenous HIV Infected Patients*. AIDS and Behavior, 2012. **16**(6): p. 1681-1689.
885. Smith, P.R., et al., *Ethnicity and discordance in plasma HIV-1 RNA viral load and CD4+ lymphocyte count in a cohort of HIV-1-infected individuals*. J Clin Virol, 2003. **26**(1): p. 101-107.
886. Klein, M.B., et al., *The effects of HIV-1 subtype and ethnicity on the rate of CD4 cell count decline in patients naive to antiretroviral therapy: a Canadian– European collaborative retrospective cohort study*. CMAJ open 2014. **2**(4): p. E318.
887. Bhagwat, P., et al. *Racial disparities in virologic failure and tolerability during firstline HIV antiretroviral therapy*. in *Open forum infectious diseases*. 2019. Oxford University Press US.
888. Fernandez, S., et al., *Recovery of CD4+ T Cells in HIV patients with a stable virologic response to antiretroviral therapy is associated with polymorphisms of interleukin-6 and central major histocompatibility complex genes*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2006. **41**(1): p. 1-5.
889. Kostrikis, L.G., et al., *A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation*. Nat Med, 1998. **4**(3): p. 350-353.
890. Nakayama, E.E., et al., *A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform*. AIDS, 2004. **18**(5): p. 729-738.
891. Mariani, R., et al., *CCR2-64I polymorphism is not associated with altered CCR5 expression or coreceptor function*. J Virol, 1999. **73**(3): p. 2450-2459.
892. Lee, B., et al., *Influence of the CCR2-V64I polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 coreceptor activity and on chemokine receptor function of CCR2b, CCR3, CCR5, and CXCR4*. J Virol, 1998. **72**(9): p. 7450.
893. O'Cleirigh, C., et al., *Conscientiousness predicts disease progression (CD4 number and viral load) in people living with HIV*. Health Psychol, 2007. **26**(4): p. 473.
894. Vidal, F., et al., *Lack of association of SDF-1 3'A variant allele with long-term nonprogressive HIV-1 infection is extended beyond 16 years*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2005. **40**(3): p. 276-9.
895. Theodorou, I., et al., *Genetic control of HIV disease*. Trends Microbiol, 2003. **11**(8): p. 392-7.
896. Coll, B., et al., *Influence of a monocyte chemoattractant protein 1 mutated allele on the response to protease inhibitor-based antiretroviral therapy*. HIV Med, 2006. **7**(6): p. 356-360.
897. Rigato, P.O., et al., *Better CD4+ T cell recovery in Brazilian HIV-infected individuals under HAART due to cumulative carriage of SDF-1-3'A, CCR2-V64I, CCR5-D32 and CCR5-promoter 59029A/G polymorphisms*. Curr HIV Res, 2008. **6**(5): p. 466-473.
898. Kozhekbaeva, Z.M., et al., *Distribution of the HIV-1 resistance-conferring alleles (CCR5delta32, CCR2-64I, and SDF1-3' A) in Russian, Ukrainian, and Belarusian populations*. Russ J Genet, 2004. **40**(10): p. 1149-1155.
899. Grimaldi, R., et al., *Distribution of SDF1-3'A polymorphisms in three different ethnic groups from Brazil*. Braz J Infect Dis, 2010. **14**(2): p. 197-200.

900. Vieira, V.C., et al., *The effect of combined polymorphisms in chemokines and chemokine receptors on the clinical course of HIV-1 infection in a Brazilian population*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2011. **106**(4): p. 408-414.
901. Mombo, L.E., et al., *Genotyping of CCR5 Gene, CCR2b and SDF1 Variants Related to HIV-1 Infection in Gabonese Subjects*. Intervirology, 2015. **58**(1): p. 22-26.
902. Choi, B.-S., et al., *High Frequencies of the CCR2b-64I and SDF1-3'A Mutations with HIV Infection in Koreans*. Immune Netw, 2002. **2**(2): p. 86-90.
903. Amara, S., J. Domenech, and F. Jenhani, *Stromal cell-derived factor 1 polymorphism in patients infected with HIV and implications for AIDS progression in Tunisia*. HIV/AIDS 2010. **2**: p. 203.
904. Voevodin, A., E. Samilchuk, and S. Dashti, *Frequencies of SDF-1 chemokine, CCR-5, and CCR-2 chemokine receptor gene alleles conferring resistance to human immunodeficiency virus type 1 and AIDS in Kuwaitis*. J Med Virol, 1999. **58**(1): p. 54-58.
905. Apostolakis, S., et al., *Distribution of HIV/AIDS protective SDF1, CCR5 and CCR2 gene variants within Cretan population*. J Clin Virol, 2005. **34**(4): p. 310-314.
906. Tan, X.H., et al., *Distribution of CCR5-Delta32, CCR5m303A, CCR2-64I and SDF1-3'A in HIV-1 infected and uninfected high-risk Uighurs in Xinjiang, China*. Infect Genet Evol, 2010. **10**(2): p. 268-72.
907. Salem, A.H., et al., *Distribution of four HIV type 1-resistance polymorphisms (CCR5-Δ 32, CCR5-m303, CCR2-64I, and SDF1-3' A) in the Bahraini population*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2009. **25**(10): p. 973-977.
908. Balci, A., Z. Yegin, and H. Koc, *Prevalence of HIV/AIDS Protective Alleles (CCR5-Δ32, CCR2-64I, and SDF1-3' A) in Turkish Population*. Research Journal of Biology, 2017. **5**(2).
909. Lewandowska, M., et al., *Distribution of two HIV-1-resistant polymorphisms (SDF1-3' A and CCR2-64I alleles) in the Polish population*. J Hum Genet, 2002. **47**(11): p. 585-589.
910. Vidal, F., et al., *Lack of association of SDF-1 3' A variant allele with long-term nonprogressive HIV-1 infection is extended beyond 16 years*. J Acquir Immune Defic Syndr 2005. **40**(3): p. 276-279.
911. Reiche, E., et al., *Stromal cell-derived factor 1 (SDF1) genetic polymorphism in a sample of healthy individuals, seronegative individuals exposed to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and patients infected with HIV-1 from the Brazilian population*. Int J Immunogenet, 2006. **33**(2): p. 127-133.
912. Carvalhaes, F.A.d.P.L., et al., *Frequencies of CCR5-D32, CCR2-64I and SDF1-3 A mutations in Human Immunodeficiency Virus (HIV) seropositive subjects and seronegative individuals from the state of Pará in Brazilian Amazonia*. Genet Mol Biol, 2005. **28**(4): p. 665-669.
913. Almal, S.H., A. Gupta, and H. Padh, *Combinatorial Effects of SDF-1 and CCL3L1 Gene Variants and Susceptibility to HIV-1/AIDS in Indian Population*. The Journal of Health Sciences 2015. **3**: p. 276-281.
914. Liu, S. and H. Zhu, *Association between polymorphism of SDF1 (CXCL12) gene and HIV-1 susceptibility: a meta-analysis*. Curr HIV Res, 2011. **9**(2): p. 112-119.
915. Gong, X., et al., *A SDF1 genetic variant confers resistance to HIV-1 infection in intravenous drug users in China*. Infect Genet Evol, 2015. **34**: p. 137-142.
916. Hendrickson, S.L., et al., *Host genetic influences on highly active antiretroviral therapy efficacy and AIDS-free survival*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2008. **48**(3): p. 263.
917. Lathey, J.L., et al., *Associations of CCR5, CCR2, and stromal cell-derived factor 1 genotypes with human immunodeficiency virus disease progression in patients receiving nucleoside therapy*. The Journal of Health Sciences, 2001. **184**(11): p. 1402-1411.
918. Yeregui, E., et al., *High circulating SDF-1 and MCP-1 levels and genetic variations in CXCL12, CCL2 and CCR5: Prognostic signature of immune recovery status in treated HIV-positive patients*. EBioMedicine, 2020. **62**: p. 103077.

919. Carvalho-Silva, W.H.V., et al., *CCR5 genotype and pre-treatment CD4+ T-cell count influence immunological recovery of HIV-positive patients during antiretroviral therapy*. *gene*, 2020. **741**: p. 144568.
920. Vissoci Reiche, E.M., et al., *The effect of stromal cell-derived factor 1 (SDF1/CXCL12) genetic polymorphism on HIV-1 disease progression*. *Int J Mol Med*, 2006. **18**(4): p. 785-793.
921. Wei, M., et al., *Role of SDF-1 3'A polymorphism in HIV-1 disease progression: A systematic review and meta-analysis*. *Gene*, 2018. **677**: p. 182-188.
922. Koizumi, Y., et al., *RANTES-28G delays and DC-SIGN-139C enhances AIDS progression in HIV type 1-infected Japanese hemophiliacs*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2007. **23**(5): p. 713-719.
923. Bogner, J., et al., *Association of highly active antiretroviral therapy failure with chemokine receptor 5 wild type*. *HIV Med*, 2004. **5**(4): p. 264-272.
924. Brambilla, A., et al., *Shorter survival of SDF1-3'A/3'A homozygotes linked to CD4+ T cell decrease in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection*. *J Infect Dis*, 2000. **182**(1): p. 311-5.
925. Amara, S., J. Domenech, and F. Jenhani, *Stromal cell-derived factor 1 polymorphism in patients infected with HIV and implications for AIDS progression in Tunisia*. *HIV/AIDS* 2010. **2**: p. 203-9.
926. Ross, J., *Control of messenger RNA stability in higher eukaryotes*. *Trends Genet*, 1996. **12**(5): p. 171-5.
927. Garcia-Moruja, C., et al., *Molecular phenotype of CXCL12beta 3'UTR G801A polymorphism (rs1801157) associated to HIV-1 disease progression*. *Curr HIV Res*, 2009. **7**(4): p. 384-9.
928. Winkler, C., et al., *Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC)*. *Science*, 1998. **279**(5349): p. 389-93.
929. Derdeyn, C.A., et al., *Correlation between circulating stromal cell-derived factor 1 levels and CD4+ cell count in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1999. **15**(12): p. 1063-71.
930. Nanki, T. and P.E. Lipsky, *Cutting edge: stromal cell-derived factor-1 is a costimulator for CD4+ T cell activation*. *J Immunol*, 2000. **164**(10): p. 5010-5014.
931. Soriano, A., et al., *Plasma stromal cell-derived factor (SDF)-1 levels, SDF1-3'A genotype, and expression of CXCR4 on T lymphocytes: their impact on resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection and its progression*. *J Infect Dis*, 2002. **186**(7): p. 922-31.
932. Ikegawa, M., et al., *Elevated plasma stromal cell-derived factor 1 protein level in the progression of HIV type 1 infection/AIDS*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2001. **17**(7): p. 587-95.
933. Kimura, R., et al., *Allele-specific transcript quantification detects haplotypic variation in the levels of the SDF-1 transcripts*. *Hum Mol Genet*, 2005. **14**(12): p. 1579-85.
934. Vieira, V.C., et al., *The effect of combined polymorphisms in chemokines and chemokine receptors on the clinical course of HIV-1 infection in a Brazilian population*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2011. **106**(4): p. 408-15.
935. Goetz, M.B., et al., *Decreased recovery of CD4 lymphocytes in older HIV-infected patients beginning highly active antiretroviral therapy*. *Aids*, 2001. **15**(12): p. 1576-9.
936. Manfredi, R. and F. Chiodo, *A case-control study of virological and immunological effects of highly active antiretroviral therapy in HIV-infected patients with advanced age*. *Aids*, 2000. **14**(10): p. 1475-7.
937. Viard, J.-P., et al., *Influence of age on CD4 cell recovery in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy: evidence from the EuroSIDA study*. *J Infect Dis*, 2001. **183**(8): p. 1290-1294.
938. Yamashita, T.E., et al., *Immunologic and virologic response to highly active antiretroviral therapy in the Multicenter AIDS Cohort Study*. *Aids*, 2001. **15**(6): p. 735-46.

939. Grabar, S., et al., *Immunologic and clinical responses to highly active antiretroviral therapy over 50 years of age. Results from the French Hospital Database on HIV*. *Aids*, 2004. **18**(15): p. 2029-38.
940. Pinzone, M.R., et al., *HIV RNA suppression and immune restoration: can we do better?* *Clin Dev Immunol*, 2012. **2012**.
941. Florence, E., et al., *Factors associated with a reduced CD4 lymphocyte count response to HAART despite full viral suppression in the EuroSIDA study*. *HIV Med*, 2003. **4**(3): p. 255-62.
942. Gunda, D.W., et al., *Prevalence and risk factors of poor immune recovery among adult HIV patients attending care and treatment centre in northwestern Tanzania following the use of highly active antiretroviral therapy: a retrospective study*. *BMC Res Notes*, 2017. **10**(1): p. 1-6.
943. Kaufmann, G.R., et al., *The extent of HIV-1-related immunodeficiency and age predict the long-term CD4 T lymphocyte response to potent antiretroviral therapy*. *AIDS*, 2002. **16**(3): p. 359-367.
944. Vinikoor, M.J., et al., *Age at antiretroviral therapy initiation predicts immune recovery, death, and loss to follow-up among HIV-infected adults in urban Zambia*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2014. **30**(10): p. 949-55.
945. Ezeamama, A.E., et al., *Age, sex, and nutritional status modify the CD4+ T-cell recovery rate in HIV-tuberculosis co-infected patients on combination antiretroviral therapy*. *Int J Infect Dis*, 2015. **35**: p. 73-79.
946. Semeere, A.S., et al., *Mortality and immunological recovery among older adults on antiretroviral therapy at a large urban HIV clinic in Kampala, Uganda*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2014. **67**(4): p. 382.
947. Kaufmann, G.R., et al., *Characteristics, Determinants, and Clinical Relevance of CD4 T Cell Recovery to $\geq 500\text{ Cells}/\mu\text{L}$ in HIV Type 1-Infected Individuals Receiving Potent Antiretroviral Therapy*. *Clinical Infectious Diseases*, 2005. **41**(3): p. 361-372.
948. Egger, M., et al., *Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies*. *Lancet*, 2002. **360**(9327): p. 119-29.
949. Raffi, F., et al., *Failure to achieve immunological recovery in HIV-infected patients with clinical and virological success after 10 years of combined ART: role of treatment course*. *J Antimicrob Chemother*, 2017. **72**(1): p. 240-245.
950. Aldrete, S., et al., *CD4 rate of increase is preferred to CD4 threshold for predicting outcomes among virologically suppressed HIV-infected adults on antiretroviral therapy*. *PLoS One*, 2020. **15**(1): p. e0227124.
951. Orlando, G., et al., *Antiretroviral treatment and age-related comorbidities in a cohort of older HIV-infected patients*. *HIV Med*, 2006. **7**(8): p. 549-557.
952. Patterson, K., et al., *Effects of age and sex on immunological and virological responses to initial highly active antiretroviral therapy*. *HIV Med*, 2007. **8**(6): p. 406-410.
953. Greenbaum, A.H., et al., *Effect of age and HAART regimen on clinical response in an urban cohort of HIV-infected individuals*. *AIDS*, 2008. **22**(17): p. 2331.
954. Tumbarello, M., et al., *Older age does not influence CD4 cell recovery in HIV-1 infected patients receiving highly active anti retroviral therapy*. *BMC Infect Dis*, 2004. **4**(1): p. 1-11.
955. Blanco, J.R., et al., *Definition of advanced age in HIV infection: looking for an age cut-off*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2012. **28**(9): p. 1000-1006.
956. Knobel, H., et al., *Response to highly active antiretroviral therapy in HIV-infected patients aged 60 years or older after 24 months follow-up*. *AIDS*, 2001. **15**(12): p. 1591-1593.
957. Longini, I.M., Jr., et al., *The dynamics of CD4+ T-lymphocyte decline in HIV-infected individuals: a Markov modeling approach*. *J Acquir Immune Defic Syndr* (1988), 1991. **4**(11): p. 1141-7.
958. Darby, S.C., et al., *Importance of age at infection with HIV-1 for survival and development of AIDS in UK haemophilia population*. *UK Haemophilia Centre Directors' Organisation*. *The Lancet*, 1996. **347**(9015): p. 1573-9.

959. Pezzotti, P., et al., *Category of exposure to HIV and age in the progression to AIDS: longitudinal study of 1199 people with known dates of seroconversion*. *BMJ*, 1996. **313**(7057): p. 583-586.
960. Effros, R.B., et al., *Workshop on HIV infection and aging: what is known and future research directions*. *Clin Infect Dis*, 2008. **47**(4): p. 542.
961. Douek, D.C., et al., *Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection*. *Nature*, 1998. **396**(6712): p. 690-5.
962. Teixeira, L., et al., *Poor CD4 T cell restoration after suppression of HIV-1 replication may reflect lower thymic function*. *Aids*, 2001. **15**(14): p. 1749-56.
963. Hunt, P.W., et al., *Continued CD4 cell count increases in HIV-infected adults experiencing 4 years of viral suppression on antiretroviral therapy*. *Aids*, 2003. **17**(13): p. 1907-15.
964. Nanzigu, S., et al., *Poor immunological recovery among severely immunosuppressed antiretroviral therapy-naïve Ugandans*. *HIV AIDS* 2013. **5**: p. 309.
965. Gandhi, R.T., et al., *Effect of baseline- and treatment-related factors on immunologic recovery after initiation of antiretroviral therapy in HIV-1-positive subjects: results from ACTG 384*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2006. **42**(4): p. 426-34.
966. Maini, M.K., et al., *Reference ranges and sources of variability of CD4 counts in HIV-seronegative women and men*. *Genitourin Med*, 1996. **72**(1): p. 27-31.



ANNEXES

ANNEXE I

Fiche de renseignements des patients infectés par le VIH-1 :

Hôpital Militaire d'Instruction Med V de Rabat
Service de dermatologie - Service de virologie

Date de consultation :	Service :	Médecin traitant :
Fiche N° :	IPP :	N° de demande :
Données démographiques		
Nom :		
Prénom :		
Sexe : <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M		
Date de naissance :		
Origine géographique :		
Origine ethnique : <input type="checkbox"/> Arabe <input type="checkbox"/> Berbère <input type="checkbox"/> Arabo-berbère		
Consanguinité parentale : <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non si oui à préciser		
Situation sociale : <input type="checkbox"/> Célibataire <input type="checkbox"/> Marié <input type="checkbox"/> Divorcé <input type="checkbox"/> Veuf		
Niveau intellectuel : <input type="checkbox"/> Analphabète <input type="checkbox"/> Primaire <input type="checkbox"/> Secondaire <input type="checkbox"/> Universitaire		
Statut : <input type="checkbox"/> Civil <input type="checkbox"/> Militaire		
Situation professionnelle : <input type="checkbox"/> Etudiant <input type="checkbox"/> En activité <input type="checkbox"/> Sans profession <input type="checkbox"/> Retraité <input type="checkbox"/> Autres		
Fonction (Si fonctionnaire) :		
N° de téléphone :		
E-mail :		
Adresse :		

Motifs de consultation

Dépistage volontaire
Autre

Bilan systématique

Exposition

Date de découverte de la maladie :

Antécédents pathologiques & Facteurs de risque

IST Acte chirurgical Soins dentaires

Tatouage Transfusion UDI

Conjoint infecté AES Parent infecté (Mère-Enfant)

Autres

Progression de l'infection

- **Signes cliniques:**

A la découverte	Date:	Date:	Date:	Date:
<input type="checkbox"/> Stade A	<input type="checkbox"/> Stade A	<input type="checkbox"/> Stade A	<input type="checkbox"/> Stade A	<input type="checkbox"/> Stade A
<input type="checkbox"/> Stade B	<input type="checkbox"/> Stade B	<input type="checkbox"/> Stade B	<input type="checkbox"/> Stade B	<input type="checkbox"/> Stade B
<input type="checkbox"/> Stade C	<input type="checkbox"/> Stade C	<input type="checkbox"/> Stade C	<input type="checkbox"/> Stade C	<input type="checkbox"/> Stade C

- **Bilan biologique:**

	A la découverte	Date:	Date:	Date:	Date:
Charge virale					
Taux de T CD4+					
Sérologie Rubéole					
Sérologie CMV					
Marqueurs du VHB					
Sérologie VHC					
Sérologie toxoplasmose					
Sérologie Syphilis					

Traitement

Date de début de traitement :

Type de traitement :

INTI

Association de INTI

INNTI

IP

Inhibiteur de la fusion

Inhibiteur de l'Intégrase

Suivi de traitement : Observance thérapeutique : Bonne Satisfaisante Mauvaise

Evolution sous traitement :

	Début de tt	Date :	Date	Date	Date	Date	Date	Date
Charge virale								
Taux de T CD4+								
NFS								
Glycémie à jeun								
B. lipidique								
B. hépatique								
B. rénal								

Date d'échec thérapeutique :

Causes d'échec thérapeutique :


Traitement de substitution :

Génotypage

Mutations détectées:

ANNEXE II

Accord favorable du comité d'éthique :

 COMITÉ D'ETHIQUE POUR LA RECHERCHE BIOMÉDICALE UNIVERSITÉ MOHAMMED V – SOUSSI FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE RABAT FACULTÉ DE MÉDECINE DENTAIRE DE RABAT													
<p>KTIOUET Jamal Eddine Président Psychologie Médicale</p> <p>ABDALLAOUI Faïza Recherche Médecine Dentaire</p> <p>ABOUQAL Redouane Recherche Médecine</p> <p>BIHI El Habib Droit</p> <p>CHERKAOUI Mustapha Paramédical</p> <p>CHERRAH Yahia Sciences Pharmaceutiques</p> <p>DADSI BOUTALEB Fatima Société Civile</p> <p>GHARBI Mohamed El Hassan Religion</p> <p>HAIMEUR Charki Recherche Médecine</p> <p>HAJJAJ – HASSOUNI Najia Recherche Médecine</p> <p>HARMOUCHE Hicham Recherche Médecine</p> <p>M'RABET Mustapha Santé Publique</p> <p>RIDA Sana Recherche Médecine Dentaire</p> <p>SLIMANI Seif El Islam Société Civile</p> <p>TAMOIRO Abdessamad Philosophie</p> <p>ZEGGWAGH Amine Ali Recherche Médecine</p> <p>Secrétariat Administratif GUEDIRA Khaoula Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat ☎ + 212 537 77 35 60 cerb.rabat@gmail.com</p>	<p style="text-align: right;">Rabat, le 09/06/2014</p> <p style="text-align: center;">Faculté de Médecine et de Pharmacie - Rabat Départ N°:.....<u>591</u>..... Date:.....<u>17 JUIN 2014</u>.....</p> <p>Mademoiselle Fatima Zahra FARISSI Doctorante CEDOC Faculté de Médecine et de Pharmacie</p> <p>Titre et références</p> <p>Le Comité d'Ethique pour la Recherche Biomédicale de Rabat a été saisi le 29/05/2014 d'une demande d'avis pour le projet de recherche intitulé : « Facteurs génétiques dans la prédisposition au VIH-1 au Maroc : rôle des gènes CCR5, CCR2 et SDF1. »</p> <p>Le Comité d'Ethique pour la Recherche Biomédicale de Rabat a examiné le protocole et tous les documents constituant le dossier lors de sa séance du 03/06/2014.</p> <p>Documents examinés</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Protocole de l'étude ▪ Note d'information et formulaire de consentement éclairé du patient (version française) ▪ Note d'information et formulaire de consentement éclairé du patient (version arabe) ▪ La liste des investigateurs et des centres de recherche ▪ Curriculum vitae des investigateurs de l'étude ▪ Formulaire de recueil des données <p>Délibérations</p> <p>Ont participé à la délibération :</p> <table border="0"> <tr> <td>KTIOUET Jamal Eddine Président Psychologie Médicale</td> <td>M'RABET Mustapha Santé Publique</td> </tr> <tr> <td>ABDALLAOUI Faïza Recherche Médecine Dentaire</td> <td>RIDA Sana Recherche Médecine Dentaire</td> </tr> <tr> <td>GHARBI Mohamed El Hassan Religion</td> <td>Saif El Islam SLIMANI Société Civile</td> </tr> <tr> <td>HAIMEUR Charki Recherche Médecine</td> <td>TAMOIRO Abdessamad Philosophie</td> </tr> <tr> <td>Najia HAJJAJ HASSOUNI Recherche Médecine</td> <td>ZEGGWAGH Amine Ali Recherche Médecine</td> </tr> <tr> <td>HARMOUCHE Hicham Recherche Médecine</td> <td></td> </tr> </table>	KTIOUET Jamal Eddine Président Psychologie Médicale	M'RABET Mustapha Santé Publique	ABDALLAOUI Faïza Recherche Médecine Dentaire	RIDA Sana Recherche Médecine Dentaire	GHARBI Mohamed El Hassan Religion	Saif El Islam SLIMANI Société Civile	HAIMEUR Charki Recherche Médecine	TAMOIRO Abdessamad Philosophie	Najia HAJJAJ HASSOUNI Recherche Médecine	ZEGGWAGH Amine Ali Recherche Médecine	HARMOUCHE Hicham Recherche Médecine	
KTIOUET Jamal Eddine Président Psychologie Médicale	M'RABET Mustapha Santé Publique												
ABDALLAOUI Faïza Recherche Médecine Dentaire	RIDA Sana Recherche Médecine Dentaire												
GHARBI Mohamed El Hassan Religion	Saif El Islam SLIMANI Société Civile												
HAIMEUR Charki Recherche Médecine	TAMOIRO Abdessamad Philosophie												
Najia HAJJAJ HASSOUNI Recherche Médecine	ZEGGWAGH Amine Ali Recherche Médecine												
HARMOUCHE Hicham Recherche Médecine													



COMITÉ D'ETHIQUE POUR LA RECHERCHE BIOMÉDICALE
UNIVERSITÉ MOHAMMED V – SOUSSI
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE RABAT
FACULTÉ DE MÉDECINE DENTAIRE DE RABAT

KTIQUET Jamal Eddine
Président
Psychologie Médicale

ABDALLAOUI Faïza
Recherche Médecine Dentaire

ABOUQAL Redouane
Recherche Médecine

ABHI El Habib
Droit

BERKAOUI Mustapha
Paramédical

BERRAH Yahia
Sciences Pharmaceutiques

BADSI BOUTALEB Fatima
Société Civile

BERBI Mohamed El Hassan
Religion

BERMEUR Charki
Recherche Médecine

BERJJAJ – HASSOUNI Najja
Recherche Médecine

BERMOUCHE Hicham
Recherche Médecine

BERRABET Mustapha
Santé Publique

BERIDA Sana
Recherche Médecine Dentaire

BERIMANI Seif El Islam
Société Civile

BERAMOURO Abdessamad
Philosophie

BEREGGWAGH Amine Ali
Recherche Médecine

Secrétariat Administratif
BERGUEDIRA Khaoula
Faculté de Médecine et
de Pharmacie de Rabat
☎ + 212 537 77 35 60
erb.rabat@gmail.com

Au terme de la délibération le Comité d'Ethique pour la Recherche Biomédicale de Rabat a émis un **AVIS FAVORABLE** à la mise en œuvre de cette recherche biomédicale aux motifs suivants : Conditions satisfaisantes de validité / Pertinence scientifique / Intérêt de la recherche / Pertinence éthique / Conditions satisfaisantes de Protection des Personnes / Intelligibilité de la note d'information et conformité des modalités de recueil du consentement.

Le promoteur et l'investigateur sont priés d'informer dans les plus brefs délais le Comité d'Ethique pour la Recherche Biomédicale de Rabat de :

- Tous les incidents ou accidents éventuels survenus au cours de cette recherche
- Tous les amendements apportés au protocole
- La clôture de l'étude avec un bref résumé sur son déroulement

Références du Comité d'Ethique pour la Recherche Biomédicale de Rabat

- Le Comité d'Ethique pour la Recherche Biomédicale de Rabat suit une procédure de qualité de son fonctionnement et se base pour ses délibérations sur :
 - La déclaration d'Helsinki (version 2008)
 - Les lignes directrices internationales d'éthique pour la recherche biomédicale impliquant des sujets humains du Conseil des Organisations internationales des Sciences médicales (CIOMS - version 2002)
 - La décision du ministère de la santé N°02/DRC 3 Décembre 2012 relative aux recherches biomédicales interventionnelles
 - La loi française fixant le règlement intérieur type devant être adopté par les comités de protection des personnes (Arrêté du 13 janvier 2010)
 - Son règlement intérieur
 - La réglementation marocaine concernant l'exercice de la médecine
 - Les spécificités socioculturelles et religieuses du Maroc
- Le Comité d'Ethique pour la Recherche Biomédicale de Rabat est enregistré auprès de l'Office for Human Research Protections de l'U.S. Department of Health and Human Services sous le n° IORG0006594 (<http://ohrp.cit.nih.gov/search/search.aspx>)

Pour le Comité d'Ethique pour la Recherche Biomédicale

~~Comité d'Ethique pour la
Recherche Biomédicale~~

Le Président
Pr. Jamal Eddine Ktiouet

ANNEXE III

Protocole d'extraction d'ADN par le Kit ISOLATE II Blood DNA Kit de Bioline :

Avant de commencer, il faut préparer le tampon de lavage GW2 et la protéinase K et préchauffer le tampon d'élution G à 70°C.

A. Préparation du tampon de lavage GW2

Ajouter 96% d'éthanol à 100% au tampon de lavage GW2 concentré : 24 mL pour le kit de préparation 10, 48 mL pour le kit de préparation 50 et 200 mL pour le kit de préparation 250.

B. Préparation du tampon de protéinase K

Ajouter le tampon PR à la protéinase K lyophilisée : 260 µl pour le kit de préparation 10, 1,35 mL pour le kit de préparation 50 et 3,35 mL x 2 pour le kit de préparation 250.

C. Etapes d'extraction

1. Lyse du sang

- ✓ Ajoutez 25 µl de protéinase K et 200 µl d'échantillon dans un tube de microcentrifugation de 1,5 mL (non fourni).
- ✓ Ajoutez 200 µl de tampon de lyse G3 et effectuez un vortex vigoureux pendant 10 20s.
- ✓ Incuber les échantillons à 70 °C pendant 10 à 15 minutes.

2. Ajustement des conditions de liaison de l'ADN

- ✓ Ajouter 210 µl d'éthanol (96-100 %) et mélanger au vortex.

3. Lier l'ADN

- ✓ Pour chaque préparation, placer une colonne de centrifugation d'ADN génomique ISOLATE II dans un tube de prélèvement et charger l'échantillon sur la colonne. S'assurer que tout le lysat est chargé.
- ✓ Centrifuger pendant 1 minute à 11 000 x g.
- ✓ Répéter à une force g plus élevée si les échantillons ne sont pas complètement filtrés par la matrice.
- ✓ Placez la colonne dans un nouveau tube de collecte (2 mL).

4. Lavage de la membrane de silice

- ✓ Ajouter 500 µl de tampon de lavage GW1. Centrifuger pendant 1 min à 11 000 x g. Placer la colonne dans un nouveau tube de collecte (2mL).
- ✓ Ajouter 600 µl de tampon de lavage GW2 à la colonne et centrifuger pendant 1 min à 11 000 x g. Jeter le flux et réutiliser le tube de collecte.

5. Sécher la membrane de silice

- ✓ Centrifuger pendant 1 min à 11 000 x g, pour éliminer l'éthanol résiduel.

- ✓ Placer la colonne d'essorage d'ADN génomique ISOLATE II dans un tube de microcentrifugation de 1,5 mL (non fourni).

6. Eluer l'ADN

- ✓ Ajouter 100 µl de tampon d'élution G préchauffé (70°C) directement sur la membrane de silice.
- ✓ Incuber à température ambiante pendant 1 min.
- ✓ Centrifuger 1 min à 11 000 x g.

ANNEXE IV

Purification Produits PCR :

1. Principe

La purification des produits de PCR a pour but d'enlever les amorces et les nucléotides (dNTPS) non utilisés durant la réaction de PCR.

2. Réactifs et équipements

- ✓ Kit de purification des produits de PCR, **ExoSAP-IT (Affymetrix)**
- ✓ Plaque de réaction (MicroAmp optical 96)
- ✓ Thermocycleur
- ✓ Glace
- ✓ Micropipettes P2, P10

3. Protocole

- ✓ Sortir le kit du congélateur -20°C, et le placer dans la glace pendant toute la durée de la Procédure.
- ✓ Mélanger dans la plaque de réaction, 5 µL du produit de la réaction de PCR et 2µL de l'ExoSAP-IT, pour un volume final de 7µL
- ✓ Incuber la plaque de réaction à 37°C pendant 15 min dans le thermocycleur pour dégrader les amorces et les nucléotides libres
- ✓ Incuber la plaque de réaction à 80°C pendant 15min pour inactiver l'ExoSAP-IT.
- ✓ Le Produit de la PCR est prêt pour le séquençage

ANNEXE V

Purification des produits de la réaction de séquence :

1. Principe

La purification de la réaction de séquence a pour but d'éliminer les sels, les ddNTPs, et les dNTPs non incorporés afin d'éviter leur injection dans les capillaires du séquenceur automatique.

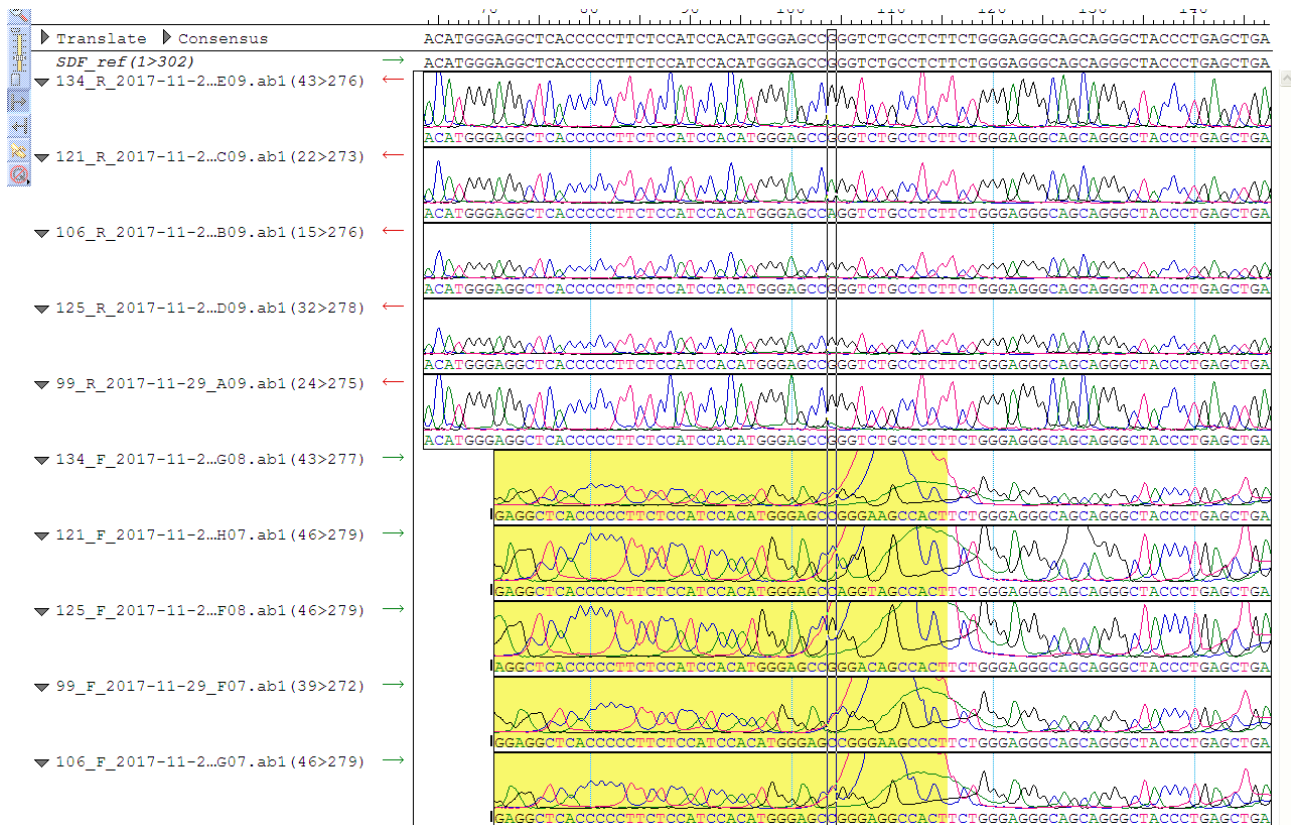
2. Réactifs et matériels

- ✓ Sephadex G50 superfine (SIGMA ALDRICH)
- ✓ 50 gr de G50 pour 1L d'eau milliQ, solution stockée à +4°C
- ✓ Plaque Multiscreen MSHAN45 (Millipore)
- ✓ Plaque 96 (MicroAmp, Applied Biosystems)

3. Protocole

- ✓ Adapter une microplaque à fond filtrant de 0.45 µm (plaque Multiscreen MSHAN45) sur une plaque de récupération à l'aide d'un joint (Adaptateur)
- ✓ Distribuer 300µL de G50 dans chaque puits
- ✓ Centrifuger à 1500g soit 2690rpm pendant 3 min
- ✓ Répéter les étapes 2 et 3.
- ✓ Ajouter 20µL d'eau miliQ (stérile) sur les produits de la réaction de séquence.
- ✓ Déposer 30µL des produits de la réaction de séquence au milieu des puits.
- ✓ Placer une plaque ABI comme plaque de récupération sous la plaque Multiscreen.
- ✓ Centrifuger à 1100g soit 2605 rpm pendant 5min.
- ✓ Passage des produits de la réaction de séquence dans le séquenceur automatique ABI 3130xl

ANNEXE VI

Electrophorogrammes des séquences sens et anti-sens du gène *SDF1* :

Etude de la prédisposition génétique à l'infection par le VIH-1 chez une cohorte marocaine : influence des polymorphismes *CCR5-Δ32* (rs333), *CCR2 +190 G>A* (rs1799864) & *SDF1 +801 G>A* (rs1801157)

Fatima Zahra FARISSI

Résumé

Les polymorphismes *CCR5-Δ32* (rs333), *CCR2+190G>A* (rs1799864) et *SDF1+801G>A* (rs1801157) des gènes codant respectivement pour les corécepteurs du VIH-1 : CCR5, CCR2 et le ligand SDF1 du corécepteur CXCR4, peuvent influencer la susceptibilité au VIH-1 et/ou la progression de l'infection.

L'objectif principal de cette étude cas-témoin était donc d'évaluer l'association des allèles mutés *CCR5Δ32*, *CCR2+190A* (64I) et *SDF1+801A* avec la susceptibilité au VIH-1, et les marqueurs de progression de la maladie chez les marocains.

Les groupes des patients et des témoins analysés comportaient 148 patients infectés par le VIH-1 et 342 témoins sains provenant de différentes régions du Maroc. Les méthodes du génotypage utilisées étaient principalement, l'amplification génique et le séquençage d'ADN. La comparaison entre les variables a été effectuée à l'aide du test χ^2 , test exact de Fisher, test de Mann-Whitney ou test ANOVA. Dans l'étude du *CCR2+190G>A*, et l'étude du *SDF1+801G>A*, les facteurs prédictifs de l'évolution immunovirologique ont été évalués par régression logistique.

L'allèle *CCR5-Δ32* est rare dans notre population. Par contre, les allèles *CCR2+190A*, et *SDF1 +801A* sont assez fréquents.

Aucun des polymorphismes étudiés n'a été associé à la susceptibilité au VIH-1 ($p > 0.05$). Concernant la progression de la maladie, les allèles *CCR5-Δ32* (à l'état hétérozygote) et *CCR2+190A* (homozygotes + hétérozygotes) pourraient ne pas influencer directement les marqueurs immunovirologiques de la progression de la maladie chez les patients infectés par le VIH-1 sous traitement antirétroviral ($p > 0.05$). L'allèle *SDF1+801A* a été par contre significativement associé à une bonne évolution immunovirologique après un an de traitement ($p=0.03$). En outre, le portage de deux allèles mutés *CCR2+190A* et *SDF1+801A* est un facteur prédictif d'une bonne restauration immunologique et un bon contrôle virologique ($p=0.02$).

Le *SDF1+801G>A*, seul ou en association avec le *CCR2+190G>A*, pourrait être un indicateur pronostique puissant de la progression de la maladie chez les patients sous thérapie antirétrovirale au Maroc.

Mots clés : VIH-1, *CCR5-Δ32* ; *CCR2+190G>A* ; *SDF1+801G>A* ; susceptibilité ; progression de la maladie ; Maroc

Abstract

The *CCR5-Δ32* (rs333), *CCR2 +190G>A* (rs1799864) and *SDF1 +801G>A* (rs1801157) polymorphisms of the genes coding respectively for the HIV-1 coreceptors: CCR5, CCR2 and the ligand for CXCR4 coreceptor: SDF1, may influence susceptibility to HIV-1 and/or disease progression.

The main objective of this case-control study was therefore to evaluate the association between *CCR5-Δ32*, *CCR2 +190A* (64I) and *SDF1 +801A* mutated alleles and susceptibility to HIV-1 infection, as well as markers of HIV-1 disease progression in the Moroccan population.

The analyzed cases and controls groups consisted of a total of 148 HIV-1 infected patients and 342 healthy controls from different regions of Morocco. The genotyping methods used were mainly amplification by Polymerase Chain Reaction and DNA sequencing. Comparison between variables was performed using the χ^2 test, Fisher exact test, Mann-Whitney U test, or ANOVA test. In the *CCR2 +190G>A* and *SDF1 +801G>A* analysis, the predictive factors for immunovirologic outcomes were assessed using logistic regression analysis.

The *CCR5-Δ32* allele is rare in our population. On the other hand, the *CCR2 +190A*, and *SDF1 +801A* alleles are quite frequent. None of the polymorphisms studied was associated with susceptibility to HIV-1 ($p > 0.05$). Regarding HIV-1 disease progression, the *CCR5-Δ32* allele (heterozygous state) and the *CCR2 +190A* allele (homozygous + heterozygous) might not directly affect the immunovirological markers of disease progression in HIV-1 infected patients undergoing antiretroviral therapy ($p > 0.05$). Carrying the *SDF1 +801A* allele, on the other hand, was significantly associated with better immunovirological outcomes after one year of treatment ($p=0.03$). In addition, the carriage of two mutated alleles *CCR2 +190A* and *SDF1 +801A* is a predictive factor for better immunological recovery and virological outcome ($p=0.02$).

The *SDF1 +801G>A*, alone or combined with the *CCR2 +190G>A* polymorphism, could be a powerful prognostic indicator of HIV-1 disease progression among patients undergoing antiretroviral therapy in Morocco.

Keywords: HIV-1, *CCR5-Δ32*; *CCR2 +190G>A*; *SDF1 +801G>A*; susceptibility; disease progression; Morocco

Structure de recherche accréditée : Equipe de recherche en virologie moléculaire et oncobiologie du centre de Génomique des Pathologies Humaines (GENOPATH)