

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 26.08.02.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 14.03.03 Bulletin 03/11.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été établi à la date de publication de la demande.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés : Division demandée le 26/08/02 bénéficiant de la date de dépôt du 23/03/01 de la demande initiale n° 01 03970.

⑦1 Demandeur(s) : BIOALLIANCE PHARMA Société anonyme — FR et INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM — FR.

⑦2 Inventeur(s) : CLAVEL FRANCOIS, MAMMANO FABRIZIO, RACE ESTHER, DAM ELISABETH, OBRY VERONIQUE et TROUPLIN VIRGINIE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : BREESE MAJEROWICZ SIMONNOT.

⑤4 NOUVELLE METHODE D'ANALYSE DES CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES DES VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE(HIV).

⑤7 La présente invention concerne une méthode d'analyse des caractéristiques phénotypiques présentées par certaines souches de virus, notamment les virus de l'immunodéficience humaine, mettant en oeuvre la construction d'un virus recombinant obtenu par recombinaison homologue.

La présente invention concerne également un kit comprenant les amorces, les vecteurs, les hôtes cellulaires, les produits et réactifs nécessaires pour réaliser une amplification par PCR, et les produits et réactifs permettant la détection d'un marqueur, pour la mise en oeuvre de la méthode de l'invention.



NOUVELLE METHODE D'ANALYSE DES CARACTERISTIQUES  
PHENOTYPIQUES DES VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH)

5 La présente invention concerne une méthode  
d'analyse des caractéristiques phénotypiques qui  
présentent certaines souches de virus, notamment de virus  
VIH.

10 Des tests génotypiques qui sont rapides et  
largement disponibles pour détecter la présence de  
mutations dans les gènes viraux ont été développées par  
exemple pour détecter des mutations présentes dans les  
gènes codant pour la protéase ou la transcriptase inverse  
de VIH.

15 Bien que certaines mutations aient été  
associées à un inhibiteur particulier de l'activité  
virale, bien d'autres sont associés avec le traitement  
par plusieurs molécules. De plus, avec le développement  
de nouvelles molécules d'inhibiteurs, le génotypage de  
20 variantes des virus qui échappent aux traitements devient  
de plus en plus complexe. Ceci rend difficile  
l'évaluation et le fait de savoir vis-à-vis de quels  
inhibiteurs les virus deviennent résistants ou conservent  
encore une légère susceptibilité. Dans ces circonstances,  
la présence et l'accumulation de mutations de résistance  
25 peuvent sûrement constituer un bon indice de l'évolution  
de la résistance, mais la simple détection de ces  
mutations au niveau génotypique ne suffit plus pour  
évaluer quantitativement le niveau de résistance, un  
paramètre qui s'avère crucial pour optimiser les  
30 orientations thérapeutiques de patients chez qui la  
thérapie antivirale est défailante.

Les caractéristiques phénotypiques des virus  
sont liées aux divers aspects du comportement viral et

directement impliquées dans des nombreuses interactions entre lesdits virus et leur environnement.

5 Seuls les tests phénotypiques, qui mesurent directement dans le milieu de culture la modification de la caractéristique phénotypique du virus, telle que l'inhibition de l'activité virale, par exemple en présence de composés inhibiteurs de ladite activité virale, fournissent un indice quantitatif de la  
10 résistance.

D'autres caractéristiques phénotypiques dont l'analyse s'avère intéressant, notamment d'un point de vue médical, sont celles qui confèrent à un virus sa  
15 résistance vis-à-vis des agents inhibiteurs susceptibles de bloquer au moins un mécanisme impliqué dans l'activité virale, celles qui confèrent à un virus sa capacité répllicative, celles qui confèrent à un virus son tropisme envers des cibles particulières ou encore celles qui  
20 confèrent à un virus son aptitude à être neutralisé par des molécules, tels des anticorps, des chimiokines ou des inhibiteurs.

Parmi les caractéristiques phénotypiques du  
25 virus VIH dont l'analyse présente un intérêt particulier du point de vue médical, se trouvent celles liées à l'expression des gènes, susceptibles de subir au moins une mutation, situés dans les régions GAG, ENV, ou POL du génome viral, telles que celles ci-dessous énumérées :

30

### I Infectivité, capacité répllicative et virulence.

Ces caractéristiques phénotypiques des virus VIH peuvent être liées à la fonction de toutes les

régions du génome virale, qu'il s'agisse des parties codant pour des protéines ou des régions intervenant dans les différents mécanismes ou étapes du cycle répliatif viral. En particulier il est important d'évaluer l'effet produit par les mutations dans le gènes codant pour la protéase, la transcriptase inverse, l'intégrase ou l'enveloppe sur la répliation des virus et tout particulièrement chez les virus ayant développé une résistance aux agents antiviraux.

Son analyse permet de mesurer la capacité répliative d'un virus, aussi appelée infectivité ou " fitness ".

## II Susceptibilité/Résistance aux inhibiteurs de transcriptase inverse.

Cette caractéristique phénotypique des virus VIH est liée à l'expression d'une partie de la région POL codant pour la transcriptase inverse.

Son analyse permet l'ajustement des traitements antirétroviraux par les analogues nucléosidiques ou les inhibiteurs de transcriptase inverse non nucléosidiques (NNRTI).

## III Susceptibilité/Résistance aux inhibiteurs d'intégrase.

Cette caractéristique phénotypique des virus VIH est liée à l'expression d'une partie de la région POL codant pour l'intégrase.

Son analyse fournit des indications pour l'ajustement des traitements antirétroviraux par les inhibiteurs d'intégrases.

IV. Susceptibilité/Résistance aux inhibiteurs d'entrée du virus dans la cellule cible.

5 Cette caractéristique phénotypique des virus VIH est liée à l'expression de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH et en particulier à l'expression de la sous-unité transmembranaire de ladite glycoprotéine codée par une partie du gène ENV.

10 L'analyse de cette caractéristique phénotypique permet la mise en évidence de l'action des agents inhibiteurs qui bloquent la fusion de la membrane virale avec la membrane de la cellule cible.

V Susceptibilité/Résistance aux inhibiteurs ciblant les corécepteurs des virus VIH.

15 Cette caractéristique phénotypique est liée également à l'expression d'au moins une partie de la région ENV des virus VIH qui code pour des polypeptides qui se participent à la liaison avec des corécepteurs de la cellule cible. L'interaction enveloppe/corécepteur permet l'entrée du virus VIH dans ladite cellule cible.

20 Son analyse permet de mesurer la résistance des virus VIH à l'action des inhibiteurs bloquant les corécepteurs utilisés par le VIH pour effectuer son entrée dans la cellule cible.

25 Les agents inhibiteurs interfèrent avec le co-récepteur en inhibant son interaction avec l'enveloppe du VIH.

30 En particulier il est important d'évaluer l'effet des mutations dans la région ENV qui modifient l'interaction de certaines régions de la protéine d'enveloppe avec les récepteurs CXCR4 ou CCR5 des cellules cible des VIH.

## VI Tropisme

Cette caractéristique phénotypique est aussi liée à l'expression d'au moins une partie de la région ENV codant pour des polypeptides de l'enveloppe des virus VIH, qui participent à la liaison avec un ou plusieurs récepteurs de la cellule cible, en particulier avec les corécepteurs CXCR4 ou CCR5

Son analyse permet de mesurer in vivo la capacité du virus VIH à utiliser lesdits récepteurs, notamment CXCR4 ou CCR5, qui sont exprimés de façon différente dans divers types cellulaires et permet de savoir si le virus utilise l'un ou l'autre des récepteurs, ou les deux.

Les indications fournies par cette analyse permettent de déduire le comportement viral dans certains types de cellules, cibles naturelles des VIH.

## VII Virulence.

Cette caractéristique phénotypique est aussi liée à l'expression de tout ou partie de la région ENV qui code pour les polypeptides d'enveloppe des virus VIH.

Son analyse permet d'évaluer le pouvoir cytopathogène d'un virus VIH.

## VIII Capacité neutralisante.

Cette caractéristique phénotypique est aussi liée à l'expression des protéines d'enveloppe des virus VIH.

Son analyse permet d'évaluer la susceptibilité des virus à l'action inhibitrice des anticorps ou des substances naturellement présentes dans l'organisme et présentes dans le sérum ou dans d'autres fluides.

Les premiers tests pour détecter par exemple la caractéristique phénotypique de résistance des virus VIH aux traitements antiviraux ont été effectués en utilisant des isolats primaires et des lymphocytes du sang périphérique (PBL) stimulés par de la phytoagglutinine (PHA) selon une procédure laborieuse et difficilement reproductible. Une alternative innovante à ces tests, un test de virus recombinant, ci-après nommé RVA, a été proposée par Kellam et Larder en 1994.

Cette méthode d'analyse RVA, mesurait la résistance d'un virus recombinant portant la transcriptase inverse isolé du plasma d'un patient porteur du virus par co-transfection des séquences de celui-ci dûment amplifiées par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR), avec un clone de virus obtenu en laboratoire, lequel est délété de sa transcriptase inverse et est compétent pour la répllication dans une variété de lignées cellulaires bien établies.

Plusieurs modifications de cette méthode ont maintenant été décrites (Boucher, C., Keulen, W., Bommel, T., Nijhuis, M., Jong, D., Jong, M., Schipper, P. and Back, N., K. (1996) « HIV-1 drug susceptibility determination by using recombinant viruses generated from patient sera tested in a cell-killing assay. Antimicrobial Agents and Chemotherapy" 40(10), 2404-2409) (Shi, C. and Mellors, J.W. (1997) "A recombinant retroviral system for rapid in vivo analysis of human immunodeficiency virus type 1 susceptibility to reverse transcriptase inhibitors". Antimicrob Agents Chemother 41(12), 2781-5) (Hertogs, K., de Bethune, M.P., Miller, V., Ivens, T., Schel, P., Van Cauwenberge, A., Van Den Eynde, C., Van Gerwen, V., Azijn, H., Van Houtte, M.,

Peeters, F., Staszewski, S., Conant, M., Bloor, S., Kemp, S., Larder, B. and Pauwels, R. (1998) "A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs". Antimicrob Agents Chemother 42(2), 269-76.) (Hecht, F.M., Grant, R.M., Petropoulos, C.J., Dillon, B., Chesney, M.A., Tian, H., Hellmann, N.S., Bandrapalli, N.I., Digilio, L., Branson, B. and Kahn, J.O. (1998) "Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple reverse- transcriptase and protease inhibitors". N Engl J Med 339(5), 307-11) (Medina, D.J., Tung, P.P., Nelson, C.J., Sathya, B., Casareale, D. and Strair, R.K. (1998) "Characterization and use of a recombinant retroviral system for the analysis of drug resistant HIV". J Virol Methods 71(2), 169-76).

Cependant, la plupart de ces systèmes recombinants présentent des inconvénients car , comme pour la méthode utilisant des PBMC, la production d'une réserve de particules infectieuses exprimant une caractéristique phénotypique particulière que l'on cherche à détecter et à mesurer nécessite une amplification du virus par croissance exponentielle des cellules lymphocytaires. Le virus est alors soumis à des dérives génétiques pendant sa répllication et peut perdre des mutations qui sont essentielles pour l'expression de la caractéristique phénotypique recherchée modifiant ainsi la fiabilité de la méthode.

Un autre inconvénient pour déceler par exemple une caractéristique phénotypique de résistance qui est présent dans les méthodes d'analyse de l'art

antérieur provient du fait que la présence simultanée de plusieurs mutations susceptibles de conférer une résistance vis-à-vis des différents inhibiteurs rétroviraux réduit la capacité répliquative du virus.

5

Les inventeurs ont développé une nouvelle méthode d'analyse d'une caractéristique phénotypique des virus VIH qui ne nécessite qu'un cycle unique de répliqua-tion.

10

Cette méthode d'analyse est basée sur la construction d'un virus recombinant (RAV) obtenu par co-transfection et recombinaison homologue avec :

15

a) les séquences d'ADN obtenues à partir d'un VIH à analyser susceptibles de comprendre des mutations susceptibles de modifier la caractéristique phénotypique recherchée, lesdites séquences étant extraites d'un milieu biologique tel que le plasma, le sérum, la salive, le sperme ou autres sécrétions, d'un patient porteur dudit virus,

20

b) un premier vecteur présentant une délétion spécifique des séquences permettant la répliqua-tion du VIH ainsi qu'une délétion de tout ou partie de la séquence conférant au VIH la caractéristique phénotypique recherchée et

25

c) un deuxième vecteur, par exemple un plasmide, comprenant les séquences complétant celles nécessaires à la répliqua-tion dudit virus et qui sont absentes du premier vecteur.

30

La méthode développée par les inventeurs est rapide, elle nécessite environ sept jours pour être réalisée et peut donc être utilisée pour des déterminations de routine tels que la mesure de la

susceptibilité des patients infectés par des VIH aux inhibiteurs de l'activité virale.

5 Ainsi, les inventeurs ont déjà décrit dans le brevet US 6 103 462 une première application de cette méthode d'analyse, basée sur la formation d'un virus recombinant particulier, pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à des inhibiteurs de la protéase.

10 Les nouvelles méthodes d'analyse mises en œuvre dans le cadre de la présente invention VIH, sont basées sur la détermination de caractéristiques phénotypiques des virus VIH associées à des mutations susceptibles d'être présentes au moins dans un gène  
15 choisi parmi le groupe comprenant les gènes gag, pol, protéase, transcriptase inverse, RNase H, intégrase, vif, vpr, tat, rev, vpu, env, nef, séquences cis-actives, LTR, séquences de dimérisation, séquences régulatrices de l'épissage, RRE au moyen de virus recombinants ad-hoc.

20 L'invention concerne donc une méthode d'analyse d'une caractéristique phénotypique des virus VIH présents dans un échantillon biologique d'un patient, ladite caractéristique phénotypique résultant d'une ou  
25 plusieurs mutations du génome viral susceptibles d'influencer l'infection virale, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- a) l'extraction des acides nucléiques contenus dans un échantillon biologique,
- 30 b) au moins une amplification par PCR d'un segment des acides nucléiques de l'étape (a), chacune avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique du génome viral susceptible de porter au moins une mutation,

c) la préparation d'un vecteur comprenant les parties d'un génome d'un virus VIH nécessaires à la répllication virale à l'exception du segment amplifié à l'étape (b) et éventuellement à l'exception du gène codant pour la protéine d'enveloppe,

d) la transfection d'un premier hôte cellulaire avec :

- les acides nucléiques obtenus à l'étape (b),

- le vecteur préparé à l'étape (c),

- éventuellement un second vecteur comprenant un gène codant pour une protéine d'enveloppe si le gène d'enveloppe est délété du vecteur préparé à l'étape (c),

pour obtenir par recombinaison homologue un virus chimérique,

e) la culture dudit premier hôte cellulaire dans des conditions permettant de produire des particules virales au cours d'un seul cycle de répllication,

f) l'infection par les particules virales obtenues à l'étape (e) d'au moins un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH ou un virus pseudotypé VIH et comportant éventuellement un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale, et

g) la détection et/ou la quantification du marqueur exprimé à l'étape (f) afin de mettre en évidence au moins une caractéristique phénotypique des virus VIH présents dans l'échantillon biologique.

Plus particulièrement, l'amplification par PCR de l'étape (b) est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique comprenant tout ou partie d'une région du génome virale choisie parmi: gag, pol, protéase, transcriptase inverse, RNase H,

intégrase, vif, vpr, tat, rev, vpu, env, nef, séquences cis-actives, LTR, séquences de dimérisation, séquences régulatrices de l'épissage ou l'élément de réponse de Rev (RRE).

5

Selon un mode de mise en œuvre particulier de la méthode d'analyse de l'invention, l'amplification par PCR de l'étape (b) est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique codant pour une partie de la protéine gag du virus de l'immunodéficience humain et une séquence d'acide nucléique codant pour la protéase, susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéase et, en ce que le vecteur de l'étape (c) est construit à partir d'un génome d'un virus VIH où tout ou partie du gène codant pour la protéase est délété.

15

Avantageusement, l'amplification de l'étape (b) selon la méthode d'analyse de l'invention, d'une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéase est effectuée avec une paire d'amorces ayant une taille comprise entre 10 et 50 oligonucléotides, comprenant les séquences Fit A - : (5' TCA CCT AGA ACT TTA AAT GC 3') (SEQ ID No : 1) et Pro A- : (5' GGC AAA TAC TGG AGT ATT GTA TG3' 3') (SEQ ID No : 2), ou constitués par des fragments de celles-ci, ou encore des séquences analogues de celles-ci portant des mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la région du gène de la protéase portant la ou les mutations, suivie d'une deuxième amplification avec une paire d'amorces ayant une taille comprise entre 10 et 50 oligonucléotides, comprenant les séquences : Fit B : (5' AGA ACT TTA AAT GCA TGG GT 3')

20

25

30

(SEQ ID No : 3) et Pro B- : (5' GGA GTA TTG TAT GGA TTT  
TCA GG 3') (SEQ ID No : 4), ou constitués par des  
fragments de celles-ci, ou encore des séquences analogues  
de celles-ci portant des mutations d'un ou plusieurs  
nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle  
leur capacité à hybrider la région du gène de la protéase  
portant la ou les mutations

Tout préférentiellement, l'amplification de  
l'étape (b) selon la méthode d'analyse de l'invention,  
d'une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au  
moins une mutation dans le gène codant pour la protéase  
est effectuée avec une paire d'amorces :

Fit A - : (5' TCA CCT AGA ACT TTA AAT GC 3')  
(SEQ ID No : 1) et

Pro A- : (5' GGC AAA TAC TGG AGT ATT GTA TG3'  
3') (SEQ ID No : 2),

suivie d'une deuxième amplification avec une  
paire d'amorces :

Fit B : (5' AGA ACT TTA AAT GCA TGG GT 3')  
(SEQ ID No : 3) et

Pro B- : (5' GGA GTA TTG TAT GGA TTT TCA GG  
3') (SEQ ID No : 4),

pour obtenir un segment d'ADN de 1460 paires  
de bases, s'étendant entre les résidus 3950 et 5410  
inclus, et le vecteur de l'étape (c) est un vecteur  
retroviral délété de la région du cadre de lecture pol  
codant pour la protéase du VIH-1 s'étendant des résidus  
1505 à 2565 inclus, délété de la région d'enveloppe et  
comportant un site unique de restriction MluI.

Selon un deuxième mode de mise en œuvre  
particulier de la méthode d'analyse de l'invention,  
l'amplification par PCR de l'étape (b) de la méthode

d'analyse selon l'invention est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la transcriptase inverse, et la transfection de l'étape (c) est réalisée avec un premier vecteur construit à partir d'un génome d'un virus VIH où tout ou partie du gène codant pour la transcriptase inverse est délété.

Avantageusement, l'amplification de l'étape (b) selon la méthode d'analyse de l'invention, avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la transcriptase inverse est effectuée avec une paire d'amorces ayant une taille comprise entre 10 et 50 oligonucléotides, comprenant les séquences MJ3 (5' AGT AGG ACC TAC ACC TGT CA 3') (SEQ ID No : 5) et RT-EXT (5' TTC CCA ATG CAT ATT GTG AG 3') (SEQ ID No : 6), ou constitués par des fragments de celles-ci, ou encore des séquences analogues de celles-ci portant des mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la région du gène de la transcriptase portant au moins une mutation, suivie d'une deuxième étape d'amplification avec une paire d'amorces comprenant les séquences : A35 (5' TTG GTT GCA TAA ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT 3') (SEQ ID No : 7) et RT-IN (5' TTC CCA ATG CAT ATT GTG AG 3') (SEQ ID No : 8) ou constitués par des fragments de celles-ci, ou encore des séquences analogues de celles-ci portant des mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la région du gène de la transcriptase inverse portant au moins une mutation.

Tout préférentiellement, l'amplification de l'étape (b) selon la méthode d'analyse de l'invention, avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la transcriptase inverse est effectuée avec une paire d'amorces :

MJ3 (5' AGT AGG ACC TAC ACC TGT CA 3') (SEQ ID No : 5) et

RT-EXT (5' TTC CCA ATG CAT ATT GTG AG 3') (SEQ ID No : 6),

suivie d'une deuxième étape d'amplification avec une paire d'amorces :

A35 (5' TTG GTT GCA TAA ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT 3') (SEQ ID No : 7) et

RT-IN (5' TTC CCA ATG CAT ATT GTG AG 3') (SEQ ID No : 8)

pour obtenir un segment d'ADN de 1530 paires de bases s'étendant au-delà du codon 93 de la région codant pour la protéase et au-delà du codon 503 de la région codant pour la polymérase (POL) et le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de la région du cadre de lecture pol codant pour la transcriptase inverse du VIH-1, s'étendant des résidus 2618 à 2872 inclus, et comportant un site unique de restriction MluI.

L'invention concerne également une méthode d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à un composé inhibiteur de la transcriptase inverse, consistant à ajouter ou non ledit composé inhibiteur de la transcriptase inverse, éventuellement à des concentrations différentes, au deuxième hôte cellulaire, préalablement à l'infection de celui-ci par les particules virales obtenues à l'étape (e), et comprenant à l'étape (g) la comparaison de l'expression du gène

marqueur avec et sans composé inhibiteur de la transcriptase inverse

5 Selon un troisième mode de mise en oeuvre particulier de la méthode d'analyse de l'invention, l'amplification par PCR de l'étape (b) est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour l'intégrase, et le vecteur de 10 l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de tout ou partie du gène codant pour l'intégrase.

Avantageusement, l'amplification de l'étape (b) selon la méthode d'analyse de l'invention avec une 15 paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour l'intégrase est effectuée avec la paire d'amorces ayant une taille comprise entre 10 et 50 oligonucléotides, comprenant les séquences :INT B+ - 20 5'GTTACTAATAGAGGAAGACAAA3' (SEQ ID No: 9) et INT B- 5'TTTTGGTGTTATTAATGCT3' (SEQ ID No: 10), ou encore des séquences analogues de celles-ci portant des mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la région du 25 gène de l'intégrase portant au moins une mutation, suivie d'une deuxième étape d'amplification, avec la paire d'amorces : INT V+ 5'CACCCTAACTGACACAACAA3' (SEQ ID No: 11) et INT V- 5'AAGGCCTTTCTTATAGCAGA3' (SEQ ID No: 12), ou encore des séquences analogues de celles-ci portant 30 des mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la région du gène de l'intégrase portant au moins une mutation

Tout préférentiellement, l'amplification de l'étape (b) selon la méthode d'analyse de l'invention avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour l'intégrase est effectuée avec la paire d'amorces :

INT B+ -5'GTTACTAATAGAGGAAGACAAA3' (SEQ ID No: 9) et

INT B- 5'TTTTGGTGTTATTAATGCT3' (SEQ ID No: 10),

suivie d'une deuxième étape d'amplification, avec la paire d'amorces :

INT V+ 5'CACCCTAACTGACACAACAA3' (SEQ ID No: 11) et

INT V- 5'AAGGCCTTTCTTATAGCAGA3' (SEQ ID No: 12),

pour obtenir un fragment d'ADN de 1460 paires de bases s'étendant des résidus 3950 à 5410 inclus et le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de toute la région du cadre de lecture pol codant pour l'intégrase du VIH-1 s'étendant des résidus 4228 à 5093 inclus et de la région codant pour l'enveloppe virale entre les positions 6343 et 7611 incluses.

L'invention concerne également une méthode d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à un composé inhibiteur de l'intégrase, consistant à ajouter ou non ledit composé inhibiteur de l'intégrase, éventuellement à des concentrations différentes, durant l'étape (e), avant l'étape (f) et comprenant à l'étape (g) la comparaison de l'expression du gène marqueur avec et sans composé inhibiteur de l'intégrase.

Selon un quatrième mode particulier de mise en œuvre de la méthode d'analyse de l'invention l'amplification par PCR de l'étape (b) est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe, et le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral construit à partir d'un génome d'un virus VIH où tout ou partie du gène codant pour la protéine d'enveloppe est délété.

Préférentiellement le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la portion extracellulaire de la sous-unité gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 7745 à 8263 inclus, de la région du génome VIH-1 constitutrice de l'élément de réponse à Rev (RRE).

Avantageusement, l'amplification de l'étape (b) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe est effectuée avec une paire d'amorces ayant une taille comprise entre 10 et 50 oligonucléotides, comprenant soit les séquences :FIN-A : 5'TCAAATATTACAGGGCTGCT3' (SEQ ID No: 13) et FIN-B : 5'TAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 14), soit les séquences FuA : 5'AAGCAATGTATGCCCTCCCAT3' (SEQ ID No: 23) et FuB : 5'GGTGGTAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 24) ou constitués par des fragments de celles-ci ou encore par des séquences analogues de celles-ci portant des mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la région du gène de l'enveloppe portant au moins une mutation suivie d'une deuxième étape d'amplification, effectuée avec une paire d'amorces ayant

une taille comprise entre 10 et 50 oligonucléotides, comprenant soit les séquences : FIN-C : 5'CTATTAACAAGAGATGGTGG3' (SEQ ID No: 15) et FIN-D : 5'TCCACCTTCTTCTTCGATT3' (SEQ ID No: 16), soit les séquences FuC : 5'ATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGA3' (SEQ ID No: 25), utilisée en combinaison avec un mélange de deux séquences suivantes : FuD1 : 5'TCTGTCTCTCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 26) et FuD2 : 5'TCTGTCTTGCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 27) ou constitués par des fragments de celles-ci, ou encore par des séquences analogues de celles-ci portant des mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la région du gène de l'enveloppe portant au moins une mutation

Tout préférentiellement, l'amplification de l'étape (b) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe est effectuée avec une paire d'amorces :

FIN-A : 5'TCAAATATTACAGGGCTGCT3' (SEQ ID No: 13) et

FIN-B : 5'TAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 14) suivie d'une deuxième étape d'amplification, effectuée avec la paire d'amorces :

FIN-C : 5'CTATTAACAAGAGATGGTGG3' (SEQ ID No: 15) et

FIN-D : 5'TCCACCTTCTTCTTCGATT3' (SEQ ID No: 16),

pour obtenir un segment d'ADN de 965 paires de bases s'étendant des résidus 7553 à 8517 inclus et le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la portion extracellulaire

de la sous-unité gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 7745 à 8263 inclus, et comporte un site de restriction unique Mull.

5 Tout préférentiellement, la méthode d'analyse selon l'invention permet l'amplification de séquences de la région d'enveloppe de virus VIH quel que soit leur sous-type et en particulier des virus des sous-types A,B,C,D et E), en utilisant pour l'amplification de l'étape (b) avec une paire d'amorces encadrant une 10 séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe est effectuée avec une paire d'amorces :

15 FuA : 5'AAGCAATGTATGCCCTCCCAT3' (SEQ ID No: 23) et

FuB : 5' GGTGGTAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 24)

suivie d'une deuxième étape d'amplification, effectuée avec l'amorce :

20 FuC : 5'ATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGA3' (SEQ ID No: 25)

et un mélange des amorces suivantes :

FuD1 :5'TCTGTCTCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 26)

25 FuD2 :5'TCTGTCTTGCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 27) ,

ledit mélange étant préférentiellement effectué dans un rapport compris entre (10% :90%) et (90% :10%) et tout préférentiellement entre (60% :40%) et (40% :60%), 30

pour obtenir un segment d'ADN de 805 paires de bases s'étendant des résidus 7635 à 8440 inclus et le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la portion extracellulaire

de la sous-unité gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 7745 à 8263 inclus, et comporte un site de restriction unique Mull1.

5                   Avantageusement, l'amplification de l'étape  
(b) avec une paire d'amorces encadrant une séquence  
d'acide nucléique susceptible de porter au moins une  
mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe  
est effectuée avec une paire d'amorces ayant une taille  
10 comprise entre 10 et 50 oligonucléotides, comprenant les  
séquences : NEU-A : 5'TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATG3' (SEQ  
ID No: 17) et FIN-B : 5'TAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No:  
14) ou FuB : 5' GGTGGTAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 24)  
ou constitués par des fragments de celles-ci, ou encore  
15 par des séquences analogues de celles-ci portant des  
mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient  
pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la  
région du gène de l'enveloppe portant au moins une  
mutation, suivie d'une deuxième étape d'amplification,  
20 avec la paire d'amorces ayant une taille comprise entre  
10 et 50 oligonucléotides, comprenant les séquences :  
NEU-C : 5'GTGGGTCACAGTCTATTATGGGG3' (SEQ ID No: 18) et  
FIN-D : 5'TCCACCTTCTTCTTCGATT3' (SEQ ID No: 16) ou un  
mélange des séquences suivantes :  
25 FuD1 :5'TCTGTCTCTCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 26) et  
FuD2 :5'TCTGTCTTGCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 27), ou  
constitués par des fragments de celles-ci, ou encore par  
des séquences analogues de celles-ci portant des  
mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient  
30 pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la  
région du gène de l'enveloppe portant au moins une  
mutation.

Tout préférentiellement, l'amplification de l'étape (b) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe est effectuée avec une paire d'amorces :

NEU-A : 5'TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATG3' (SEQ ID No: 17) et

FIN-B : 5'TAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 14), suivie d'une deuxième étape d'amplification, avec la paire d'amorces:

NEU-C : 5'GTGGGTCACAGTCTATTATGGGG3' (SEQ ID No: 18) et

FIN-D : 5'TCCACCTTCTTCTTCGATT3' (SEQ ID No: 16),

pour obtenir un fragment d'ADN de 2320 paires de bases s'étendant des résidus 6197 à 8517 inclus et le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la majorité de la sous-unité gp120 et de la portion extracellulaire de la gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 6480 à 8263 inclus, et comporte un site de restriction unique M<sub>u</sub>11.

Tout préférentiellement, l'amplification de l'étape (b) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe est effectuée avec une paire d'amorces :

NEU-A : 5'TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATG3' (SEQ ID No: 17) et

FuB : 5' GGTGGTAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 24), suivie d'une deuxième étape d'amplification, avec les amorces:

NEU-C : 5'GTGGGTCACAGTCTATTATGGGG3' (SEQ ID No: 18) et un mélange des amorces suivantes

FuD1 :5'TCTGTCTCTCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 26) et

5 FuD2 :5'TCTGTCTTGCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 27),

ledit mélange étant préférentiellement effectué dans un rapport compris entre (10% :90%) et (90% :10%) et tout préférentiellement entre (60% :40%) et 10 (40% :60%),

pour obtenir un fragment d'ADN de 2118 paires de bases s'étendant des résidus 6322 à 8440 inclus et le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la majorité de la sous-unité gp120 et de la portion extracellulaire de la gp41 15 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 6480 à 8263 inclus, et comporte un site de restriction unique Mull.

20 Avantageusement, l'amplification de l'étape (b) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour la protéine d'enveloppe est effectuée avec une paire d'amorces ayant une taille 25 comprise entre 10 et 50 oligonucléotides, comprenant les séquences : E00 : 5'TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGA3' (SEQ ID No: 19) et ES8B : 5'CACTTCTCCAATTGTCCCTCA3' (SEQ ID No: 20), ou constitués par des fragments de celles-ci, ou encore par des séquences analogues de celles-ci portant 30 des mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la région du gène de l'enveloppe portant au moins une mutation, suivie d'une deuxième étape d'amplification, avec une paire d'amorces ayant une

taille comprise entre 10 et 50 oligonucléotides  
comprenant les séquences : E20 :  
5'GGGCCACACATGCCTGTGTACCCACAG3' (SEQ ID No: 21) et E115 :  
5'AGAAAAATTCCCCTCCACAATTAA3' (SEQ ID No: 22), ou encore  
5 par des séquences analogues de celles-ci portant des  
mutations d'un ou plusieurs nucléotides qui ne modifient  
pas de manière essentielle leur capacité à hybrider la  
région du gène de la protéase portant au moins une  
mutation.

10 Tout préférentiellement, l'amplification de  
l'étape (b) avec une paire d'amorces encadrant une  
séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins  
une mutation dans le gène codant pour la protéine  
15 d'enveloppe est effectuée avec une paire d'amorces :

E00 : 5'TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGA3' (SEQ  
ID No: 19) et

ES8B : 5'CACTTCTCCAATTGTCCCTCA3' (SEQ ID No:  
20),

20 suivie d'une deuxième étape d'amplification,  
avec la paire d'amorces:

E20: 5'GGGCCACACATGCCTGTGTACCCACAG3' (SEQ ID  
No: 21) et

E115 : 5'AGAAAAATTCCCCTCCACAATTAA3' (SEQ ID  
25 No: 22),

30 pour obtenir un segment d'ADN de 938 paires  
de bases s'étendant des résidus 6426 à 7364 inclus et le  
vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété  
de la région, codant pour les domaines allant de la  
boucle V1 à la boucle V3 de l'enveloppe du VIH-1  
s'étendant de 6617 à 7250 inclus et comporte un site de  
restriction unique NheI.

L'invention concerne également une méthode d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à un composé inhibiteur de fusion ciblant la protéine gp41 du VIH-1, consistant à effectuer l'amplification de l'étape (b) soit avec la paire d'amorces SEQ ID No : 13 , SEQ ID No : 14 suivie d'une deuxième amplification avec la paire d'amorces SEQ ID No : 15 SEQ ID No : 16, soit avec la paire d'amorces SEQ ID No : 17 SEQ ID No : 18 suivie d'une deuxième amplification avec la paire d'amorces SEQ ID No : 18 , SEQ ID No : 16, à ajouter ou non ledit composé inhibiteur de fusion, éventuellement à des concentrations différentes, durant la culture de l'hôte cellulaire obtenu à l'étape (e), avant l'étape (f) et comprenant à l'étape (g) la comparaison de l'expression du gène marqueur avec et sans composé inhibiteur de fusion ciblant la gp41 du VIH-1.

L'invention concerne également une méthode d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à un composé inhibiteur d'entrée dudit virus VIH dans une cellule cible, consistant à effectuer l'amplification de l'étape (b) avec la paire d'amorces SEQ ID No : 17 et SEQ ID No : 18 suivie d'une deuxième amplification avec la paire d'amorces SEQ ID No : 18 et SEQ ID No : 16, à ajouter ou non ledit composé inhibiteur d'entrée, éventuellement à des concentrations différentes, à l'hôte cellulaire obtenu à l'étape (e) avant l'infection de l'étape (f) et comprenant à l'étape (g) la comparaison de l'expression du gène marqueur avec et sans composé inhibiteur d'entrée.

L'invention concerne également une méthode d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à l'action inhibitrice des anticorps, consistant à

effectuer l'amplification de l'étape (b) avec la paire d'amorces SEQ ID No : 17 SEQ ID No : 18 suivie d'une deuxième amplification avec la paire d'amorces SEQ ID No : 18 , SEQ ID No : 16, à ajouter ou non lesdits anticorps durant l'étape (e) de culture, éventuellement à des concentrations différentes et comprenant à l'étape (g) la comparaison de l'expression du gène marqueur avec et sans anticorps.

L'invention concerne également une méthode d'analyse pour déterminer le tropisme d'un virus VIH pour un récepteur cellulaire, consistant à effectuer l'amplification de l'étape (b) avec la paire d'amorces SEQ ID No : 17 SEQ ID No : 18 suivie d'une deuxième amplification avec la paire d'amorces SEQ ID No : 18 , SEQ ID No : 16, à effectuer l'infection de l'étape (f) avec les particules virales obtenues à l'étape (e) sur deux hôtes cellulaires distincts et comprenant à l'étape (g) la comparaison de l'expression du gène marqueur par chacun des deux hôtes cellulaires distincts.

Avantageusement les hôtes cellulaires utilisés pour l'infection de l'étape (f) selon la méthode d'analyse de l'invention sont choisis parmi des hôtes cellulaires exprimant le récepteur CCR5 ou le récepteur CXCR4.

L'invention concerne également une méthode d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à un composé inhibiteur ciblant les corécepteurs du VIH-1, consistant à effectuer l'amplification de l'étape (b) avec la paire d'amorces SEQ ID No : 17 SEQ ID No : 18 suivie d'une deuxième amplification avec la paire d'amorces SEQ ID No : 18 , SEQ ID No : 16, à ajouter ou

non ledit composé inhibiteur ciblant les corécepteurs du VIH-1, éventuellement à des concentrations différentes, durant l'étape (e) de culture, l'infection de l'étape (f) étant effectuée sur deux hôtes cellulaires distincts et  
5 comprenant à l'étape (g) la comparaison de l'expression du gène marqueur par chacun des deux hôtes cellulaires distincts.

L'invention concerne également une méthode  
10 d'analyse pour déterminer le tropisme d'un virus VIH pour un récepteur cellulaire, consistant à effectuer l'amplification de l'étape (b) avec la paire d'amorces SEQ ID No : 19 et SEQ ID No : 20, suivie d'une deuxième amplification avec la paire d'amorces SEQ ID No : 21 et  
15 SEQ ID No : 22, à infecter à l'étape (f) deux hôtes cellulaires distincts avec les particules virales obtenues à l'étape (e) et comprenant à l'étape (g) la comparaison de l'expression du gène marqueur par chacun des deux hôtes cellulaires distincts.

L'invention concerne également une méthode  
20 d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à un composé inhibiteur ciblant les corécepteurs du VIH-1, consistant à effectuer l'amplification de l'étape (b) avec la paire d'amorces SEQ ID No : 19 et SEQ ID No :  
25 20 suivie d'une deuxième amplification avec la paire d'amorces SEQ ID No : 21 et SEQ ID No : 22, à ajouter ou non ledit composé inhibiteur ciblant les corécepteurs du VIH-1, éventuellement à des concentrations différentes, durant la culture de l'étape (d), à effectuer l'infection  
30 de l'étape (f) avec les particules virales obtenues à l'étape (e) sur deux hôtes cellulaires distincts et à comparer à l'étape (g) l'expression du gène marqueur par chacun des deux hôtes cellulaires distincts.

L'invention concerne également une méthode d'analyse pour déterminer l'infectivité ou la capacité répliquative d'un virus VIH consistant à comparer à l'étape (g) l'expression du gène marqueur par le second hôte cellulaire infecté avec les particules virales obtenues en appliquant les étapes (a) à (f) à un échantillon biologique d'un patient, et l'expression du gène marqueur par le même second hôte cellulaire infecté avec des particules virales de référence obtenues en appliquant les étapes (a) à (f) à un échantillon contenant un virus de référence.

Avantageusement les particules virales de référence issues d'un virus de référence sont des particules virales obtenues par l'application des étapes (a) à (f) à un échantillon biologique du même patient à un stade préalable du traitement thérapeutique ou avant celui-ci.

L'invention concerne également une méthode d'analyse pour déterminer la virulence d'un virus VIH consistant à effectuer l'amplification de l'étape (b) soit avec la paire d'amorces SEQ ID No : 13 , SEQ ID No : 14 suivie d'une deuxième amplification avec la paire d'amorces SEQ ID No : 15 SEQ ID No : 16, soit avec la paire d'amorces SEQ ID No : 17 SEQ ID No : 18 suivie d'une deuxième amplification avec la paire d'amorces SEQ ID No : 18 , SEQ ID No : 16, et à mesurer, lors de l'infection de l'étape (f), l'effet cytopathogène produit sur le second hôte cellulaire.

Avantageusement l'effet cytopathogène produit lors de l'infection de l'étape (f) sur le second hôte

cellulaire est mesuré au moyen des techniques de cytotoxicité telles que la mesure de l'induction de syncytia, de l'induction de l'apoptose ou par cytométrie de flux.

5

L'invention concerne également une méthode d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH à l'hydroxyurée, consistant à ajouter ou non de l'hydroxyurée, éventuellement à des concentrations différentes, soit durant l'étape (e) de culture, soit au deuxième hôte cellulaire et à effectuer à l'étape (g) la comparaison de l'expression du gène marqueur avec et sans hydroxyurée.

15

De manière préférentielle, la durée de l'étape de culture (e) selon la méthode de l'invention est comprise entre 12 et 72 heures, tout préférentiellement elle est comprise entre 24 et 48 heures.

20

L'invention a également pour objet un kit pour la mise en oeuvre d'une méthode d'analyse d'une caractéristique phénotypique des virus VIH présents dans un échantillon biologique d'un patient caractérisé en ce qu'il comprend :

25

i) une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique du génome viral susceptible de porter au moins une mutation,

30

ii) un vecteur comprenant les parties d'un génome d'un virus VIH nécessaires à la réplication virale à l'exception du segment amplifié avec les amorces définies en (i) et du gène codant pour la protéine d'enveloppe,

iii) un second vecteur comprenant un gène codant pour une protéine d'enveloppe,

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

Avantageusement, le kit selon l'invention comprend :

i) les paires d'amorces de séquences :

- SEQ ID No : 1 et SEQ ID No : 2

- SEQ ID No : 3 et SEQ ID No : 4

ii) un vecteur retroviral délété de la région du cadre de lecture pol codant pour la protéase du VIH-1 s'étendant des résidus 1505 à 2565 inclus, délété de la région d'enveloppe et comportant un site unique de restriction MluI,

iii) un virus pseudotypé avec un gène codant pour une protéine d'enveloppe.

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

Avantageusement le kit selon l'invention comprend :

- 5 i) les paires d'amorces de séquences :
  - SEQ ID No : 5 et SEQ ID No : 7
  - SEQ ID No : 6 et SEQ ID No : 8
- 10 ii) un vecteur retroviral délété de la région du cadre de lecture pol codant pour la transcriptase inverse du VIH-1, s'étendant des résidus 2618 à 2872 inclus, et comportant un site unique de restriction MluI,
- 15 iii) un virus pseudotypé par un gène codant pour une protéine d'enveloppe,
- iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,
- v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,
- 20 vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,
- vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

Avantageusement le kit selon l'invention comprend :

- 25 i) les paires d'amorces de séquences :
  - SEQ ID No : 9 et SEQ ID No : 10
  - SEQ ID No : 11 et SEQ ID No : 12
- 30 ii) un vecteur retroviral délété de toute la région du cadre de lecture pol codant pour l'intégrase du VIH-1 s'étendant des résidus 4228 à 5093 inclus et de la région codant pour l'enveloppe virale entre les positions 6343 et 7611 incluses,
- iii) un virus pseudotypé par un gène codant pour une protéine d'enveloppe,

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

Avantageusement le kit selon l'invention comprend :

i) les paires d'amorces de séquences

- SEQ ID No : 13 et SEQ ID No : 14

- SEQ ID No : 15 et SEQ ID No : 16

ii) un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la portion extracellulaire de la sous-unité gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 7745 à 8263 inclus, et comportant un site de restriction unique Mull1,

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

Avantageusement le kit selon l'invention comprend :

- i) les paires d'amorces de séquences
  - SEQ ID No : 17 et SEQ ID No : 14
  - SEQ ID No : 18 et SEQ ID No : 16
- 5 ii) un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la majorité de la sous-unité gp120 et de la portion extracellulaire de la gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 6480 à 8263 inclus, et comportant un site de restriction unique Mull1,
- 10 iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,
- v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement par des particules virales,
- 15 vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,
- vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

20 Avantageusement le kit selon l'invention comprend :

- i) les paires d'amorces de séquences
  - SEQ ID No : 19 et SEQ ID No : 20
  - SEQ ID No : 21 et SEQ ID No : 22
- 25 ii) un vecteur retroviral délété de la région, codant pour les domaines allant de la boucle V1 à la boucle V3 de l'enveloppe du VIH-1 s'étendant de 6617 à 7250 inclus et comportant un site de restriction unique NheI,
- 30 iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,
- v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

5

Avantageusement le kit selon l'invention comprend :

i) les paires d'amorces de séquences

- SEQ ID No : 23 et SEQ ID No : 24

10

- SEQ ID No : 25 et SEQ ID No : 26 avec SEQ ID No : 27

ii) un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la portion extracellulaire de la sous-unité gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 7745 à 8263 inclus, et comportant un site de restriction unique Mull1,

15

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

20

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

25

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

30

Avantageusement le kit selon l'invention comprend :

i) les paires d'amorces de séquences

- SEQ ID No : 17 et SEQ ID No : 24

- SEQ ID No : 18 et SEQ ID No : 26 et SEQ ID No : 27

ii) un vecteur retroviral délété de toute la région codant pour la majorité de la sous-unité gp120 et de la portion extracellulaire de la gp41 de l'enveloppe du VIH-1, s'étendant des résidus 6480 à 8263 inclus, et comportant un site de restriction unique Mull1,

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement par des particules virales,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention sont illustrés dans les exemples qui suivent et qui font référence aux figures suivantes :

La figure 1 représenté schématiquement le plasmide pSRT. La région codant pour la transcriptase inverse de pNL4-3xcenv est délétée au moyen d'une digestion par *BalI-SnaBI* . La linéarisation du pSRT résultant est accomplie par l'utilisation de *Nru I*.

La figure 2 illustre les courbes des effets dose réponse obtenues pour deux patients versus l'AZT et le 3TC, avant et après le traitement avec des inhibiteurs de la transcriptase inverse.

Les détails du traitement, les prélèvements d'échantillons par rapport au temps et les génotypes se trouvent sur les entêtes des figures.

Les courbes montrent l'inhibition de l'infection par un virus recombinant des cellules P4

traitées soit avec la zidovuidine (AZT, panels A et C) ou la lamivudine (3TC, panels B et D), selon la technique décrite plus loin, dans le paragraphe matériel et méthodes. Pour le patient 1, les échantillons ont été testés à 0 (♦), 9 (●) et 18 (□) mois après le traitement, et, pour le patient 2, à 0 (♦) et 27 (●) mois après le traitement.

La figure 3 est un schéma des premières étapes (a et b) d'une mise en oeuvre particulière de la méthode de l'invention. Le schéma illustre les étapes d'extraction (a) et d'amplification (b) des séquences de transcriptase inverse extraites du plasma d'un patient par RT PCR de la méthode de l'invention ainsi que les schémas de constructions du plasmide pRVA/RT utilisé ultérieurement à l'étape (d).

La figure 4 est un schéma des étapes (c) à (g) d'une mise en oeuvre particulière de la méthode de l'invention. Ce schéma illustre l'étape (d) de co-transfection dans des cellules HeLa/293T des acides nucléiques amplifiés de l'étape (b), d'un premier plasmide p43xcsnΔenv RT construit à partir d'un génome d'un virus VIH, ne comprenant pas un segment d'acide nucléique correspondant à tout ou partie de la séquence d'acide nucléique amplifiée à l'étape (b) ni un fragment de la séquence d'acide nucléique codant pour la protéine d'enveloppe et un deuxième plasmide pVSV-G comportant la séquence codant pour la protéine d'enveloppe; l'étape (e) de culture permettant de produire des particules virale, l'étape (f) de transfection des particules virales obtenues à l'étape (e) dans des cellules P4, préalablement incubées en présence ou non de dilutions sériées de différents inhibiteurs de la transcriptase inverse, lesdites cellules indicatrices P4 comportant un

5 système d'expression du gène codant pour l'enzyme beta-galactosidase activable exclusivement par les séquences d'activation tat exprimées par le virus recombinant, et l'étape (g) de détection et/ou quantification de la beta-galactosidase au moyen du substrat CPRG.

## I- Matériel et méthodes

### 10 I.1 - Amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

L'ARN est isolé à partir du plasma des patients au moyen d'une trousse Roche Amplicor<sup>®</sup> (Roche Diagnostics, 38242 Meylan Cedex, France), et les gènes d'intérêt sont isolés au moyen d'une transcriptase inverse et une réaction PCR subséquente.

15 L'amplification de la région codant pour la transcriptase inverse (RT) est effectuée au moyen des amorces externes MJ3 (5' AGT AGG ACC TAC ACC TGT CA 3') (Séquence SEQ ID No : 5 , en annexe) et RT-EXT (5' TTC CCA ATG CAT ATT GTG AG 3') (Séquence SEQ ID No : 6, en annexe) et des amorces internes A35 (5' TTG GTT GCA TAA ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT 3') (Séquence SEQ ID No : 7 , en annexe) et RT-IN (5' TTC CCA ATG CAT ATT GTG AG 3') (Séquence SEQ ID No : 8, en annexe) avec un cycle initial à 50°C (30 minutes) et à 94°C (2 minutes), suivi de 40 cycles à 94°C (30 secondes), 55°C (30 secondes) et 68°C (90 secondes) et une étape finale d'extension à 98°C durant 10 minutes. Ceci amplifie un produit de 1530 pb qui s'étend au-delà du codon 93 de la région codant de la protéase et au-delà du codon 503 de la région codant de la polymérase (pol).

30 Les produits ainsi obtenus par PCR sont purifiés sur des colonnes QuiaAmp<sup>®</sup> et analysés en ce qui

concerne leur taille, leur degré de pureté et leur concentration approximative par électrophorèse sur des gels d'agarose.

5 I.2 - Génotypage

Les séquences de nucléotides des régions codantes de la transcriptase inverse sont déterminées par séquençage automatique de la terminaison de la chaîne didéoxynucléotidique des produits de PCR bruts.

10

I.3 - Plasmides

Les clones moléculaires du VIH-1 utilisés dans la méthode d'analyse dérivent de pNL4-3.

15

Le plasmide délété en transcriptase inverse est construit par une modification du pNL4-3xc\_env muté pour porter des sites de restriction *SnaBI* uniques dans la position 3872 et de *Nru I* dans la position 3892.

20

Les enzymes *Ba I* et *SnaB I* sont utilisées pour retirer la région codant pour la transcriptase inverse (entre les positions 2618 et 2872) et la linéarisation du plasmide résultant pSRT est effectuée au moyen de l'enzyme *Nru I*. L'expression de la glycoprotéine d'enveloppe VSV-G dans les cellules transfectées est assuré par le plasmide pVSV qui contient la séquence codante *vsv-g* sous le contrôle d'un promoteur CMV.

25

I.4 - Cultures cellulaires.

30

Des cellules HeLa, 293 T et P4 sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 50 UI/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine. Les cellules P4 son des cellules Hela-CD4, LTR-LacZ dans lesquelles l'expression de la beta-

galactosidase est strictement inductible par la protéine Tat transactivateur du VIH, permettant par conséquent, une quantification précise de l'infectivité ou de la capacité répliquative des virus VIH-I basée sur un cycle unique de réplication (Charneau, P., Mirambeau, G., Roux, P., Paulous, S., Buc, H. and Clavel, F. (1994) « HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome". J Mol Biol 241(5), 651-62.). Les cellules P4 sont cultivées en présence de 500 µg/ml de geneticine.

II. - Détermination de la susceptibilité d'un virus VIH à un inhibiteur de Transcription inverse. (RTI).

La détermination de la susceptibilité d'un virus VIH à un inhibiteur de transcriptase inverse est effectuée de la manière suivante: des cellules 293 T sont transfectées avec 7,5 µg de plasmide pSRT linéarisé par NruI, 0,1 µg du plasmide pVSV-G et 0,5 et 1 µg du produit issu de la réaction PCR de la transcription inverse de VIH. Le précipité de transfection est retiré des cellules après 18 heures d'incubation et du milieu de croissance frais est ajouté. Après 24 heures de culture, le surnageant est clarifié par centrifugation (500 g, 15 minutes) et transféré sur des cellules indicatrices P4 lesquelles ont été pré-incubées avec des dilutions sériées d'un inhibiteur de la transcriptase inverse, dans de puits triplicatas, durant quatre heures. La gamme de concentrations d'inhibiteur utilisée varie selon les composés. Le signal produit par l'activation du gène marqueur a été développé avec du CPRG durant 48 heures, comme pour l'analyse de la susceptibilité à un inhibiteur de transcriptase inverse et l'indice IC<sub>50</sub> a été calculé en utilisant l'équation d'effet médian.

III - Optimisation de la méthode d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH aux inhibiteurs de transcriptase inverse.

5 Le plasmide pSRT portant une délétion dans la région codant pour pol allant du codon 24 de la transcriptase inverse (base 2618) au codon 432 de la transcriptase inverse (base 3872) inclut toutes les mutations associées à un phénomène de résistance connus à ce jour. Les séquences homologues du produit transcriptase inverse issu de PCR s'étendent 88 paires de base en amont et 186 bases en aval de la délétion dans pSRT. Les transfections pour la détermination de la susceptibilité aux inhibiteurs de la transcriptase inverse sont effectuées avec une lignée cellulaire 293T ayant une forte capacité à être transfectée plutôt qu'avec des cellules HeLa. Ceci ne constitue pas un problème car les cellules sont éliminées du surnageant contenant le virus par centrifugation avant le transfert de cellules P4.

Les conditions de transfert sont optimisées au moyen d'un test en échiquier. La variation du ratio du plasmide/produit issu de PCR ne modifie significativement la quantité de p24 ou de transcriptase inverse produites ou la vitesse de réaction avec CPRG. Etant donné que le plasmide circulaire, pVSV-G semble être extrêmement toxique pour les cellules 293T, la quantité de celui-ci a été réduite de 3 µg à 0,1 µg dans le mélange de transfection, conduisant à des rendements élevés en p24 (>20 ng/ml comparé à 9,8 ng/ml).

Etant donné que les phases précoces de la réplication du virus, incluant la transcription inverse,

se produisent dans les cellules P4 indicatrices dans ce type de détermination, ce sont ces cellules qui sont traitées avec des dilutions en série des inhibiteurs de la transcriptase inverse.

5

Les gammes de concentration d'inhibiteur utilisées sont choisies en fonction de la toxicité cellulaire de chaque composé et du ratio  $IC_{50}/IC_{90}$  pour la susceptibilité des isolats résistants (Tableau 1). Par exemple, comme l'indice  $IC_{50}$  pour l'abacavir pour les cellules P4 est d'environ 250  $\mu M$  alors que l'indice  $IC_{50}$  pour ce composé pour la souche native du virus est d'environ 3  $\mu M$ , la détection de la résistance est limitée par la toxicité. Une gamme de quatre dilutions en série, commençant à 200  $\mu M$  a été utilisée pour l'abacavir, permettant la détection de jusqu'à 60 fois plus de résistance.

15

D'autre part, puisque la toxicité de l'AZT pour les cellules P4 est élevée ( $>300 \mu M$ ) alors que l'indice  $IC_{50}$  est considérablement inférieur, une gamme plus large de dilutions a été utilisée (dilution en série 1/10 à partir de 5  $\mu M$ ) de manière à permettre la détection de niveaux élevés de résistance (jusqu'à 100 fois).

20

Pour la transcriptase inverse RVA, l'indice  $IC_{50}$  est utilisé plutôt que l'indice  $IC_{90}$  car la détection de l'indice  $IC_{90}$  pour les virus résistants pourrait demander des niveaux de composé toxiques pour la plupart d'inhibiteurs de transcriptase inverse.

25

30

TABLEAU 1 : Susceptibilité du virus de référence NL4-3 aux inhibiteurs de transcriptase inverse (RTI).

Inhibiteurs de RT	Concentrations en drogues utilisées		Moyenne géométrique IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	Déviation standard <sup>a</sup>	Susceptibilité détectable maximum <sup>b</sup>
	Gammes / Etapes de dilution				
AZT	50 µM - 5 nM	10 x	0,018 µM	2,7	2700
3TC	200 - 0,02 µM	10 x	1,512 µM	2,2	130
D4T	100 - 0,01 µM	10 x	0,444 µM	2,7	220
DDI	100 - 0,01 µM	10 x	1,613 µM	2,5	60
Abacavir	200 - 0,8 µM	4 x	2,229 µM	1,8	90
Effavirenz	100 - 0,16 nM	5 x	0,716 nM	2,2	140
Nevirapine	50 µM - 5 nM	10 x	0,037 µM	2,0	1300

5

a- moyenne géométrique et déviation standard de 20 tests répétés pour les inhibiteurs de transcriptase inverse.

b- différence maximale approximative pour les indices IC<sub>50</sub> et IC<sub>90</sub> entre NL43 et le virus testé qui peut être mesurée en utilisant la gamme de concentrations en drogues donnée

10

La méthode d'analyse pour déterminer la susceptibilité du virus VIH aux inhibiteurs de transcriptase inverse donne une Déviation Standard de la moyenne géométrique pour 20 tests entre 1,78 (abacavir) et 2,7 (D4T et AZT). La déviation standard médiane pour les inhibiteurs de la transcriptase inverse (RTI) essayés (AZT, 3TC, D4T, DDI, abacavir, efavirenz et nevirapine) est de 2,2. De manière à simplifier l'interprétation automatique des résultats des échantillons des patients, une valeur Index de Résistance (IR) arbitraire, IR = 5 a été défini comme le minimum de réduction de la susceptibilité à un RTI considéré comme étant significativement réduit par rapport à NL43.

Pour déterminer si NL43 est un virus de référence convenable pour la comparaison avec les isolats cliniques, un panel d'échantillons pris de patients avec un traitement banal a été essayé sur 3 réplicats RVA pour leur susceptibilité aux inhibiteurs de transcriptase inverse.

L'IC<sub>50</sub> médian trouvé pour 22 virus testés tend à être légèrement supérieur à celui trouvé pour le virus NL43 avec un IR médian aux alentours de 0,92 (pour stavudine) et de 1,22 (lamivudine). Bien que l'IR soit inférieur à la limite définie de 5 sur le total d'inhibiteurs pour la plupart d'échantillons testés, la gamme d'IR semble large, en particulier pour les inhibiteurs non-nucléosides. En particulier, un indice de résistance de 11,0 pour la nevirapine a été obtenu pour un virus or, ce virus portait une mutation sur le codon 98 (A pour S) de la transcriptase inverse, qui avait été précédemment impliqué dans la résistance aux NNRTIs.

#### IV - Reproductibilité

La reproductibilité de la méthode de détermination de la susceptibilité du virus recombinant (RVA) aux inhibiteurs de transcriptase inverse (RTI) a été évaluée par une série de tests sur 5 échantillons, choisis de manière à représenter une large gamme de profils de susceptibilité, entre 4 et 8 tests par échantillon, en utilisant des préparations d'ARN et des réactions PCR séparées.

La variation inter-test pour la détermination de la susceptibilité des virus VIH aux inhibiteurs de la transcriptase inverse indique que dans quelques cas il existe une différence supérieure à 5 entre l'IR maximum et l'IR minimum trouvés pour des déterminations répétées (Tableau 2), cependant, la déviation standard de la moyenne géométrique est maintenue = 2,2 dans tous les cas sauf un (R4, AZT). Dans trois des échantillons l'IR obtenu lors des tests répétés varie entre <5 et >5 pour les composés pour lesquels les virus peuvent être modérément résistants (IR non supérieur à 12).

**TABLEAU 2** : Reproductibilité de la susceptibilité aux RTI.

Echantillon (Nombre de tests)	Génotype <sup>a</sup>	Index de Résistance <sup>b</sup>									
		AZT	3TC	D4T	DDI	Abacavir	Efavirenz	Nevirapine			
R1 (6)	69N/T, 70R	MG <sup>c</sup>	1,5	1,3	1,4	1,4	1,1	1,0	2,2		
		SD <sup>d</sup> max/min <sup>e</sup> n>4/N <sup>f</sup>	1,5 2,9 0/6	1,5 2,8 0/6	1,4 2,2 0/6	1,6 2,8 0/6	1,2 1,6 0/6	1,1 1,2 0/6	1,8 3,8 0/6		
R2 (6)	41L, 62V, 67N, 69N, 75I, 77L, 115F, 116Y, 151M, 181C, 184V, 190A 208Y, 215F, 219Q	MG <sup>c</sup>	1232,6	>f	43,5	26,9	>	74,9	>		
		SD <sup>d</sup> max/min <sup>e</sup> n>4/N <sup>f</sup>	1,6 3,8 6/6	na na 6/6	2,1 8,1 6/6	1,7 4,1 6/6	na na 6/6	1,7 3,9 6/6	na na 6/6		
R3 (6)	184V, 215F	MG <sup>c</sup>	13,2	>	3,2	3,1	4,3	1,0	1,2		
		SD <sup>d</sup> max/min <sup>e</sup> n>4/N <sup>f</sup>	2,7 8,9 5/6	na na 1/6	1,8 5,7 1/6	1,6 3,3 1/6	1,4 2,4 4/6	1,0 1,0 0/6	1,3 1,6 0/6		
R4 (5)	41L, 67N, 69D, 184V, 190A, H208Y, 210W, 215Y	MG <sup>c</sup>	137,5	>	3,6	3,0	6,1	149,8	>		
		SD <sup>d</sup> max/min <sup>e</sup> n>4/N <sup>f</sup>	1,8 4,5 5/5	na na 5/5	2,0 4,1 3/5	1,3 1,7 5/5	1,6 3,3 3/5	1,6 3,9 5/5	na na 5/5		
R5 (5)	215Y, 41L, 74V, 100I, 103N	MG <sup>c</sup>	3,3	1,8	1,7	2,6	1,7	>	580,5		
		SD <sup>d</sup> max/min <sup>e</sup> n>4/N <sup>f</sup>	1,6 3,0 1/5	1,7 3,7 0/5	1,8 3,7 0/5	1,6 2,5 0/5	1,6 2,9 0/5	na na 5/5	1,8 2,2 5/5		

(a) Seules les substitutions en acides aminés déjà connues pour être associées avec une résistance aux inhibiteurs de la transcriptase inverse sont indiquées.

5 (b) L'Index de Résistance est le rapport de l'IC<sub>50</sub> dans l'échantillon par rapport à celui de NL43 déterminé en parallèle.

(c) Moyenne géométrique.

(d) Déviation standard de la moyenne géométrique.

10 (e) L'index de résistance le plus élevé obtenu dans les tests divisé par le plus faible.

(f) Le nombre de tests donnant un index de résistance >4 classant le virus comme résistant/ au nombre total de tests réalisés.

15 (g) Un IC<sub>50</sub> au-dessus de la gamme détectable dans tous les tests est indiqué par >. Dans ces cas, une déviation standard et un minimum/ maximum ne sont pas applicables (na).

20 Les résultats phénotypiques obtenus pour ces Inhibiteurs de transcriptase inverse montrent une concordance avec les profils génotypiques des échantillons.

25 L'échantillon R2, qui montre un degré élevé de résistance par rapport à tous les composés testés, comporte des mutations multiples en incluant celles du complexe de résistance multi-composé (62V, 75I, 77L, 116Y et 151M) qui confère la résistance aux nucléotides RTI, la résistance 3TC associée à la mutation 184V et des  
30 mutations connues pour induire une susceptibilité réduite aux NNRTI (181C, 190A).

L'échantillon R3 montre un niveau de résistance élevé à 3TC, à nouveau modulé par la mutation 184V, avec une variation considérable de l'IR pour AZT

qui reflète probablement la nature inconsistante de la suppression de la résistance induite par 215F par 184V.

Dans l'échantillon R4, une telle suppression est contrecarrée par la présence de mutations multiples incluant une mutation 208Y.

L'échantillon R5 se maintient sensible à AZT malgré une mutation 41L et une mutation 215Y à cause des effets de la mutation 100I qui, en combinaison avec 103N, est responsable des niveaux de résistance élevés observés vis-à-vis d'efavirenz et de nevirapine.

V- Validation de la méthode d'analyse pour déterminer la susceptibilité d'un virus VIH aux inhibiteurs de fusion.

Les recombinaisons obtenues en utilisant pour l'amplification de l'étape (b) la paire d'amorces FuA : 5'AAGCAATGTATGCCCCCTCCCAT3' (SEQ ID No: 23) et FuB : 5'GGTGGTAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 24) suivie d'une deuxième amplification, effectuée avec l'amorce : FuC : 5'ATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGA3' (SEQ ID No: 25) et un mélange des amorces suivantes : FuD1 : 5'TCTGTCTCTCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 26) FuD2 : 5'TCTGTCTTGCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 27) sont très efficaces.

En effet, pour obtenir une production virale satisfaisante il suffit généralement de 10-50 ng de produit de PCR, utilisé dans l'étape de recombinaison. Dans cette méthode destinée à analyser la caractéristique phénotypique de fusion, une production virale correspondante à 50-400 ng/ml de p24 est obtenue après transfection. Pour l'infection des cellules cible, entre 0,5 et 5 ng p24/ puit (plaques 96 puits) sont utilisés.

L'augmentation de la densité optique obtenue après infection de cellules cible est linéaire si l'infection est conduite dans ces conditions

5                    Afin de valider la méthode d'analyse concernant la susceptibilité des virus VIH aux inhibiteurs de fusion, deux inhibiteurs de fusion, ont été utilisés: un peptide dérivé de la séquence de l'hélice distale dans la gp41 de VIH (appelé DP178 ou  
10                    T20) et un dérivé de l'acide bétulinique (RPR103611). Pour chaque inhibiteur, la réduction de sensibilité d'un ou plus virus résistant (précédemment identifié par d'autres auteurs) par rapport à deux virus de référence: un virus plasmatique primaire T5A1 et un virus adapté à  
15                    la culture in vitro (LAI) a été effectuée. Tous les virus ont été produits par recombinaison.

#### Résultats

##### V.1- Inhibiteur DP178 ou T20.

20                    L'augmentation de l'IC50 pour un virus fortement résistant NL-DIM (décrit par Rimsky L.T. et al. J. Virol. 1998, vol 72, pages 986-993) et pour le virus NL4.3 (qui est partiellement résistant) ont été mesurées vis-à-vis de cet inhibiteur.

25                    Le virus fortement résistant DIM présente une augmentation de la valeur de l'IC50 de 80 fois par rapport à T5A1 et de plus de 100 fois par rapport a LAI.

30                    Le virus partiellement résistant NL4.3 est caractérisé par une augmentation de l'IC50 de 10 fois par rapport à T5A1 et de 12,5 fois par rapport a LAI.

V.2- Inhibiteur RPR103611

L'augmentation de l'IC50 du virus résistant LAI-L91H (Labrosse B. et al. J Virol. 2000 vol 74 pages 2142-2150) vis -à-vis de cet inhibiteur a été mesurée.

5

Pour le virus LAI-L91H, l'augmentation de l'IC50 par rapport à LAI et à T5A1 est supérieure à 100 fois.

10

VI- Optimisation de la méthode d'analyse pour déterminer la CAPACITE NEUTRALISANTE des virus VIH.

Les recombinaisons obtenues en utilisant pour l'amplification de l'étape (b) une paire d'amorces NEU-A : 5'TAGAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATG3' (SEQ ID No: 17) et FuB : 5' GGTGGTAGCTGAAGAGGCACAGG3' (SEQ ID No: 24), suivie d'une deuxième amplification, avec les amorces: NEU-C : 5'GTGGGTCACAGTCTATTATGGGG3' (SEQ ID No: 18) et un mélange des amorces FuD1 :5'TCTGTCTCTCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 26) et FuD2 :5'TCTGTCTTGCTCTCCACCTTCTTCTT3' (SEQ ID No: 27) sont également très efficaces.

20

En effet, lors des contrôles de production virale, il s'est avéré que pour obtenir une production virale satisfaisante il suffit généralement de 10-50 ng de produit de PCR, utilisé dans l'étape de recombinaison.

25

Une production virale correspondante à 50-400 ng/ml de p24 après transfection est obtenue. Pour l'infection des cellules cible, entre 0,5 et 5 ng p24/puit (plaques 96 puits) sont utilisés. L'augmentation de la densité optique obtenue après infection de cellules cible est linéaire si l'infection est conduite dans ces conditions

30

## REVENDEICATIONS

1) Méthode d'analyse d'une caractéristique phénotypique des virus VIH présents dans un échantillon biologique d'un patient, ladite caractéristique phénotypique résultant d'une ou plusieurs mutations du génome viral susceptibles d'influencer l'infection virale, caractérisée en ce qu'elle comprend :

a) l'extraction des acides nucléiques contenus dans ledit échantillon biologique,

b) au moins une amplification par PCR d'un segment des acides nucléiques de l'étape (a), chacune avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique du génome viral susceptible de porter au moins une mutation, ladite séquence nucléique du génome viral comprenant tout ou partie d'une région du génome virale codant pour une protéine choisie parmi: gag, pol, RNase H, intégrase, vif, vpr, tat, rev, vpu, nef, séquences cis-actives, LTR, séquences de dimérisation, séquences régulatrices de l'épissage ou élément de réponse de Rev (RRE).

c) la préparation d'un vecteur comprenant les parties d'un génome d'un virus VIH nécessaires à la réplication virale à l'exception du segment amplifié à l'étape (b) et éventuellement à l'exception du gène codant pour la protéine d'enveloppe,

d) la transfection d'un premier hôte cellulaire avec :

- les acides nucléiques obtenus à l'étape (b),

- le vecteur préparé à l'étape (c),

- éventuellement un second vecteur comprenant un gène codant pour une protéine d'enveloppe si le gène d'enveloppe est délété du vecteur préparé à l'étape (c),

pour obtenir par recombinaison homologue un virus chimérique,

e) la culture dudit premier hôte cellulaire dans des conditions permettant de produire des particules virales au cours d'un seul cycle de réplication,

f) l'infection par les particules virales obtenues à l'étape (e) d'au moins un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH ou un virus pseudotypé VIH et comportant éventuellement un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

g) la détection et/ou la quantification du marqueur exprimé à l'étape (f) afin de mettre en évidence au moins une caractéristique des virus VIH présents dans l'échantillon biologique.

2) Méthode d'analyse selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'amplification par PCR de l'étape (b) est réalisée avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique susceptible de porter au moins une mutation dans le gène codant pour l'intégrase, et le vecteur de l'étape (c) est un vecteur retroviral délété de tout ou partie du gène codant pour l'intégrase.

3) Méthode d'analyse selon les revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que l'amplification de l'étape (b) est effectuée avec la paire d'amorces :

INT B+ -5'GTTACTAATAGAGGAAGACAAA3' (SEQ ID No: 9) et

INT B- 5'TTTTGGTGTTATTAATGCT3' (SEQ ID No: 10),

suivie d'une deuxième étape d'amplification, avec la paire d'amorces :

INT V+ 5' CACCCTAACTGACACAACAA3' (SEQ ID No:  
11) et

INT V- 5' AAGGCCTTTCTTATAGCAGA3' (SEQ ID No:  
12),

5 pour obtenir un fragment d'ADN de 1460 paires  
de bases s'étendant des résidus 3950 à 5410 inclus et  
en ce que le vecteur de l'étape (c) est un  
vecteur retroviral délété de toute la région du cadre de  
lecture pol codant pour l'intégrase du VIH-1 s'étendant  
10 des résidus 4228 à 5093 inclus et de la région codant  
pour l'enveloppe virale entre les positions 6343 et 7611  
incluses.

4) Méthode d'analyse selon les revendications  
15 1 ou 3, consistant à déterminer la susceptibilité d'un  
virus VIH à un composé inhibiteur de l'intégrase,  
caractérisée en ce que l'on ajoute ledit composé  
inhibiteur de l'intégrase, éventuellement à des  
concentrations différentes, durant l'étape (e), avant  
20 l'étape (f) et en ce que l'étape (g) comprend la  
comparaison de l'expression du gène marqueur avec et sans  
composé inhibiteur de l'intégrase.

5) Méthode d'analyse selon l'une quelconque  
25 des revendications 1 à 4, consistant à déterminer  
l'infectivité ou la capacité répliquative d'un virus VIH  
caractérisée en ce que l'étape (g) comprend la  
comparaison de l'expression du gène marqueur par le  
second hôte cellulaire infecté avec les particules  
30 virales obtenues en appliquant les étapes (a) à (f) à un  
échantillon biologique d'un patient, et l'expression du  
gène marqueur par le même second hôte cellulaire infecté  
avec les particules virales de référence obtenues en

appliquant les étapes (a) à (f) à un échantillon contenant un virus de référence.

5 6) Méthode d'analyse selon la revendication  
5, caractérisée en ce que les particules virales de  
référence issues d'un virus de référence sont des  
particules virales obtenues par l'application des étapes  
(a) à (f) à un échantillon biologique du même patient à  
un stade préalable du traitement thérapeutique ou avant  
10 celui-ci.

7) Méthode d'analyse selon les revendications  
1 à 6, consistant à déterminer la susceptibilité d'un  
virus VIH à l'hydroxyurée, caractérisée en ce que l'on  
15 ajoute ou non de l'hydroxyurée, éventuellement à des  
concentrations différentes, soit durant l'étape (e) de  
culture, soit au deuxième hôte cellulaire, avant  
l'infection de celui-ci à l'étape (f) et en ce que  
l'étape (g) comprend la comparaison de l'expression du  
20 gène marqueur avec et sans hydroxyurée.

8) Méthode d'analyse selon l'une quelconque  
des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que l'étape  
(e) de culture est effectuée durant une période allant de  
25 12 heures à 72 heures, de préférence de 24 heures à 48  
heures.

9) Un kit pour la mise en oeuvre d'une  
méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 8,  
30 caractérisé en ce qu'il comprend :

i) une paire d'amorces encadrant une séquence  
d'acide nucléique du génome viral au moins une mutation,  
ladite séquence nucléique du génome viral codant pour une  
protéine choisie parmi: gag, pol, RNase H, intégrase,

vif, vpr, tat, rev, vpu, nef, séquences cis-actives, LTR, séquences de dimérisation, séquences régulatrices de l'épissage ou élément de réponse de Rev (RRE) susceptible de porter au moins une mutation,

5 ii) un vecteur comprenant les parties d'un génome d'un virus VIH nécessaires à la réplication virale à l'exception du segment amplifié avec les amorces définies en (i) et du gène codant pour la protéine d'enveloppe,

10 iii) un second vecteur comprenant un gène codant pour une protéine d'enveloppe,

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

15 v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

20 vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

10) Un kit selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend :

25 i) les paires d'amorces de séquences :

- SEQ ID No : 9 et SEQ ID No : 10

- SEQ ID No : 11 et SEQ ID No : 12

30 ii) un vecteur retroviral délété de toute la région du cadre de lecture pol codant pour l'intégrase du VIH-1 s'étendant des résidus 4228 à 5093 inclus et de la région codant pour l'enveloppe virale entre les positions 6343 et 7611 incluses,

iii) un virus pseudotypé par un gène codant pour une protéine d'enveloppe,

iv) un premier hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH,

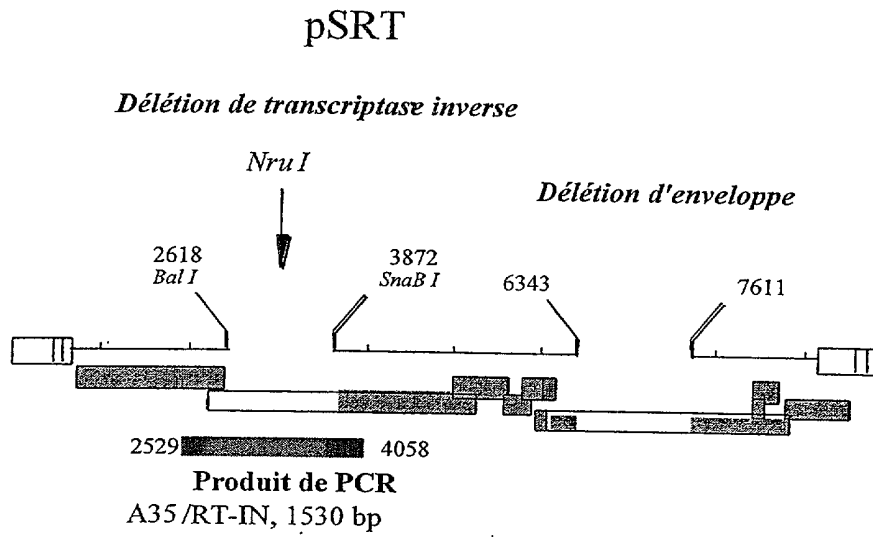
5 v) un second hôte cellulaire susceptible d'être infecté par un virus VIH et comportant un gène marqueur activable uniquement à la suite de l'infection virale,

vi) les produits et réactifs nécessaires pour réaliser l'amplification par PCR,

10 vii) les produits et réactifs permettant la détection du marqueur exprimé.

1/4

Fig.1



Patient 3		
RTI	Temp (mois)	Génotype
AZT	0	WT
	9	215Y
	18	41L, 67E, 179G, 210W, 215Y

Patient 4		
RTI	Temp (mois)	Génotype
AZT/3TC	0	214 F
	27	41M/L, 184V, 214F

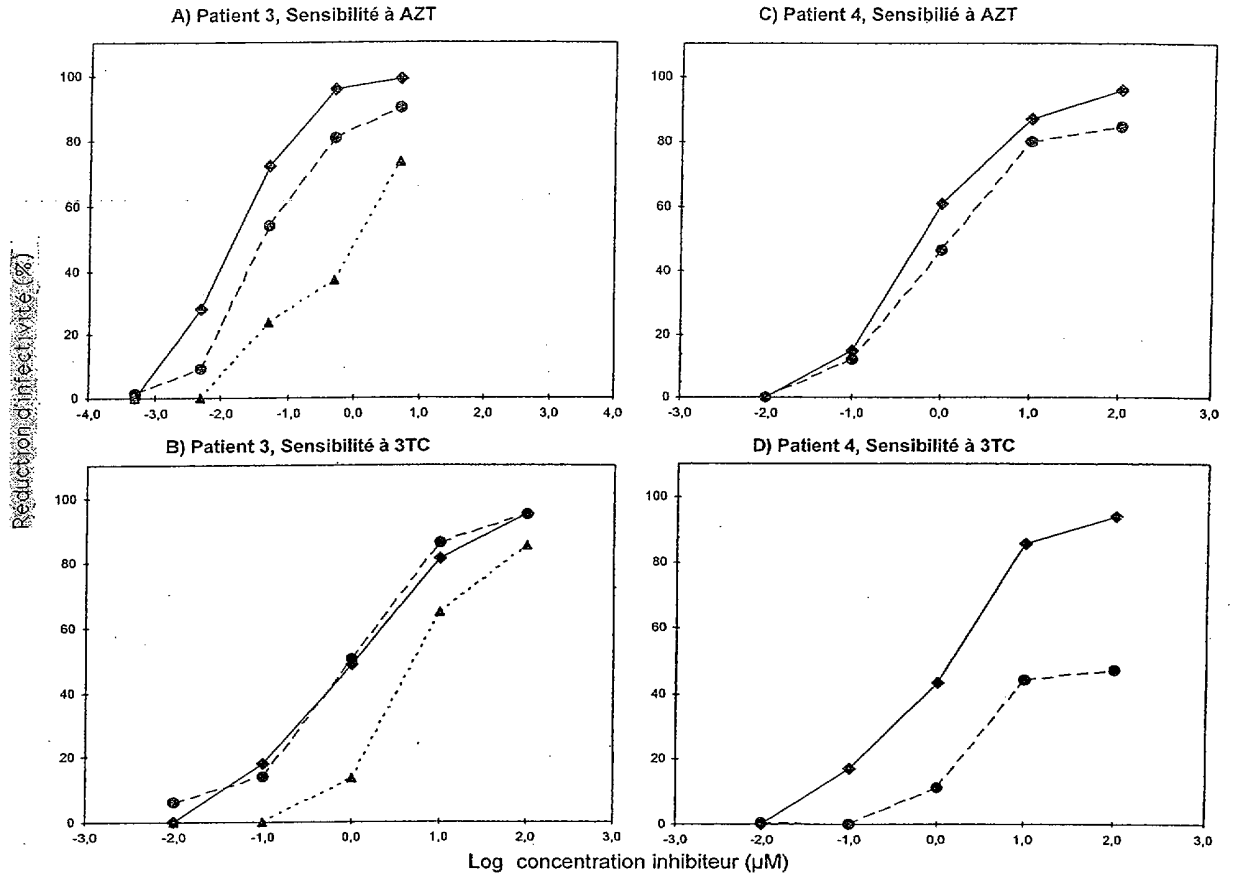
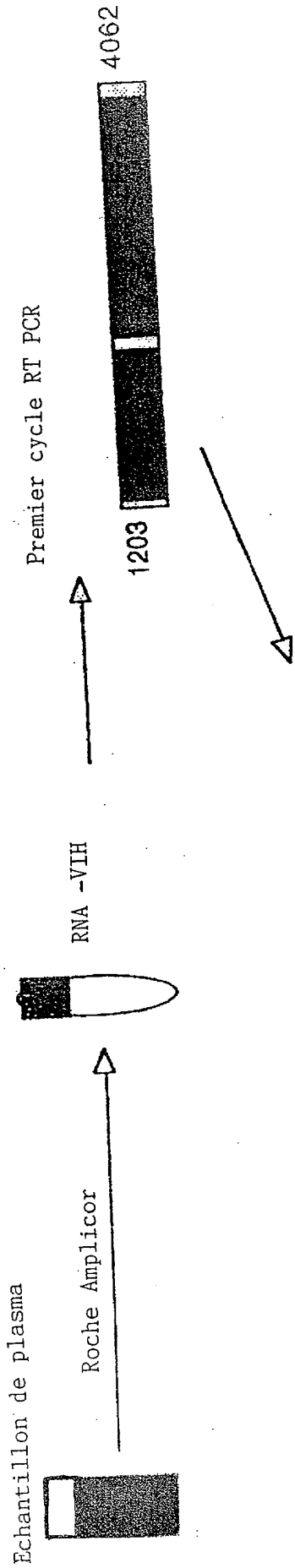


Fig.2

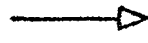
Fig.3

EXTRACTION D'ARN ET AMPLIFICATION PAR PCR

ETAPE A



Second cycle PCR



Transcriptase inverse

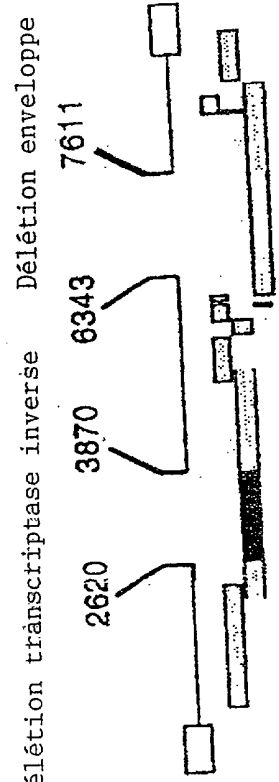
2523

4058

Plasmide RVA/RT

Délétion transcriptase inverse

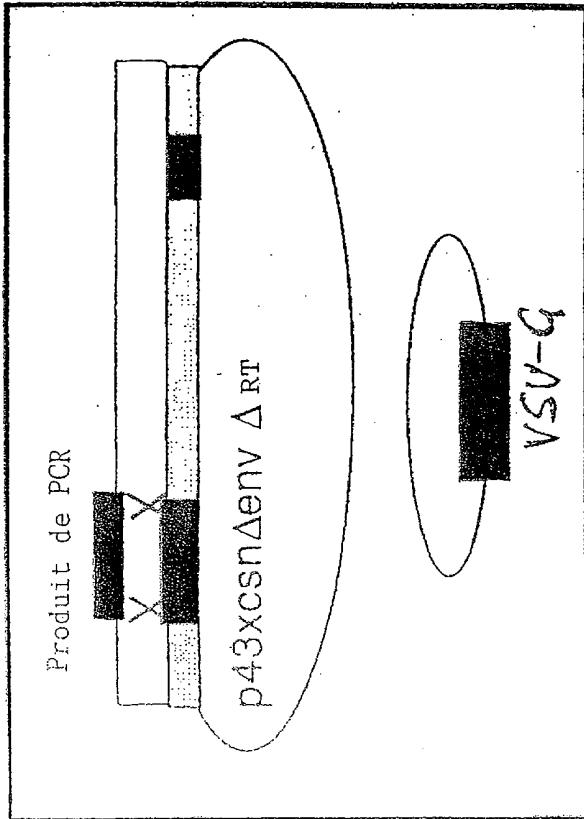
2620 3870 6343 7611



TEST DE DETECTION DE RESISTANCE AUX INHIBITEURS

Etape G - DETECTION

Produit de PCR



CPRG Jaune

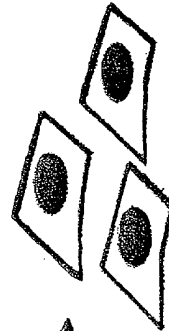
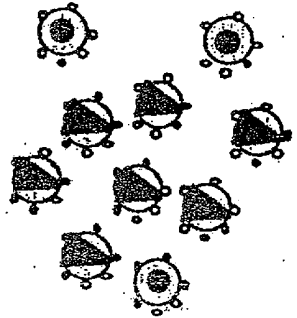


CPRG Rouge

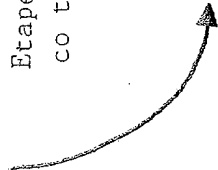
Titre du virus infectieux

Etape F (Culture)

Etape C  
co transfection de cellules



+ INHIBITEURS



## LISTE DE SEQUENCES

<110> BIOALLIANCE  
INSERM

<120> Nouvelle méthode d'analyse des caractéristiques  
phénotypiques des virus de l'immunodéficience humaine.

<130> B13273FR-26aout2002

<140> FR2002-xxxxxx  
<141> 2002-08-26

<150> FR 01/03970  
<151> 2001-03-23

<150> FR 00/14495  
<151> 2000-11-10

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)  
<223> Séquence Fit A pour l'amplificatioin d'une région  
du gène codant pour la protéase.

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 1  
tcacctagaa ctttaaagc  
20

<210> 2  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(23)  
<223> Séquence Pro A pour l'amplification d'une région  
du gène de la protéase.

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 2

ggcaaatact ggagtattgt atg  
23

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> Séquence Fit B pour l'amplification d'une région  
du gène de la protéase.

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 3

agaactttaa atgcatgggt  
20

<210> 4

<211> 23

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(23)

<223> séquence Pro B pour l'amplification d'une région  
du gène de la protéase;

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 4

ggagtattgt atggatttc agg  
23

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)  
<223> Séquence MJ33 pour l'amplification d'une région du  
gène de la transcriptase inverse.

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorces

<400> 5  
agtaggacct acacctgtca  
20

<210> 6  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)  
<223> Séquence RT-EXT pour l'amplification d'une région  
du gène de la transcriptase inverse.

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorces

<400> 6  
ttcccaatgc atattgtgag  
20

<210> 7  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(32)  
<223> Séquence A35 pour l'amplification d'une région du  
gène de la transcriptase inverse.

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorces

<400> 7  
ttggttgcatt aaattttccc attagtccta tt  
32

<210> 8  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)  
<223> Séquence RT-IN pour l'amplification d'une région  
du gène de la transcriptase inverse.

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 8  
ttccaatgc atattgtgag  
20

<210> 9  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)  
<223> Séquence INT B + pour l'amplification d'une  
région du gène de l'intégrase.

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 9  
gttactaata gaggaagaca aa  
22

<210> 10  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(19)  
<223> Séquence INT B - pour l'amplification d'une  
région du gène de l'intégrase.

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 10  
ttttggtggt attaatgct  
19

<210> 11  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)  
<223> Séquence INT V + pour l'amplification d'une  
région du gène de l'intégrase.

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 11  
cacctaact gacacaaca  
20

<210> 12  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)  
<223> séquence INT V - pour l'amplification d'une région  
du gène de l'intégrase.

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 12  
aaggcctttc ttatagcaga  
20

<210> 13  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)  
<223> Séquence FIN-A pour l'amplification d'une région  
du gène de l'enveloppe.

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 13  
tcaaataatta cagggctgct  
20

<210> 14  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(18)  
<223> Séquence FIN-B pour l'amplification d'une région  
du gène de l'enveloppe.

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 14  
tagctgaaga ggcacagg  
18

<210> 15  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)  
<223> Séquence FIN-C pour l'amplification d'une région  
du gène de l'enveloppe.

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 15  
ctattaacaa gagatggtgg  
20

<210> 16  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(19)  
<223> Séquence FIN-D pour l'amplification d'une région  
du gène de l'enveloppe.

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorces

<400> 16  
tccaccttct tcttcgatt  
19

<210> 17  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(26)  
<223> Séquence NEU -A pour l'amplification d'une région  
du gène de l'enveloppe.

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorces

<400> 17  
tagaaagagc agaagacagt ggcaatg  
27

<210> 18  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(23)  
<223> Séquence NEU-C pour l'amplification d'une région  
du gène de l'enveloppe.

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 18

gtgggtcaca gtctattatg ggg

23

<210> 19

<211> 28

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(28)

<223> Séquence E00 pour l'amplification d'une région du gène de l'enveloppe.

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 19

tagaaagagc agaagacagt ggcaatga

28

<210> 20

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> séquence ES8B pour l'amplification d'une région du gène de l'enveloppe.

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 20

cactttctcca attgtccctc a

21

<210> 21

<211> 27

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(27)  
<223> Séquence E20 pour l'amplification d'une région du  
gène de l'enveloppe.

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 21  
gggccacaca tgcctgtgta cccacag  
27

<210> 22  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(24)  
<223> Séquence E115 pour l'amplification d'une région  
du gène de l'enveloppe.

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 22  
agaaaaattc ccctccacaa ttaa  
24

<210> 23  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(22)  
<223> Séquence FuA pour l'amplification d'une région du  
gène de l'enveloppe.

<400> 23  
aagcaatgta tgcccctccc at  
22

<210> 24  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorces

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(23)  
<223> Séquence FuB pour l'amplification d'une partie du gène d'enveloppe.

<400> 24  
ggtggtagct gaagaggcac agg  
23

<210> 25  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorces

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(25)  
<223> Séquence FuC pour l'amplification d'une partie du gène d'enveloppe.

<400> 25  
atatgagggga caattggaga agtga  
25

<210> 26  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:amorces

<220>  
<221> misc\_feature

<222> (1)..(26)

<223> Séquence FuD1 utilisé pour amplifier une partie du gène de l'enveloppe.

<400> 26

tctgtctctc tctccacctt cttctt  
26

<210> 27

<211> 26

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<220>

<221> misc\_feature

<222> ()..)

<223> Séquence FuD2 pour l'amplification d'une partie du gène de l'enveloppe.

<400> 27

tctgtcttgc tctccacctt cttctt  
26