



HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ

**TESTS PHÉNOTYPIQUES ET TESTS GÉNOTYPIQUES DE  
DETERMINATION DU TROPISME DU VIH-1 ET TRAITEMENT  
PAR ANTAGONISTE DU RÉCEPTEUR CCR5**

Rapport d'évaluation technologique

**Juillet 2009**

**Service évaluation des actes professionnels**

Ce rapport est téléchargeable sur  
[www.has-sante.fr](http://www.has-sante.fr)

**Haute Autorité de Santé**

Service communication

2 avenue du Stade de France – 93218 Saint-Denis La Plaine CEDEX

Tél. : +33 (0)1 55 93 70 00 – Fax +33 (0)1 55 93 74 00

Ce document a été validé par le Collège de la Haute Autorité de Santé en **juillet 2009**.

© Haute Autorité de Santé – **2009**

---

## L'ÉQUIPE

---

Ce rapport d'évaluation a été réalisé par M. le Dr Gonzalo MARTINEZ ZAVALA, chef de projet au service évaluation des actes professionnels.

La recherche et la gestion documentaire ont été effectuées par M. Aurélien DANCOISNE, documentaliste, avec l'aide de Mme Laurence FRIGÈRE, assistante documentaliste.

L'organisation logistique et le travail de secrétariat ont été réalisés par Mme Mireille EKLO.

---

Pour tout contact au sujet de ce rapport :

Tél. : 01 55 93 71 12

Fax : 01 55 93 74 35

E-mail : [contact.seap@has-sante.fr](mailto:contact.seap@has-sante.fr)

Service évaluation des actes professionnels  
Chef de service, Mme le Dr Sun Hae LEE-ROBIN  
Adjoint au chef de service, M. le Dr Denis Jean DAVID, docteur ès sciences

Service Documentation et information des publics  
Chef de service, Mme le Dr Frédérique PAGES, docteur ès sciences  
Adjointe au chef de service, Mme Christine DEVAUD

---

## TABLE DES MATIÈRES

---

L'ÉQUIPE .....	3
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	8
LEXIQUE .....	9
ORIGINE DE LA DEMANDE.....	10
TEXTE COURT .....	11
<b>I. CONTEXTE .....</b>	<b>11</b>
<b>I.1 Mécanisme d'entrée du VIH .....</b>	<b>11</b>
<b>I.2 Importance du Tropisme viral dans l'infection par VIH.....</b>	<b>11</b>
<b>I.3 Maraviroc, antagoniste sélectif du récepteur CCR5.....</b>	<b>11</b>
<i>I.3.1 Mécanisme d'action et efficacité du maraviroc .....</i>	<i>11</i>
<i>I.3.2 Détermination du tropisme viral préalable au traitement par maraviroc .....</i>	<i>11</i>
<i>I.3.3 Détermination du tropisme viral en situation d'échec thérapeutique avec une             combinaison d'antirétroviraux comprenant le maraviroc.....</i>	<i>12</i>
<b>I.4 Contexte réglementaire .....</b>	<b>12</b>
<b>II. MÉTHODE D'ÉVALUATION.....</b>	<b>12</b>
<b>II.1 Analyse critique des données de la littérature .....</b>	<b>12</b>
<b>II.2 Groupe de travail : .....</b>	<b>13</b>
<b>III. RESULTATS DE L'ÉVALUATION .....</b>	<b>13</b>
<b>III.1 Tests phénotypiques .....</b>	<b>13</b>
<i>III.1.1 Test phénotypique historique – MT2 .....</i>	<i>13</i>
<i>III.1.2 Tests phénotypiques à virus recombinants.....</i>	<i>13</i>
<b>III.2 Tests génotypiques .....</b>	<b>14</b>
<i>III.2.1 Performance diagnostique .....</i>	<i>15</i>
<i>III.2.2 Détection des souches minoritaires.....</i>	<i>15</i>
<i>III.2.3 Taux de non réponses.....</i>	<i>15</i>
<i>III.2.4 Aspects organisationnels. ....</i>	<i>15</i>
<b>III.3 Tests de tropisme et échec thérapeutique aux antagonistes du récepteur     CCR5.....</b>	<b>16</b>
<b>III.4 Contrôle qualité .....</b>	<b>16</b>
<b>III.5 Population cible des tests de tropisme.....</b>	<b>16</b>
<b>IV. CONCLUSIONS .....</b>	<b>16</b>
<b>IV.1 Indications.....</b>	<b>16</b>
<i>IV.1.1 Préalable au traitement par inhibiteur du récepteur CCR5 .....</i>	<i>16</i>
<i>IV.1.2 Situation d'échec thérapeutique. ....</i>	<i>16</i>
<b>IV.2 Contrôle qualité .....</b>	<b>17</b>
<b>IV.3 Tests phénotypiques.....</b>	<b>17</b>
<i>IV.3.1 Performances.....</i>	<i>17</i>
<i>IV.3.2 Aspects organisationnels .....</i>	<i>17</i>
<b>IV.4 Tests Génotypiques .....</b>	<b>17</b>
<i>IV.4.1 Performances.....</i>	<i>17</i>
<i>IV.4.2 Aspects organisationnels .....</i>	<i>18</i>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>19</b>
<b>CONTEXTE.....</b>	<b>20</b>
<b>I. SOURCES D'INFORMATION .....</b>	<b>20</b>
<b>II. CONTEXTE DE LA DEMANDE .....</b>	<b>20</b>
<b>III. ROLE DES RÉCEPTEURS À CHIMIOKINES DANS LES MÉCANISMES D'ENTREE DU VIH.....</b>	<b>20</b>
<b>III.1 Mécanismes d'entrée du VIH .....</b>	<b>20</b>
<b>III.2 Classification des souches virales selon leur tropisme .....</b>	<b>21</b>

<b>III.3</b>	<b>Épidémiologie et facteurs prédictifs de l'utilisation des corécepteurs .....</b>	<b>22</b>
III.3.1	<i>Phases de l'infection – évolution du tropisme.....</i>	22
III.3.2	<i>Prévalence des souches à tropisme X4 chez les patients prétraités. ....</i>	22
III.3.3	<i>Facteurs pronostiques.....</i>	23
<b>III.4</b>	<b>Tropisme tissulaire - Compartimentation .....</b>	<b>24</b>
<b>IV.</b>	<b>LE MARAVIROC ANTAGONISTE DU RECEPTEUR CCR5.....</b>	<b>25</b>
<b>IV.1</b>	<b>Mécanisme d'action et efficacité .....</b>	<b>25</b>
<b>IV.2</b>	<b>Population cible :.....</b>	<b>25</b>
<b>IV.3</b>	<b>Problématiques liées au traitement.....</b>	<b>25</b>
IV.3.1	<i>Basculement de tropisme des VIH des patients sous maraviroc .....</i>	25
IV.3.2	<i>Toxicité au long cours - Inhibition du récepteur CCR5.....</i>	26
IV.3.3	<i>Résistance .....</i>	27
<b>V.</b>	<b>CONDITIONS ACTUELLES DE LA PRISE EN CHARGE PAR L'ASSURANCE MALADIE .....</b>	<b>27</b>
<b>VI.</b>	<b>IDENTIFICATION DANS LES NOMENCLATURES ÉTRANGÈRES .....</b>	<b>28</b>
	<b>MÉTHODE D'ÉVALUATION.....</b>	<b>29</b>
<b>I.</b>	<b>RECHERCHE DOCUMENTAIRE .....</b>	<b>29</b>
<b>I.1</b>	<b>Bases automatisées de données bibliographiques .....</b>	<b>29</b>
I.1.1	<i>Bases de données bibliographiques consultées :.....</i>	29
I.1.2	<i>Stratégie d'interrogation des bases et résultats.....</i>	29
<b>II.</b>	<b>SÉLECTION DES DOCUMENTS IDENTIFIÉS .....</b>	<b>32</b>
<b>II.1</b>	<b>Première sélection des documents identifiés par la recherche bibliographique.....</b>	<b>32</b>
<b>II.2</b>	<b>Sélection des documents analysés dans ce rapport .....</b>	<b>32</b>
II.2.1	<i>Critères de sélection .....</i>	32
II.2.2	<i>Résultats.....</i>	32
<b>III.</b>	<b>GROUPE DE TRAVAIL .....</b>	<b>33</b>
<b>III.1</b>	<b>Constitution .....</b>	<b>33</b>
<b>III.2</b>	<b>Composition .....</b>	<b>33</b>
<b>III.3</b>	<b>Déclaration d'intérêts .....</b>	<b>34</b>
<b>III.4</b>	<b>Recueil de la position argumentée du groupe de travail .....</b>	<b>34</b>
	<b>RÉSULTATS DE L'ÉVALUATION.....</b>	<b>35</b>
<b>I.</b>	<b>CRITÈRES D'ÉVALUATION .....</b>	<b>35</b>
<b>I.1</b>	<b>Capacité diagnostique .....</b>	<b>35</b>
<b>I.2</b>	<b>Détection des souches minoritaires X4 .....</b>	<b>35</b>
<b>I.3</b>	<b>Taux de non réponses.....</b>	<b>35</b>
<b>II.</b>	<b>TECHNIQUES PHÉNOTYPIQUES .....</b>	<b>36</b>
<b>II.1</b>	<b>Essai Historique, Test sur cellules MT-2.....</b>	<b>36</b>
<b>II.2</b>	<b>Techniques à virus recombinants .....</b>	<b>36</b>
II.2.1	<i>Trifile™ (Monogram Biosciences) ou Phenosense env Essay.....</i>	37
II.2.2	<i>Phénoscript Env Essay™ (VIRaliance).....</i>	39
II.2.3	<i>Virco tropism platform (Virco BVBA, Belgique).....</i>	40
II.2.4	<i>Test à virus recombinant du laboratoire de virologie de Toulouse.....</i>	40
<b>III.</b>	<b>TECHNIQUES GÉNOTYPIQUES.....</b>	<b>41</b>
<b>III.1</b>	<b>Base physiologique – structure gp120 .....</b>	<b>41</b>
<b>III.2</b>	<b>Principe Technique .....</b>	<b>41</b>
<b>III.3</b>	<b>Algorithmes disponibles .....</b>	<b>41</b>
III.3.1	<i>PSSM .....</i>	42
III.3.2	<i>SVM.....</i>	42
III.3.3	<i>SVM avec noyau à segments distants :.....</i>	42
III.3.4	<i>Réseaux de neurones artificiels .....</i>	42
III.3.5	<i>Arbres décisionnels.....</i>	42
III.3.6	<i>Descripteurs structurels : .....</i>	42
III.3.7	<i>Méthode dite 11/25 .....</i>	42

III.3.8	Charge électrostatique nette .....	43
<b>III.4</b>	<b>Analyse d'efficacité</b> .....	<b>43</b>
III.4.1	Articles sélectionnés .....	43
III.4.2	Résultats obtenus sur séquences isolées des gènes env.....	43
III.4.3	Capacité diagnostique : .....	46
III.4.4	Détection des souches X4 minoritaires. ....	48
III.4.5	Taux de non réponses.....	48
III.4.6	Problèmes organisationnels .....	48
<b>IV.</b>	<b>RECOMMANDATIONS IDENTIFIÉES POUR LA DETERMINATION DU TROPISME</b> .....	<b>49</b>
<b>V.</b>	<b>TEST DE TROPISME – ECHEC THÉRAPEUTIQUE</b> .....	<b>49</b>
	<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>50</b>
<b>I.</b>	<b>INDICATIONS</b> .....	<b>50</b>
I.1.1	Préalable au traitement par inhibiteur du récepteur CCR5 .....	50
I.1.2	Situation d'échec thérapeutique. ....	50
<b>II.</b>	<b>CONTRÔLE QUALITÉ</b> .....	<b>50</b>
<b>III.</b>	<b>TESTS PHÉNOTYPIQUES</b> .....	<b>50</b>
<b>III.1</b>	<b>Tests Phénotypiques historiques</b> .....	<b>50</b>
<b>III.2</b>	<b>Tests Phénotypiques à virus recombinants</b> .....	<b>50</b>
III.2.1	Performances.....	50
III.2.2	Aspects organisationnels .....	50
<b>IV.</b>	<b>TESTS GÉNOTYPIQUES</b> .....	<b>51</b>
IV.1.1	Performances.....	51
IV.1.2	Aspects organisationnels .....	51
	<b>ANNEXES</b> .....	<b>52</b>
<b>I.</b>	<b>MÉTHODE GÉNÉRALE D'ELABORATION D'UN RAPPORT D'ÉVALUATION D'UNE TECHNOLOGIE DE SANTÉ</b> .....	<b>52</b>
<b>II.</b>	<b>CRITÈRES D'ECHEC THÉRAPEUTIQUE DANS LES ÉTUDES MOTIVATE</b> .....	<b>53</b>
<b>III.</b>	<b>COMPTE-RENDU DU GROUPE DE TRAVAIL</b> .....	<b>53</b>
<b>III.1</b>	<b>Composition du groupe de travail</b> .....	<b>53</b>
<b>III.2</b>	<b>Contexte</b> .....	<b>54</b>
<b>III.3</b>	<b>Population cible</b> .....	<b>54</b>
<b>III.4</b>	<b>Evaluation de l'efficacité des techniques phénotypiques et génotypiques</b> ....	<b>55</b>
III.4.1	Critères d'évaluation (détection des souches minoritaires).....	55
III.4.2	Tests historiques .....	55
III.4.3	Tests phénotypiques à virus recombinants.....	56
III.4.4	Tests génotypiques de tropisme.....	58
III.4.5	Efficacité diagnostique des tests génotypiques de tropisme .....	60
<b>III.5</b>	<b>Perspectives</b> .....	<b>61</b>
III.5.1	Mécanismes d'échappement au maraviroc – détection des résistances.....	61
III.5.2	Immunomodulation et antagonistes du CCR5 .....	62
III.5.3	Tropisme – Marqueur pronostique ?.....	63
<b>III.6</b>	<b>Synthèse des positions sur les différentes techniques de tropisme</b> .....	<b>63</b>
III.6.1	Aspect organisationnels .....	63
III.6.2	Performance diagnostiques.....	63
III.6.3	Contrôle qualité.....	64
III.6.4	Évaluation globale.....	64
<b>IV.</b>	<b>PROTOCOLE DE L'ÉTUDE « GENOTROPISM » : ÉTUDE DE LA CORRÉLATION GÉNOTYPE DE LA GP120/ PHÉNOTYPE POUR LE TROPISME R5/X4 DU VIH-1 ET CORRÉLATION À LA RÉPONSE VIROLOGIQUE AU MARAVIROC</b> .....	<b>65</b>
<b>IV.1</b>	<b>Investigateurs</b> .....	<b>65</b>
<b>IV.2</b>	<b>Rationnel</b> .....	<b>65</b>
<b>IV.3</b>	<b>Objectifs de l'étude</b> .....	<b>66</b>

<b>IV.4 Méthodes</b> .....	<b>66</b>
<b>IV.5 Méthodologie et analyse statistique</b> .....	<b>67</b>
<i>IV.5.1 Objectif principal</i> .....	67
<i>IV.5.2 Corrélation tropisme génotypique/réponse virologique et immunologique</i> ..	68
<b>REFERENCES</b> .....	<b>69</b>

---

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché.

ANRS : Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales.

EMA : *European Medicines Agency* (agence européenne d'évaluation des médicaments).

EBV : *Virus Epstein Barr*.

HEK : *Human Embryonic Kidney* (Cellules de rein embryonnaire).

PBMC : cellules mononucléées circulantes (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*).

PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase. Technique d'amplification génique.

ROC : Courbe ROC (*Receiver Operating Characteristics*). Une courbe ROC est le tracé des valeurs de la sensibilité Se en fonction de 1-Sp. Cette courbe permet d'optimiser le choix du seuil d'une technique diagnostique.

SVM : machines à vecteurs de support.

VIH : Virus d'immunodéficience Humaine.

TBEV : *Tick-Borne Encephalitis Virus* - Virus de l'encéphalite à tiques.



---

## LEXIQUE

---

- Écart interquartile : différence entre le quartile supérieur ( $Q_3$ ) et le quartile inférieur ( $Q_1$ ) ; cet écart couvre 50% des données.
- Procédure centralisée : Cette procédure permet d'obtenir une seule AMM valable dans tous les États Membres de l'Union Européenne. Elle est obligatoire pour les médicaments biotechnologiques, et optionnelle pour les médicaments innovants.
- Random Forest : Technique d'apprentissage supervisée qui combine une technique d'agrégation et une technique particulière d'induction d'arbres de décision.
- Résistance primaire : se définit comme la résistance aux antirétroviraux survenant chez un patient n'ayant jamais été traité auparavant.

---

## ORIGINE DE LA DEMANDE

---

L'évaluation de la spécialité pharmaceutique Celsentri<sup>®</sup> (maraviroc) par la Commission de la transparence de la HAS a mis en évidence la nécessité de l'évaluation des tests de tropisme du VIH pour une éventuelle inscription à la Nomenclature des actes de biologie médicale (NABM).

La demande d'évaluation émane de l'Agence nationale de recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS).

La demande initiale concernait uniquement les tests génotypiques de tropisme. Au cours du cadrage de cette évaluation, il est apparu nécessaire d'évaluer les performances diagnostiques des tests phénotypiques : dans les différents essais publiés, les tests génotypiques utilisent comme tests de référence, les tests phénotypiques de tropisme.

---

## TEXTE COURT

---

Ce rapport évalue les tests de tropisme nécessaires dans le traitement par antagoniste du récepteur CCR5 en vue de leur inscription à la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM).

### I. CONTEXTE

#### I.1 Mécanisme d'entrée du VIH

L'entrée du VIH-1 dans la cellule hôte est une étape hautement régulée de son cycle vital. La glycoprotéine virale gp120 possède un domaine de liaison au récepteur CD4, qui constitue le récepteur principal du virus. La fixation de la gp120 au CD4 conditionne l'ensemble des étapes suivantes permettant la pénétration de la nucléocapside virale dans le lymphocyte, mais n'est pas suffisante : un corécepteur est nécessaire pour permettre l'entrée du virus. Seuls deux corécepteurs ont été identifiés comme étant impliqués *in vivo*, les récepteurs CCR5 et CXCR4. Les souches de VIH peuvent utiliser comme corécepteur la molécule CCR5 (souches dites à **tropisme R5**), la molécule CXCR4 (souches dites à **tropisme X4**), soit indifféremment l'une ou l'autre molécule (souches dites à **tropisme double X4R5**). Par ailleurs, ces différentes souches virales peuvent coexister chez un même patient (dans ce cas, les échantillons plasmatiques de ces patients sont dits à **tropisme mixte**). Il est en général impossible de distinguer les prélèvements à tropisme mixte des prélèvements à tropisme double ; c'est pourquoi on désigne ces échantillons comme étant à **tropisme double/mixte**.

#### I.2 Importance du Tropisme viral dans l'infection par VIH

L'utilisation du corécepteur par les souches du VIH (R5 ou X4) définit en grande partie sa capacité cytopathique, sa cinétique de réplication et le tropisme cellulaire du virus. L'utilisation du corécepteur apparaît liée au pouvoir infectieux du virus. Les souches X4 sont associées à une progression plus rapide vers le stade de SIDA. La majorité des patients VIH + sont initialement infectés par des souches R5 ce qui suggère un possible avantage de ces souches dans les mécanismes de transmission.

#### I.3 Maraviroc, antagoniste sélectif du récepteur CCR5

##### I.3.1 Mécanisme d'action et efficacité du maraviroc

Le maraviroc est une petite molécule, antagoniste sélectif et réversible du récepteur CCR5.

Le maraviroc a été plus efficace que le placebo sur 1076 patients infectés par des virus VIH-1 détectés à tropisme R5 dans deux essais pivots.

Ce médicament n'a pas démontré la même efficacité chez des patients infectés par des virus VIH détectés à tropisme double / mixte.

##### I.3.2 Détermination du tropisme viral préalable au traitement par maraviroc

Avant de traiter par maraviroc, il est donc nécessaire de confirmer qu'il n'est pas détecté de virus à tropisme CXCR4 ou à tropisme double/mixte sur un échantillon sanguin récent. Le test utilisé dans les études pivots pour l'obtention de l'AMM est un test phénotypique à virus recombinants, le test Trofile™ de chez Monogram.

### *I.3.3 Détermination du tropisme viral en situation d'échec thérapeutique avec une combinaison d'antirétroviraux comprenant le maraviroc*

L'échec du traitement comprenant le maraviroc s'est associé dans les essais pivots à la détection de virus VIH-1 à tropisme X4 ou double/mixte. La réalisation d'un test de tropisme doit donc être évaluée dans cette situation afin d'orienter la décision thérapeutique.

## **I.4 Contexte réglementaire**

La spécialité pharmaceutique Celsenti® (dont le principe actif est le maraviroc) est le premier médicament de la classe des antagonistes du récepteur CCR5 à obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). Cette AMM a été concédée par procédure centralisée de l'Agence européenne du médicament le 18 septembre 2007.

Le maraviroc en association avec d'autres médicaments antirétroviraux, est indiqué dans le traitement de l'infection par le VIH-1 à tropisme détecté uniquement CCR5 chez l'adulte prétraité par des antirétroviraux.

Le 11 juin 2008, la commission de la transparence de la HAS a rendu un avis favorable à son inscription sur la liste des spécialités remboursables aux assurés sociaux et sur la liste des médicaments agréés à l'usage des collectivités et divers services publics.

## **II. MÉTHODE D'ÉVALUATION**

La méthode proposée par la HAS pour évaluer les tests de tropisme du VIH-1 est fondée sur les données scientifiques identifiées et la position des professionnels réunis dans un groupe de travail.

### **II.1 Analyse critique des données de la littérature**

La recherche bibliographique a été effectuée sur les bases de données Medline, Embase, Cochrane.

Un total de 26 études ont été retenues sur au moins un des critères suivants : essais de validation de laboratoire, études randomisées, études comparatives tests génotypiques versus tests phénotypique (ces essais ont pour variable principale la concordance de résultats); soit 9 études comparatives et 17 études de validation. Aucune étude randomisée comparant les résultats des tests génotypiques et phénotypiques dans le cadre de l'administration du maraviroc et ayant pour variable principale l'efficacité du traitement n'a été identifiée.

Les critères suivants ont été retenus pour évaluer l'efficacité des tests de tropisme :

- La performance diagnostique : la capacité à classer correctement les différents isolats clonaux présents dans les échantillons : sensibilité et spécificité du test.
- Le taux de non-réponse. Ce taux de non réponse correspond au pourcentage d'échantillons testés pour lesquels il est impossible de rendre un résultat ou qui aboutissent à des résultats inexploitable. Ces non-réponses peuvent être dues à différentes raisons comme par exemple, une charge virale insuffisante qui peut induire un échec des techniques de biologie moléculaire ; des erreurs d'extraction, des lignées cellulaires instables...
- L'aptitude à détecter les quasi-espèces ou souches minoritaires à tropisme X4 ou double. Les populations virales minoritaires présentes ne sont pas détectées par les tests de tropisme en dessous d'un seuil qui est différent pour chaque test. Ces variants minoritaires peuvent émerger en raison de leur avantage répliatif si le traitement antirétroviral n'est pas suppressif. Cette variable est donc essentielle et peut être impliquée dans l'échec thérapeutique.

## II.2 Groupe de travail :

La position d'un groupe composé de 7 experts en virologie, médecine interne, infectiologie et immunologie clinique a été recueillie lors d'une réunion de travail.

## III. RESULTATS DE L'ÉVALUATION

### III.1 Tests phénotypiques

Les tests phénotypiques déterminent le tropisme en évaluant la capacité des virus du patient (ou des pseudo-virus produits à partir de ceux-ci) à infecter des lignées cellulaires n'exprimant qu'un seul des deux corécepteurs du VIH (CCR5 ou CXCR4).

#### III.1.1 Test phénotypique historique – MT2

Ce test se base sur la co-culture des cellules mononucléées sanguines (PBMC) du patient avec des cellules MT2 (qui ne présentent que le corécepteur CXCR4).

Il n'existe que peu de données d'efficacité sur ce test. En se basant sur l'avis d'experts, l'utilisation de cette technique en pratique courante est limitée par ses contraintes techniques. En effet, cette technique nécessite des charges virales (CV) élevées (>5000 c/ml) et les patients sous traitement antirétroviral présentent des CV de plus en plus basses, même en cas d'échec thérapeutique.

#### III.1.2 Tests phénotypiques à virus recombinants

Ces techniques se basent sur la production de virus recombinants à partir des virus VIH plasmatiques du patient ; la capacité à infecter des lignées cellulaires n'exprimant qu'un seul corécepteur (CCR5 ou CXCR4) détermine le tropisme des virus recombinants.

##### III.1.2.1 Trofile™

Trofile™ a démontré être suffisamment fiable pour administrer le Maraviroc, puisque ce médicament a été efficace chez les patients détectés R5 par ce test lors des essais d'AMM.

##### *Performance diagnostique*

En l'absence de test de référence, aucune donnée de sensibilité et spécificité n'est disponible.

Malgré la fiabilité démontrée, l'analyse phylogénique rétrospective des souches de patients en échec de maraviroc a démontré que le test Trofile™ peut donner un résultat R5 chez des patients infectés par des populations virales doubles.

##### *Détection des souches minoritaires :*

TROFILE™ détecte les souches minoritaires à tropisme X4 ou double si elles représentent plus de 5 % à 10% des souches virales de l'échantillon testé. Le seuil de détection a été déterminé sur des échantillons calibrés avec des proportions décroissantes de souches à tropisme X4 ou double. Ce seuil ne reflète qu'en partie la capacité de détection des souches minoritaires présentes chez un patient.

##### *Taux de non-réponse :*

Le taux d'échantillons non-concluants (2,5 à 28%) au sein des essais retenus peut s'expliquer en partie par la complexité de la technique. En ce qui concerne les réponses en fonction de la charge virale, cette technique nécessite une charge virale du patient supérieure à 1000 copies par ml.

### III.1.2.2 Autres tests phénotypiques à virus recombinants

Trois autres tests ont été identifiés :

- VIRCO BVBA ®, développé par un laboratoire privé en Belgique ; aucune donnée de commercialisation en France ;
- Phenoscript ®, développé par un laboratoire privé en France, mais non encore commercialisé.
- Un test développé par un laboratoire hospitalier en France est disponible (Laboratoire de Virologie de Toulouse).

Peu de données fiables sont disponibles sur ces tests.

#### *Performance diagnostique*

Aucune donnée de sensibilité/spécificité ou sur leur utilisation dans le cadre de l'administration du maraviroc n'est disponible.

#### *Détection des souches minoritaires*

Phenoscript ® présenterait (d'après les résumés des publications) un seuil de détection de 5 à 10%. Le test de Virco BVBA ® détecte des populations minoritaires jusqu'à 10% pour des charges virales supérieures à 100 000 copies par ml.

La technique mise en place dans le laboratoire de virologie de Toulouse indique un seuil de détection de 5 à 10 % de souches minoritaires X4.

#### *Taux de non réponse*

Avec des échantillons dont la CV était supérieure à 400 copies/ml, le taux de non réponses du test du laboratoire de Toulouse a été de 1,9%. Ce taux de non réponses a été sur une étude de 3,2% pour Phenoscript et de 0% pour Virco BVBA.

Aucun des tests cités n'ont de données publiées sur le taux de réponses en fonction de la charge virale. D'après deux résumés de présentations de congrès, Phenoscript rendrait 94 % de réponses pour des échantillons dont les charges virales (CV) > 1000 copies / ml.

### III.1.2.3 Aspects organisationnels

#### *Disponibilité :*

Il est nécessaire de réaliser ces tests dans un laboratoire avec un confinement de niveau 3, ce qui limite le nombre de laboratoires susceptibles de les réaliser.

Seuls Trofile™ et le test du CHU de Toulouse sont disponibles actuellement. Cependant, le test Trofile™ n'est réalisé que dans un laboratoire de la compagnie Monogram situé aux Etats Unis d'Amérique (EUA), ce qui nécessite l'envoi des échantillons plasmatiques aux EUA, posant donc des problèmes organisationnels.

#### *Délai de rendu des résultats :*

Il n'y a pas de données publiées. D'après les experts consultés, le délai de rendu du résultat du test Trofile™ est en moyenne de 3 semaines. Sur avis d'experts, ce délai pourrait être similaire pour les autres tests phénotypiques à virus recombinants.

## III.2 Tests génotypiques

La technique génotypique de détermination du tropisme viral se base sur le même principe que les tests génotypiques de résistance aux anti-rétroviraux : à partir du séquençage de l'ARN viral, des algorithmes informatiques permettent de prédire le phénotype du virus.

Une amplification puis un séquençage des boucles V3 de la gp120 des virus plasmatiques du patient constituent la première étape.

Différents algorithmes sont appliqués pour déterminer une probabilité du tropisme viral du patient en fonction des séquences amplifiées.

### *III.2.1 Performance diagnostique*

Les algorithmes génotypiques comparés aux tests phénotypiques présentent une bonne concordance globale. Néanmoins, on observe des performances diagnostiques très différentes en fonction de l'essai. Les tests comparateurs ainsi que les caractéristiques des patients étaient différents pour chaque étude. Cette hétérogénéité ne permet pas d'exprimer sous forme d'un résultat unique les données des différentes études. Dans ces essais, la sensibilité a varié de 10 % à 93% et la spécificité de 58 à 94%. La sensibilité et la spécificité les plus basses ont été observées pour l'algorithme Geno2Pheno dans deux études utilisant des comparateurs différents (le test MT2 et Trofile™ respectivement)

Le résultat le plus performant décrit dans une étude récente avec un algorithme amélioré montre une sensibilité de 93%, et une spécificité de 71%, comparé à Trofile™.

Une étude (34 échantillons) semble montrer l'intérêt de la réalisation de ces tests sur les provirus des cellules mononuclées plasmatiques par rapport aux virus plasmatiques (la sensibilité a augmenté de 50 % à 83 %).

### *III.2.2 Détection des souches minoritaires*

Une seule étude a réalisé un étalonnage des résultats obtenus avec des algorithmes informatiques en fonction du pourcentage de populations minoritaires X4 et R5X4. Le seuil de détection se situe selon cette étude aux alentours de 20%. Cette donnée semble confirmée par le rapport d'experts sur la prise en charge des patients infectés par le VIH : après une expérience ample de tests génotypiques de résistance, on estime que les méthodes de séquençage ne permettent pas la détection de sous-populations minoritaires au-dessous d'un seuil correspondant à 20 % de la population virale globale. Ce qui veut dire qu'en dessous de ce seuil les souches minoritaires potentiellement résistantes ne sont pas détectées.

### *III.2.3 Taux de non réponses*

Le taux de non réponses oscille entre 3,2% pour une étude sur 79 échantillons et 0% pour les autres. Aucune donnée sur le taux de réponse en fonction de la charge virale n'a été identifiée dans aucun des essais analysés.

### *III.2.4 Aspects organisationnels.*

#### Disponibilité de la technique

Le niveau de confinement nécessaire est plus faible (niveau de confinement 2) : les laboratoires de virologie réalisant déjà les tests génotypiques de résistance peuvent prendre en charge cette technique (une quarantaine en France, publics pour la plupart). L'accès libre à plusieurs de ces algorithmes garantit une diffusion rapide de la technique et les algorithmes de détermination du tropisme peuvent être réévalués et adaptés, à l'instar des algorithmes d'interprétation des tests génotypiques de résistance.

#### Délai de rendu de résultats

Le temps de réalisation stricto sensu des tests génotypiques est plus court que celui des tests phénotypiques ; 5 jours face à 10 jours respectivement.

Néanmoins le grand nombre de tests génotypiques (de résistance) ainsi que la nécessité pour le laboratoire d'avoir un nombre suffisant d'échantillons pour initier

les déterminations automatisées ont pour conséquence de retarder le rendu effectif du résultat : 3 semaines en moyenne pour un test génotypique de résistance (comparable au temps moyen de rendu du test Trofile™ à l'heure actuelle). Ce délai de 3 semaines est considéré par les infectiologues du groupe d'experts consultés comme acceptable pour une utilisation clinique.

### **III.3 Tests de tropisme et échec thérapeutique aux antagonistes du récepteur CCR5**

Il n'existe pas de données formelles dans la littérature disponible pour établir une stratégie en cas d'échec thérapeutique sous maraviroc. Néanmoins l'émergence de souches X4 s'est associée à l'échec de traitement dans les essais d'AMM. Les experts consultés du groupe de travail ainsi que deux recommandations nationales (française et nord-américaine) pour la prise en charge des patients infectés par le VIH (fondées sur l'avis d'experts) considèrent cohérente la réalisation d'un test de tropisme en cas d'échec thérapeutique pour orienter les décisions du clinicien.

Les tests génotypiques de tropisme peuvent de surcroît détecter les mutations impliquées dans la résistance aux antagonistes de CCR5 (mais uniquement au niveau de la boucle V3 de la gp120).

### **III.4 Contrôle qualité**

Selon les experts consultés, la complexité des techniques, la variabilité des approches rendent très difficile une comparaison stricte et formelle des méthodes. Il semble donc essentiel d'établir un contrôle de qualité pour les tests de tropisme du VIH comme celui qui existe déjà pour les tests génotypiques de résistance.

L'AFSSAPS en collaboration avec l'ANRS (à travers l'action coordonnée 11), travaillent déjà à la mise en place de ce contrôle de qualité pour les tests de tropisme.

### **III.5 Population cible des tests de tropisme**

La population cible de ces tests en préalable à l'administration d'un antagoniste du récepteur CCR5 correspond actuellement à la population cible du maraviroc. La commission de la transparence de la HAS a estimé que cette population est de 5 000 à 6 000 patients.

Aucune donnée fiable sur le pourcentage de patients ayant initié un traitement incluant le maraviroc et en situation d'échec thérapeutique (pour lesquels une détermination de tropisme est nécessaire) n'a été identifié.

L'élargissement potentiel des indications du maraviroc pourrait générer un surcroît des demandes de déterminations.

## **IV. CONCLUSIONS**

### **IV.1 Indications**

#### *IV.1.1 Préalable au traitement par inhibiteur du récepteur CCR5*

La détermination du tropisme viral est nécessaire en préalable au traitement par un antagoniste du CCR5, car ce traitement n'étant pas efficace pour les patients infectés par des virus à tropisme autre que R5.

#### *IV.1.2 Situation d'échec thérapeutique.*

La réalisation d'un test de tropisme est indiquée en cas d'échec thérapeutique sous traitement par antagoniste du CCR5 pour guider le clinicien dans le choix d'une nouvelle combinaison d'antirétroviraux.



## IV.2 Contrôle qualité

Il est essentiel d'établir un contrôle de qualité national et coordonné, quelle que soit la technique utilisée pour la détermination du tropisme viral. L'AFSSAPS et l'ANRS (action coordonnée 11) travaillent actuellement à la mise en place de celui-ci.

## IV.3 Tests phénotypiques

Le test à cellules MT2 est un outil de recherche nécessaire mais il ne semble pas utilisable en pratique clinique. Les conclusions portent donc sur les tests à virus recombinants.

### IV.3.1 Performances

TROFILE™ a démontré être suffisamment fiable pour administrer le Maraviroc. Les autres tests à virus recombinants avec des caractéristiques de laboratoire similaires à celles affichées par TROFILE™ (fonctionnant avec des charges virales supérieures à 1000 c/ml, avec un seuil de détection de X4 minoritaires en laboratoire de 5 à 10%) pourront être utilisés pour administrer le maraviroc.

### IV.3.2 Aspects organisationnels

La diffusion de ces techniques est limitée par les contraintes techniques. Il est nécessaire de réaliser ces tests dans un laboratoire avec un confinement de niveau 3.

Le test commercial le plus accessible n'est disponible que dans un laboratoire aux EUA. Aucune donnée sur le contrôle qualité de celui-ci n'a été identifiée. Un seul laboratoire de virologie hospitalier est probablement en mesure de fournir un test phénotypique à virus recombinants en France ; en effet une formation spécifique du personnel de laboratoire ainsi qu'un investissement lourd sont nécessaires à la mise en place de ces tests.

Le délai moyen de rendu des résultats est d'environ 3 semaines pour Trofile™. Aucune donnée pour les autres tests à virus recombinants n'est disponible, mais ce délai devrait être similaire d'après les experts consultés. Ce délai de 3 semaines est considéré acceptable dans le contexte de la prise en charge des patients infectés par le VIH.

## IV.4 Tests Génotypiques

### IV.4.1 Performances

Il n'existe pas de réponse tranchée sur l'efficacité diagnostique clinique des tests de tropisme génotypiques. Leur concordance diagnostique en laboratoire semble acceptable (environ 90%) avec les tests phénotypiques. Une étude récente avec une actualisation de l'algorithme PSSM a permis d'atteindre une sensibilité de 93% avec une spécificité de 71%. Néanmoins plusieurs inconnues persistent :

Contrairement aux tests phénotypiques, les réponses en fonction des CV n'ont pas été évaluées. De même, le seuil de détection des souches minoritaires reste à déterminer. Ce seuil pourrait être similaire à celui des tests de résistance : 20%.

Les incertitudes actuelles quand à la fiabilité des tests génotypiques peuvent occasionner une perte de chance pour le patient : d'une part, l'administration à tort du traitement à un patient infecté par des souches virales à tropisme X4 ou mixte /double, donc d'un traitement non efficace pour ce patient (retardant l'administration d'un traitement efficace) et d'autre part, cette administration à tort peut favoriser l'émergence de résistances aux autres antirétroviraux de la trithérapie.

L'étude ANRS « GenoTropism », en cours, apportera données sur l'utilisation de ces tests en pratique clinique (une synthèse du protocole est disponible en

Annexe IV du rapport). La corrélation entre la prédiction du tropisme par le test phénotypique et par les algorithmes génotypiques sera étudiée.

Les relations entre la prédiction génotypique du tropisme et la réponse virologique et immunologique au maraviroc seront également analysées (objectif secondaire).

#### *IV.4.2 Aspects organisationnels*

Le niveau de confinement nécessaire pour la réalisation de ces tests est celui d'un laboratoire niveau 2. Pour la France, l'option qui serait la plus rapidement généralisable est celle de l'utilisation des tests génotypiques de tropisme étant donné que tous les laboratoires qui réalisent les tests de génotypiques de résistance sont probablement en mesure de l'appliquer.

À l'instar des algorithmes d'interprétation des tests génotypiques de résistance, les algorithmes de détermination du tropisme sont régulièrement réévalués et adaptés.

## INTRODUCTION

---

Le 18 septembre 2007, l'Agence Européenne du médicament a autorisé la mise sur le Marché par procédé centralisé du premier antirétroviral de la classe des anti-CCR5.

*Le maraviroc est indiqué, en association avec d'autres médicaments antirétroviraux, dans le traitement de l'infection par le VIH-1 à tropisme détecté uniquement CCR5 chez l'adulte prétraité par des antirétroviraux*

Le récepteur CCR5 à chimiokines est un des deux corécepteurs d'entrée cellulaire du VIH-1. Les souches de VIH-1 utilisent soit le récepteur à chimiokines CCR5, soit le récepteur à chimiokines CXCR4, soit les deux. Ceci définit le tropisme du VIH-1 : tropisme R5 (VIH utilisant exclusivement CCR5), tropisme X4, tropisme double ou X4R5 (virus capable d'utiliser indifféremment les deux corécepteurs). Un même échantillon peut contenir des VIH à tropisme X4 et d'autres à tropisme R5 ; on parle alors de tropisme mixte.

La détermination du corécepteur utilisé par les souches de VIH-1 du patient, préalable à l'administration du maraviroc, se fait par la réalisation d'un test de tropisme.

L'évaluation de la spécialité pharmaceutique Celsentri® (maraviroc) par la Commission de la transparence de la HAS a mis en évidence la nécessité de l'évaluation des tests de tropisme du VIH pour une éventuelle inscription à la Nomenclature des actes de biologie médicale (NABM).

L'Agence Nationale de Recherche sur les Sida et les hépatites virales (ANRS) a saisi la HAS pour évaluer les tests génotypiques de détermination du tropisme du VIH-1 en vue d'une d'inscription de l'acte à la NABM.

Deux types de tests existent : les tests génotypiques et les tests phénotypiques. En général ils sont comparés entre eux dans les études de validation. C'est pourquoi la Commission d'évaluation des Actes Professionnels (CEAP) a décidé d'étendre le champ d'évaluation aux techniques phénotypiques de tropisme.

## CONTEXTE

---

### I. SOURCES D'INFORMATION

Ce chapitre de contexte a été élaboré à partir d'une revue non systématique de la littérature publiée, des recommandations, du site de l'agence européenne d'évaluation des médicaments (EMA) et de la consultation de sites des sociétés savantes.

### II. CONTEXTE DE LA DEMANDE

Le maraviroc est une petite molécule, antagoniste sélectif et réversible du récepteur à chimiokines CCR5. Celsentri® est le premier médicament de la classe des antagonistes du récepteur CCR5 à obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). Cette AMM a été concédée par procédure centralisée de l'Agence européenne du médicament le 18 septembre 2007. Le maraviroc en association avec d'autres médicaments antirétroviraux, est indiqué dans le traitement de l'infection par le VIH-1 à tropisme détecté uniquement CCR5 chez l'adulte prétraité par des antirétroviraux. (1)

Cette indication est basée sur les données de tolérance et d'efficacité de deux essais en double aveugle contrôlés contre placebo chez des patients prétraités par des antirétroviraux.

Avant de traiter par maraviroc, il est nécessaire de confirmer que le patient est infecté par des virus VIH-1 à tropisme R5 (c'est à dire qu'aucun virus à tropisme X4 ou à tropisme double/mixte n'est présent) sur un échantillon sanguin récent. Il n'existe pas actuellement de test de référence pour la détermination de l'utilisation des récepteurs à chimiokines par le VIH-1 (2).

Néanmoins deux types de techniques différentes ont été récemment développés. Les tests phénotypiques déterminent le tropisme en évaluant la capacité des virus du patient (ou des pseudo-virus produits à partir de ceux-ci) à infecter des lignées cellulaires n'exprimant qu'un seul des deux corécepteurs du VIH (CCR5 ou CXCR4).

Les tests génotypiques de tropisme, reposent sur les mêmes principes que ceux des tests de résistance aux antirétroviraux actuellement utilisés de façon habituelle pour l'optimisation des traitements des patients infectés par le VIH. Les tests génotypiques de tropisme nécessitent le séquençage des zones de la gp120 (principale protéine de fixation au récepteur CD4 et au corécepteur) responsables de l'union de la gp120 avec le corécepteur. L'analyse de ces séquences permet de déterminer la probabilité d'utilisation des corécepteurs par les virus.

### III. ROLE DES RÉCEPTEURS À CHIMIOKINES DANS LES MÉCANISMES D'ENTRÉE DU VIH

#### III.1 Mécanismes d'entrée du VIH

L'étude de certains patients résistants à l'infection par le VIH malgré des contacts à risques avérés ainsi que d'autres patients infectés par le VIH dont la maladie n'a pas progressé pendant de longues périodes a permis de mettre en évidence l'importance des récepteurs à chimiokines dans les mécanismes d'entrée de ce virus (3). En effet, la délétion homozygote 32-bp du gène codant pour le récepteur CCR5 induit la résistance à l'infection ; cette même délétion hétérozygote s'associe à une progression retardée de la maladie (4).

Les chimiokines ou cytokines chimiotactiques sont des polypeptides de petite taille responsables de la migration cellulaire, en particulier la migration des leucocytes,

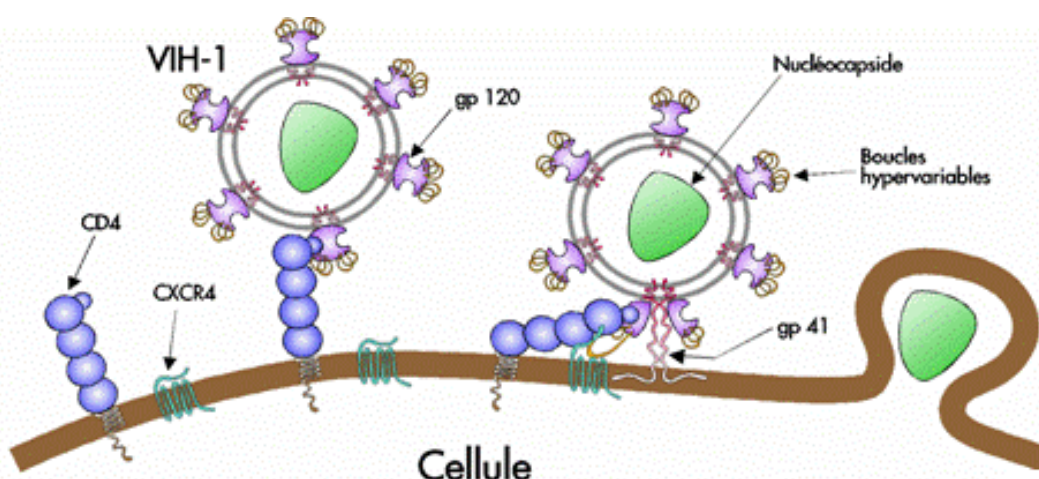
vers les tissus cibles. Elles interviennent à la fois dans l'inflammation, la maturation du système immunitaire et la réponse immune.

Les récepteurs à chimiokines se différencient par leurs ligands comme par leur expression cellulaire : CCR5 interagit avec MIP-1alpha, MIP-1Beta et Rantes ; il est exprimé sur les lymphocytes T, les monocytes et les cellules dendritiques. CXCR4 a comme ligand naturel la chimiokine CXCL12 (SDF1) (5); les lymphocytes T et B et les monocytes expriment ce corécepteur.

L'entrée du VIH-1 dans la cellule hôte est une étape hautement régulée de son cycle vital. La glycoprotéine virale gp 120 possède un domaine de liaison au récepteur CD4. La fixation de la gp120 au CD 4 conditionne l'ensemble des étapes suivantes permettant la pénétration de la nucléocapside virale dans le lymphocyte, mais n'est pas suffisante : un corécepteur est nécessaire. Seuls deux corécepteurs sont impliqués *in vivo*, les récepteurs à chimiokines CCR5 ou CXCR4 ; même si d'autres corécepteurs d'entrée du même type (récepteurs couplés à une protéine-G) ont été mis en évidence *in vitro*.

La fixation de la gp120 au récepteur CD4 induit des changements conformationnels de la gp120 qui exposent la boucle variable V3. Cette partie variable de la gp120 constitue le site de fixation au corécepteur.

L'interaction entre la gp120 et son récepteur et corécepteur induit l'exposition du peptide de fusion de la gp41 (autre protéine de surface du VIH) pour permettre finalement l'entrée de la nucléocapside dans la cellule hôte (6).



**Figure 1** - Modèle d'entrée du VIH (d'après INSERM)(7)

Les corécepteurs CCR5 et CXCR4 constituent donc une cible pharmacologique pour inhiber l'entrée du virus dans les cellules.

### III.2 Classification des souches virales selon leur tropisme

Le concept de tropisme est initialement réservé au tropisme cellulaire spécifique de certaines souches virales, qui s'associe à des stades différents de la maladie liée à l'infection par le VIH.

Le tropisme était initialement défini par la capacité à induire des syncytia de certains isolats de VIH ou souches virales en culture cellulaire (sur cellules sanguines mononucléées ou PBMC). Les virus produisant des syncytia sont appelés *SI* (*Syncytia –Inducing*) et les virus dépourvus de cette capacité, *NSI* (*Non Syncytia Inducing*).

Par la suite, la détermination de la capacité cytopathique des virus s'est faite sur lignées cellulaires MT-2, plus stables. La première étape correspond à la constitution de stocks viraux à partir de lymphocytes du patient stimulés. Les virus produits sont prélevés et mis en culture avec des cellules MT-2.

Une autre classification des souches virales était fondée sur la capacité des isolats à infecter, *in vitro*, soit des macrophages (souches *M-tropic*), soit des lymphocytes T CD4+ (souches *T-tropic*).

Les souches *T-tropic* et *SI* ont été associées à des stades plus avancés de l'infection.

La découverte des corécepteurs d'entrée apporte un lien entre les caractéristiques cytopathiques et le tropisme cellulaire des différentes souches virales. Les cellules MT-2 expriment uniquement les corécepteurs CXCR4 (6). Les souches *SI*, *T-tropic* correspondent donc à des virus n'utilisant que le récepteur CXCR4 (8).

Une nouvelle classification des virus en fonction de leur tropisme pour les récepteurs à chimiokines est donc proposée :

La plupart des souches virales, notamment dans les phases précoces de l'infection, utilisent exclusivement le corécepteur CCR5 pour entrer dans la cellule ; elles sont dites à tropisme R5. Les souches de VIH utilisant uniquement le corécepteur CXCR4 sont à tropisme X4. D'autres souches virales sont à tropisme double ou R5X4 ; elles sont capables d'utiliser indifféremment l'un ou l'autre des corécepteurs. Un même échantillon peut contenir des VIH à tropisme X4 et d'autres à tropisme R5 ; on parle alors de tropisme mixte.

### III.3 Épidémiologie et facteurs prédictifs de l'utilisation des corécepteurs

#### III.3.1 Phases de l'infection – évolution du tropisme

*In Vivo*, les souches à tropisme R5 semblent présenter un avantage sur les souches X4 lors de la transmission de l'infection. Le fait que les patients homozygotes pour la mutation Delta32-CCR5 soient particulièrement résistants à l'infection par le VIH -1 semble renforcer cette hypothèse (9) Le tropisme des souches R5 pour les cellules de Langerhans et en particulier pour les cellules dendritiques, impliquées dans le transport du virus des muqueuses jusqu'aux ganglions lymphatiques (10) peut en partie expliquer cet avantage.

Les virus R5 persistent généralement tout au long de l'infection. Chez environ la moitié des patients infectés, les phases tardives de la maladie (avec immunodéficience) se caractérisent par la prédominance de souches *SI*. (11) La présence de souches type *SI* est en général associée à un stade plus avancé de la maladie et à une phase de progression plus rapide (12).

Néanmoins, l'immunodéficience ne s'accompagne pas toujours de la détection de virus X4. (13).

Les patients infectés par le VIH présentant des infections opportunistes associées avec les stades finaux de la maladie ont une probabilité plus grande de présenter des souches X4 (12).

Plus on avance dans la maladie plus on est confronté à des souches virales qui utilisent le corécepteur CXCR4.

#### III.3.2 Prévalence des souches à tropisme X4 chez les patients prétraités.

Les essais des équipes Hunt et Melby sont des études transversales réalisées pour déterminer le tropisme des patients prétraités avec charges virales détectables. Les trois autres essais décrits dans le tableau 1 correspondent aux caractéristiques

basales de patients recrutés pour des essais cliniques de phase III pour le maraviroc et de Phase II pour le vicriviroc, un autre anti CCR5 (15,16)

Les trois études transversales réalisées sur des patients n'ayant jamais reçu de traitements antirétroviraux (naïfs de traitement), présentent des résultats congruents. Dans ces séries, le taux de patients infectés par des souches détectées à tropisme R5 se situe aux alentours de 80% ; alors que dans chacune des études sur patients prétraités, près de 50 % de personnes infectées présentent des souches à tropisme X4, double ou Mixte.

Il apparaît donc que les patients prétraités ont une plus grande probabilité de présenter des virus à tropisme X4 ou X4R5

**Tableau 1.** Prévalence des différentes souches en fonction des antécédents thérapeutiques.

	CV copies/ml	N	R5	D/M	X4	
ESSAI						
Patients Non-traités	Brumme <i>et al.</i> 2005 (17)	Mo : 120 000 (13 000–420 000)	972	82	18	<1
	Moyle <i>et al.</i> 2005 (18)	> 1000	402	81	19	<1
	Hunt <i>et al.</i> 2006 (19)	Mo : 36300 (15 135 – 114 300)	964	82		18
Patients prétraités	Hunt <i>et al.</i> 2006 (19)		161	69		41
	Wilkin <i>et al.</i> 2007 (20)	≥ 5 000	391	50,4	45,5	4,1
	Gulick <i>et al.</i> 2008 (16) (MOTIVATE 1-2)	Mo : 75 000	3244	51		49
	Melby <i>et al.</i> 2006 (21)	Me : 100 000	724	49,9	47,9	2,2
	Suleiman <i>et al.</i> 2007 (15)	Mo : 22 300	451	54	42,2	5

N: nombre de patients dont le phénotype a été déterminé. Mo : Moyenne; Me : Médiane; CV : Charge Virale

### III.3.3 Facteurs pronostiques

Plusieurs études transversales ont évalué, dans des analyses secondaires, les facteurs biologiques et cliniques associés à la présence de virus capables d'utiliser le corécepteur CXCR4. (18,19,21)

Moyle *et al* (18) dans une analyse de régression multi-variée ont montré que les patients dont les virus ont été détectés R5 exclusifs présentent des niveaux plus élevés des lymphocytes CD4+ et de cellules NK.

La présence de souches à tropisme R5 est associée dans toutes les études sauf une à des charges virales plus basses que celles détectées chez les patients infectés par des virus à tropisme X4 (21).

L'étude épidémiologique HOMER a mis en évidence un taux de portage mutation Delta32-CCR5 hétérozygote significativement inférieur chez les patients infectés par des virus R5 exclusifs par rapport aux patients infectés par des virus X4 ou à tropisme double.

### III.4 Tropisme tissulaire - Compartimentation

La compartimentation (distribution non aléatoire) des variants viraux entre plasma et cellules mononucléées du sang périphérique, a été décrite par plusieurs auteurs (22,23). L'équipe de Verhofstede *et al* (24) a analysé par génotypage (PSSM) les séquences clonales du gène *env* de 11 patients ; 427 plasmatiques et 330 obtenues par extraction à partir des cellules mononucléées. Le nombre de séquences associées aux virus à tropisme X4 a été significativement plus élevé dans les séquences cellulaires que dans celles plasmatiques ( $p < 0,0001$ ) (24).

L'infection par le VIH du Système Nerveux Central est hautement corrélée à l'utilisation du corécepteur CCR5. Le thymus apparaît colonisé de façon préférentielle par des souches virales X4 (25).

Dans une autre étude sur quatre femmes infectées par le VIH de sous-type B, les séquences génétiques virales extraites du plasma étaient significativement différentes de celles extraites des frottis cervicaux-vaginaux (26).

Les populations systémiques de VIH et celles rencontrées dans d'autres tissus se différencient donc par leur tropisme.

Les conséquences de cette compartimentation sur la détection de souches minoritaires à tropisme X4 par les tests de tropisme ne sont pas établies.

En résumé :

Les mécanismes impliqués dans l'évolution phylogénique du VIH et ses conséquences sur la virulence de l'infection ne sont que partiellement compris. Ce mécanisme n'est pas linéaire. La coexistence de souches de virulence et de tropisme différents au cours de l'infection semble être un point clé pour comprendre les difficultés liées tant à ce nouveau type de traitement comme aux techniques diagnostiques du tropisme.

L'utilisation du corécepteur par les souches du VIH (R5 ou X4) définit en grande partie sa capacité cytopathique, sa cinétique de réplication et son tropisme cellulaire *in vitro*. Les souches virales à tropisme X4 ont tendance à induire la formation du syncytium (cellules géantes multinucléées) et ont la capacité d'infecter des cellules T activées. Les souches virales à corécepteurs CCR5 n'induisent pas de syncytium et infectent des macrophages *in vitro*.

*In vivo*, l'utilisation du corécepteur apparaît liée au pouvoir infectieux du virus. Les souches X4 sont associées à une progression plus rapide vers le stade de SIDA. La capacité à utiliser un des deux corécepteurs pourrait faire varier la capacité des virus à accéder aux différents compartiments du corps humain. La majorité des patients VIH + sont initialement infectés par des souches R5 ce qui suggère un possible avantage de ces souches dans les mécanismes de transmission. En somme, l'utilisation du corécepteur par une souche de VIH est indicative de son comportement *in vitro* comme *in vivo*.



## IV. LE MARAVIROC ANTAGONISTE DU RECEPTEUR CCR5

### IV.1 Mécanisme d'action et efficacité

Le maraviroc est une petite molécule, antagoniste sélective et réversible du récepteur à chimiokines CCR5, indiquée dans le traitement de l'infection par le VIH 1 à tropisme détecté uniquement CCR5 chez l'adulte prétraité par des antirétroviraux.

Comme la plupart des molécules anti-CCR5, il agit par un mécanisme allostérique non compétitif. La fixation au CCR5, notamment dans ses domaines transmembranaires, induit une modification des domaines extracellulaires qui empêche la fixation de la gp120.

Le dossier d'évaluation clinique d'AMM se base sur deux essais comparatifs randomisés en double aveugle, réalisés chez des patients en situation d'échec thérapeutique multiple. Seuls les patients infectés par des souches virales à tropisme R5 ont été assignés aux essais MOTIVATE (*Maraviroc plus Optimized background Therapy In Viremic Antiretroviral therapy Experienced patients infected with CCR5-tropic HIV-1*), MOTIVATE-1 (601 patients) et MOTIVATE-2 (475 patients). Un seul test de tropisme phénotypique (Trofile™) a été appliqué pour l'inclusion des patients.

Dans ces deux essais, 1 076 malades infectés en échec thérapeutique aux trois principales classes d'antirétroviraux, ont été assignés de façon aléatoire à 3 bras de traitement. L'ajout de 300 mg de maraviroc, en une ou deux prises par jour, a été comparé à l'ajout d'un placebo à un traitement optimisé.

A 48 semaines, le maraviroc (dans les deux études et quelle que soit la posologie) a été plus efficace que le placebo de façon statistiquement significative selon deux critères : diminution de la charge virale (charge virale indétectable chez 45,5 % des patients versus 16,7 %) et hausse du taux de lymphocytes T CD4+ (+124 cellules/mm<sup>3</sup> versus +61).

### IV.2 Population cible :

Selon l'avis de la commission de la transparence de la HAS, " la population cible de CELSENTRI peut être estimée à environ 5 000 patients ou 6 000 patients selon la méthode utilisée pour estimer la prévalence du VIH (respectivement méthode par rétrocalcul et méthode directe) (27).

Cette population cible est relativement faible dans cette indication pour deux motifs :

- Seuls les patients infectés par des virus CCR5 exclusifs sont susceptibles de recevoir ce traitement.
- Les patients prétraités et en particulier ceux en échec thérapeutique ont une plus grande probabilité de présenter des souches à tropisme X4 au sein de leur population virale. (voir tableau 1)

Aucune donnée fiable sur le pourcentage de patients ayant initié un traitement incluant le maraviroc et en situation d'échec thérapeutique (pour lesquels une détermination de tropisme est nécessaire) n'a été identifiée.

### IV.3 Problématiques liées au traitement

#### IV.3.1 Basculement de tropisme des VIH des patients sous maraviroc

Au sein de ces deux essais MOTIVATE, le tropisme des souches virales a été déterminé à nouveau chez les patients en échec thérapeutique (voir définition en Annexe II). Un total de 57 % des patients en échec thérapeutique sous maraviroc

présentait des souches virales à tropisme X4 ou double, R5X4. Dans le groupe placebo seuls 6 % des patients en échec présentaient ces souches à tropisme X4 (28).

Ce basculement de tropisme observé chez les patients en échec thérapeutique vers des souches à tropisme CXCR4 ou double peut s'expliquer par deux mécanismes.

- Un basculement de tropisme des souches R5 vers un tropisme X4 : il est établi que des mutations même ponctuelles au niveau des gènes codant pour les boucles variables de la gp120 peuvent occasionner ce basculement phénotypique (29). Ce basculement ou *switch* ne semble pas être le mécanisme de résistance préférentiel (voir chapitre IV.3.3).
- La pression de sélection exercée par le maraviroc sur les souches de VIH est un des mécanismes le plus communément invoqué. L'inhibition des souches virales à tropisme R5 pourrait favoriser l'émergence de quasi-espèces (souches minoritaires) de VIH à tropisme X4, non détectées initialement par le test de tropisme. L'analyse phylogénique des souches virales avant, en cours et après l'arrêt de traitement (au sein des patients des essais MOTIVATE et d'autres études de phase II avec Maraviroc) semble écarter que les souches X4 puissent trouver leur origine chez les souches R5 initiales ayant muté (30,30-32).

La capacité à détecter les populations minoritaires à tropisme X4 ou double sera donc un des critères essentiels d'évaluation des tests de tropisme.

Le maraviroc n'a d'ailleurs pas démontré d'efficacité thérapeutique chez les patients infectés par des souches à tropisme X4 : Un essai de phase IIb multicentrique et randomisé (essai 1029) a été réalisé chez des patients prétraités et infectés par des virus à tropisme double ou mixte. L'ajout de maraviroc une ou deux fois par jour à un traitement optimisé a été comparé à un traitement optimisé complété par un placebo. La réduction de la charge virale a été supérieure dans le bras de traitement du maraviroc deux fois par jour ; mais la différence n'a pas été statistiquement significative par rapport au groupe contrôle (33).

#### IV.3.2 Toxicité au long cours - Inhibition du récepteur CCR5

Le récepteur CCR5 est impliqué dans les mécanismes chimiotactiques, la différenciation lymphocytaire. Son inhibition par le Maraviroc n'a pourtant pas conduit à l'apparition d'effets adverses immunologiques (1).

Si les patients homozygotes  $\Delta 32$ -CCR5 ne semblent pas voir leur espérance de vie altérée, (14) deux découvertes récentes liées à cette mutation obligent à une surveillance étroite des patients sous anti-CCR5 :

- L'association de la délétion homozygote  $\Delta 32$ -CCR5 avec un risque accru d'infection par Flavivirus : cette mutation du gène CCR5 (homozygote dans 1 % de la population caucasienne, 10 % sous sa forme hétérozygote) expose à un risque accru d'infection symptomatique au virus du Nil occidental (West Nile Virus) (34,35). Cette mutation serait également plus fréquente chez les patients développant une encéphalite liée au virus TBEV (virus de l'encéphalite à tiques)(36).
- La notification de 4 lymphomes (2 Hodgkin et 2 non-Hodgkin) dans un essai de phase II sous vicriviroc (37). Du fait de l'association connue entre ces lymphomes et le Virus Epstein Barr (EBV) une étude poussée a été menée. Seul un patient avec lymphome Hodgkin a présenté une biopsie ganglionnaire hautement positive pour EBV ; et aucun des autres 116 patients testés ne présentait de séroconversion pour EBV.

### IV.3.3 Résistance

Basculement ou *Switch* :

Comme il a été évoqué dans le chapitre IV.1.1, l'émergence des souches à tropisme X4 ou double a été un des principaux mécanismes d'échec thérapeutique chez les patients des études MOTIVATE. Une analyse du tropisme suite à un échec du traitement par maraviroc avec des virus utilisant le co-récepteur CXCR4 a démontré que la population virale, après arrêt du CELSENTRI, revenait à un tropisme détecté initialement R5 chez la majorité des patients au cours de la période de suivi. Sur 44 patients étudiés, la population virale est revenue à un tropisme exclusivement R5 chez 30 patients au cours d'un suivi médian de 203 jours ; 14 patients avaient toujours un virus utilisant le CXCR4 détectable. Cependant, la période de suivi chez ces patients était plus courte : médiane de 16 jours (1).

D'autres mécanismes d'échappement ont été mis en évidence *in vitro* pour des traitements anti-CCR5. Plusieurs auteurs ont démontré la capacité de certains virus à tropisme R5 soumis à la pression de sélection d'anti-CCR5 de répliquer au sein de monocytes sans avoir changé de corécepteur d'entrée (30,38). Ces auteurs ont démontré que les virus résistants avaient acquis la capacité d'utiliser le corécepteur malgré la liaison de celui-ci au vicriviroc (une autre molécule anti-CCR5) et au Maraviroc. Les VIH résistants pourraient entrer dans la cellule avec des niveaux de corécepteurs CCR5 plus faibles puis, acquérir la capacité de se lier aux corécepteurs malgré la fixation de l'anti-CCR5 au corécepteur (39). Chez les patients avec un virus à tropisme détecté CCR5 au moment de l'échec sous maraviroc, 15 des 36 patients avaient un virus à sensibilité réduite au maraviroc. Chez les 21 patients restant, il n'y a pas eu de preuve de présence de virus à sensibilité réduite. Au sein des études MOTIVATE, le profil de résistance des virus des patients prétraités n'a pas encore été entièrement caractérisé. Des mutations spécifiques associées à une sensibilité réduite au maraviroc ont été identifiées pour les virus de 5 patients mais chaque patient présentait un profil unique de mutations (1).

Il y a actuellement peu de données sur la résistance primaire aux anti-CCR5. L'étude française de Soulié et al a démontré la présence de certaines mutations de la boucle V3 impliquées dans la résistance aux anti-CCR5 chez 7% des 323 patients étudiés n'ayant jamais reçu ces molécules (40).

L'utilisation des tests de tropisme du VIH lors d'un échappement thérapeutique sous maraviroc apparaît cohérente, même s'il n'existe pas un faisceau suffisant de données objectives pour établir une stratégie sur les résistances au maraviroc.

Par conséquent, la poursuite du traitement par maraviroc après échec ne peut pas être recommandée de façon générale, indépendamment du tropisme viral observé (1).

## V. CONDITIONS ACTUELLES DE LA PRISE EN CHARGE PAR L'ASSURANCE MALADIE

Actuellement aucun des tests de détermination du tropisme n'est inscrit à la NABM. Le coût du test phénotypique TROFILETM est actuellement pris en charge par le fabricant du maraviroc (Pfizer) dans l'attente de la prise en charge de ces tests par l'assurance Maladie.

## VI. IDENTIFICATION DANS LES NOMENCLATURES ÉTRANGÈRES

Aucun acte de détection du tropisme du VIH n'a été identifié dans les différentes nomenclatures étrangères consultées.

**Tableau 2.** Libellés identifiés dans les nomenclatures étrangères.

Nomenclature	Code	Libellé
Américaine (CPT 2007)		Non identifié
Australienne (MBS 2007)		Non identifié
Belge (2005)		Non identifié
Québécoise (2007)		Non identifié

### En Résumé

Le maraviroc est un médicament d'une nouvelle classe pharmacologique et d'introduction récente. Si son efficacité thérapeutique est démontrée, plusieurs inconnues persistent

- Les mécanismes qui conduisent à l'émergence de souches à tropisme X4 et leurs conséquences pronostiques à long terme.
- Les effets au long cours de l'inhibition de récepteurs physiologiques impliqués dans des mécanismes immunologiques.
- Les profils de résistance primaires et secondaires au traitement ainsi que leur détection.

Il n'existe pas de test de référence pour la détermination tropisme à partir duquel comparer aux résultats des tests développés récemment. En effet le concept de tropisme a évolué : il est passé d'une classification des virus en fonction de leur capacité à induire des syncytia à une classification en fonction du corécepteur utilisé.

Les tests de détermination du tropisme du VIH sont à évaluer selon les critères suivants :

- La capacité diagnostique : capacité à classer correctement les différentes souches virales présentes dans les échantillons des patients : sensibilité et spécificité du test.
- L'aptitude à détecter les quasi-espèces ou souches minoritaires à tropisme X4 ou double. Cette variable est essentielle et peut être impliquée dans l'échec thérapeutique.
- Le taux de non-réponse. La complexité de certaines techniques peut rendre les résultats inexploitable (une charge virale insuffisante peut induire un échec des techniques de biologie moléculaire par exemple). Ce taux de non réponse correspond au pourcentage de d'échantillons testés qui n'obtiennent pas de réponse.

---

## MÉTHODE D'ÉVALUATION

---

La méthode d'évaluation utilisée dans ce rapport par la HAS (cf. Annexe I) est fondée sur :

- l'analyse critique des données identifiées de la littérature scientifique ;
- la position argumentée de professionnels de santé réunis dans un groupe de travail.

### I. RECHERCHE DOCUMENTAIRE

#### I.1 Bases automatisées de données bibliographiques

##### I.1.1 Bases de données bibliographiques consultées :

- Medline (National Library of Medicine, États-Unis) ;
- *Embase* (Elsevier, Pays-Bas) ;
- *The Cochrane Library* (Grande-Bretagne) ;
- National Guideline Clearinghouse (États-Unis) ;
- HTA Database (International Network of Agencies for Health Technology Assessment - INAHTA) ;
- Bibliothèque Médicale A.F.Lemanissier (France) ;
- CISMeF Bonnes Pratiques (France) ;
- CMA Infobase - Clinical Practice Guidelines (Canada) ;
- National Library for Health - Guidelines Finder (UK).

##### I.1.2 Stratégie d'interrogation des bases et résultats

Le tableau 3 présente de façon synthétique les étapes successives de cette interrogation et les résultats en matière de nombre total de références obtenues.

Dans ce tableau 3, la dénomination indiquée du type de document correspond à celle fournie par les bases. Elle ne constitue pas le résultat de l'appréciation méthodologique, réalisée par la HAS lors de l'analyse critique - postérieure à la recherche documentaire - des documents concernés, ce qui explique la différence entre les résultats de ce tableau 2 et les résultats de l'analyse (cf. *infra*).

La stratégie de recherche est construite en utilisant, pour chaque sujet, soit des termes issus d'un thésaurus (descripteurs du MESH par exemple pour *Medline*), soit des termes du titre ou du résumé (mots libres). Ils sont combinés en autant d'étapes que nécessaire à l'aide des opérateurs booléens. Ils sont également combinés avec les termes descripteurs de type d'étude. Le tableau ci-dessous présente la stratégie et les résultats de la recherche, en termes de nombre de références obtenues par type d'étude et par sujet, sur une période donnée. Dans ce tableau, lorsque le champ de recherche n'est pas précisé, il s'agit du champ descripteur.

Une veille documentaire a par ailleurs été menée jusqu'au terme du projet.

Cette recherche s'est poursuivie, jusqu'en juin 2009, par :

- une veille systématique, jusqu'à la fin du dossier, des revues suivantes : *British Medical Journal* (BMJ), *Journal of the American Medical Association* (JAMA), *The Lancet*, *The New England Journal of Medicine*, la presse quotidienne médicale et paramédicale et l'Agence Presse Médicale (APM) ;

- des mises à jour de la recherche sur la base de données Medline en utilisant la même stratégie.

Ces recherches ont permis de retrouver 248 nouvelles références.

**Tableau 3.** . Stratégie et résultats de la recherche documentaire.

Termes utilisés	Type d'étude / sujet	Période de recherche	Nombre de références
<b>Tests génotypique et phénotypique de tropisme pour le VIH</b>			
<b>Recommandations et conférence de consensus</b>		janvier 1998	M ; E : 1
		– mai 2008	
Étape 1	HIV OU hiv infections OU hiv infections OU human immunodeficiency virus OU hiv envelope protein gp120 OU hiv/Titre et résumé OU human immunodeficiency virus/Titre et résumé OU immunodeficiency syndrome/Titre et résumé		
ET			
Étape 2	Genotype OU phenotype OU tropism OU genotype phenotype correlation OU genotype? /Titre et résumé OU phenotyp? /Titre et résumé OU tropism/Titre et résumé		
ET			
Étape 3	Reagent kits, diagnostic OU sensitivity and specificity OU predictive value of tests OU biological assay! OU clinical laboratory techniques! OU genetic techniques! OU immunologic techniques! OU molecular probe techniques! OU reproducibility of results OU diagnosis, differential OU test? /Titre et résumé OU assay? /Titre et résumé OU determination/Titre et résumé OU analytical equipment OU prediction and forecasting OU bioassay OU diagnosis, measurement and analysis OU genetic procedures!		
ET			
Étape 4	Receptors, ccr5 OU receptors, cxcr4 OU ccr?5/Titre et résumé OU cxcr?4/Titre et résumé OU chemokine receptor ccr5 OU chemokine receptor cxcr4		
ET			
Étape 5	(Guidelines as topic OU Practice Guideline/Type de publication OU Guideline/Type de publication OU Health Planning Guidelines OU Consensus Development Conferences as topic OU Consensus Development Conferences, NIH as topic OU Consensus Development Conference, NIH/Type de publication OU Consensus Development Conference/Type de publication		
<b>Méta analyses ; Revues de littérature</b>		janvier 1998	M ; E : 21
		– mai 2008	
Étape 1			
ET			
Étape 2			
ET			
Étape 3			
ET			
Étape 4			
ET			
Étape 6	(Meta-Analysis as topic OU Meta-Analysis/Type de publication OU meta analysis/Titre) OU (Review Literature as topic OU Review/Type de publication OU systematic review/Titre)		
<b>Études contrôlées randomisées</b>		janvier 1998	M ; E : 7
		– mai 2008	
Étape 1			
ET			
Étape 2			
ET			
Étape 3			
ET			
Étape 4			

ET		
Étape 7	(Randomized Controlled Trial/Type de publication OU Randomized Controlled Trials as topic)	
<b>Études contrôlées</b>		janvier 1998 M ; E : 7 – mai 2008
Étape 1		
ET		
Étape 2		
ET		
Étape 3		
ET		
Étape 4		
ET		
Étape 8	(Controlled Clinical Trial/Type de publication OU Controlled Clinical Trials as topic OU Randomized Controlled Trial/Type de publication OU Randomized Controlled Trials as topic OU Single-Blind Method OU Double-Blind Method OU Random Allocation OU Comparative Study/Type de publication)	
<b>Études de cohortes</b>		janvier 1998 M ; E : 34 – mai 2008
Étape 1		
ET		
Étape 2		
ET		
Étape 3		
ET		
Étape 4		
ET		
Étape 9	(Comparative Study OU Cohort Studies OU Longitudinal Studies OU Follow-Up Studies OU Prospective Studies OU retrospective Studies)	
<b>Études de cas</b>		janvier 1998 M ; E : 8 – mai 2008
Étape 1		
ET		
Étape 2		
ET		
Étape 3		
ET		
Étape 4		
ET		
Étape 10	(Case study/titre, résumé OU case report/titre, résumé OU comparative study OU case report OU comparative study/Type de publication)	
<b>Autres publications</b>		janvier 1998 M ; E : 232 – mai 2008
Étape 1		
ET		
Étape 2		
ET		
Étape 3		
ET		
Étape 4		
NOT		
Étapes 1 à 10	Publications dédoublonnées des résultats précédents.	
	Nombre total de références obtenues	310
	Nombre de références retenues	131
	Nombre de références citées	71

M : Medline; E : Embase. Le signe ! signifie que le descripteur a été interrogé avec son arborescence, c'est à dire que tous ses termes spécifiques sont compris dans l'interrogation. Le signe ? notifie une troncature.

## II. SÉLECTION DES DOCUMENTS IDENTIFIÉS

### II.1 Première sélection des documents identifiés par la recherche bibliographique

La recherche bibliographique présentée ci-dessus a permis d'identifier 310 documents.

Une analyse des résumés de ces documents a permis la réalisation d'une première sélection sur les critères suivants :

- essais concernant le traitement anti CCR5 ;
- essais utilisant les techniques de détection de tropisme ;
- essais comparant les techniques entre elles ;
- essais de validation des techniques de détermination du tropisme ;
- documents de contexte ;
- document sur le rôle physiologique des corécepteurs.

A l'issue de cette première sélection, 51 documents ont été retenus.

Une relecture systématique des bases bibliographiques des articles sélectionnés a permis d'identifier 27 articles pour cette évaluation.

### II.2 Sélection des documents analysés dans ce rapport

Seuls les critères de sélection des articles utilisés pour l'évaluation des performances diagnostiques seront détaillés dans cette partie.

#### II.2.1 Critères de sélection

Les articles retenus pour l'évaluation de l'efficacité des différentes techniques diagnostiques correspondent aux essais de validation de chaque test d'une part, et les essais menés sur échantillons de patients directement. Néanmoins les évaluations de ces deux types d'essais seront clairement séparées ; l'utilisation de ces tests sur échantillons de patients doit être considérée comme la référence puisqu'elle s'approche au mieux de la pratique clinique habituelle.

#### II.2.2 Résultats

##### II.2.2.1 Tests phénotypiques

###### *TROFILE*

Un essai a été identifié pour l'évaluation des performances diagnostiques in vitro. Un total de 6 études (4907 patients) dont les tests de tropismes ont été réalisés sur échantillons de patients a été utilisé pour estimer le taux de non réponses.

###### *Phenoscript*

Seules 3 études sur les performances diagnostiques de ce test ont pu être identifiées.

###### *VIRCO BVBA*

Une étude de validation in vitro a été identifiée. Une étude dont les tests de tropisme ont été réalisés sur échantillons de patients a servi à estimer le taux de non-réponses.

Test phénotypique à virus recombinants du laboratoire de virologie de Toulouse :

Un seul essai publié a été identifié.



#### II.2.2.2 Tests génotypiques

Un total de 17 articles évaluant les performances diagnostiques des tests génotypiques a été retenu. Un des articles a été écarté puisqu'il comparait le taux de concordance de deux algorithmes génotypiques sans utiliser de test diagnostique de contrôle (41).

De ces 16 articles, 9 essais ont utilisé différents algorithmes diagnostics sur des séquences de souches virales de VIH à tropisme connu.

Un total de 7 études a été sélectionné pour l'analyse d'efficacité des techniques génotypiques de détermination du tropisme sur échantillons de patients. Ces études comparent les résultats obtenus avec différents algorithmes sur des échantillons de patients infectés par le VIH. Les essais utilisent comme test de référence un test phénotypique.

#### II.2.2.3 Tests de tropisme et échec thérapeutique au maraviroc

Aucun essai évaluant l'efficacité de la détermination du tropisme viral pour guider les choix thérapeutiques en situation d'échec thérapeutique sous maraviroc n'a été identifiée. Néanmoins deux guides nationaux sur la prise en charge des patients infectés par le VIH ont émis des recommandations pour cette situation (42,43).

### III. GROUPE DE TRAVAIL

#### III.1 Constitution

Les spécialités / sur - spécialités suivantes ont été sollicitées pour participer à cette évaluation :

- Médecine Interne / infectiologie
- Virologie
- Biologie clinique

Le groupe de travail a été constitué par des professionnels de santé indiqués par les organismes professionnels suivants :

- Société de Pathologies Infectieuses de Langue Française
- Société Française de Microbiologie
- Société Nationale Française Médecine Interne

La Société Française de Biologie Clinique avait également été sollicitée mais n'a pas indiqué de professionnels impliqués.

#### III.2 Composition

Les membres ayant accepté de participer au groupe de travail sont :

- M. le Professeur Patrice MASSIP Service des maladies infectieuses et Tropicales, Hôpital PURPAN Toulouse
- M. le Professeur François SIMON, Service de microbiologie, CHU Saint- Louis, Paris
- M. le Docteur Fernando ARENZANA-SEISDEDOS, Unité Pathogénie virale - Institut Pasteur
- M. le Professeur Jacques IZOPET Laboratoire de Virologie, Hôpital Purpan, Toulouse
- M. le Professeur Patrice MORAND, laboratoire de virologie, CHU Grenoble

- Mme le Docteur Anne BOURGARIT Service de Médecine Interne, CHU Saint Louis, Paris
- M. le Docteur Jade GHOSN, Service de Médecine Interne, Hôpital Bicêtre, Paris
- Mme le Professeur Brigitte AUTRAN Laboratoire d'Immunologie cellulaire et tissulaire, Hôpital de la Pitié–Salpêtrière, Paris.

### **III.3 Déclaration d'intérêts**

Aucun des membres du groupe de travail n'a déclaré de conflit d'intérêt majeur.

La HAS a estimé que les conflits mineurs étaient compatibles avec la participation de ces membres au groupe de travail, eu égard à leur expertise par rapport au sujet.

### **III.4 Recueil de la position argumentée du groupe de travail**

Le groupe de travail s'est réuni le 09 Mars 2009.

Le compte-rendu de cette réunion figure *in extenso* en Annexe III de ce rapport.

Ce compte-rendu a été validé par l'ensemble des membres du groupe de travail, qui ont par ailleurs accepté que leur nom figure dans ce rapport.

---

## RÉSULTATS DE L'ÉVALUATION

---

Dans cette partie d'évaluation, seuls les chapitres d'efficacité des tests sont le fruit de l'analyse systématique de la littérature. Le tropisme viral du VIH est défini par le type cellulaire dans lequel il est capable de répliquer *in vitro*. La population virale existante chez un patient peut être un mélange hétérogène de virus à tropismes différents. Un échantillon plasmatique peut donc contenir à la fois des virus R5, X4 et/ou R5X4. Les tests de détermination de tropisme seront évalués principalement en fonction de leur capacité à détecter les souches virales à tropisme X4, ou double, le maraviroc étant contre indiqué dans ces deux cas.

### I. CRITÈRES D'ÉVALUATION

#### I.1 Capacité diagnostique

Pour les techniques phénotypiques, l'efficacité de détection du tropisme est évaluée par le pourcentage de concordance des résultats donnés par la technique évaluée avec le tropisme connu des virus testés, ou avec le tropisme déterminé par une autre technique.

Dans les études sélectionnées pour l'analyse d'efficacité sur échantillons de patients, les résultats des tests génotypiques sont comparés à ceux obtenus avec un test phénotypique de tropisme.

Pour les techniques génotypiques, les études retenues ont évalué l'efficacité du test sur la base du couple sensibilité/spécificité : La sensibilité est définie comme la capacité de l'algorithme à classer comme X4 un échantillon contenant des virus capables d'utiliser CXCR4 (tropisme X4, doubleX4R5 ou mixte). La spécificité correspond à la capacité de l'algorithme à classer comme X5 un échantillon contenant uniquement des virus capables d'utiliser CCR5.

#### I.2 Détection des souches minoritaires X4

Ce point est essentiel dans l'analyse d'efficacité des tests de tropisme (voir chapitre IV.3.2 du contexte).

Le seuil de détection nécessaire pour une efficacité satisfaisante du traitement par maraviroc n'est pas défini.

L'étalonnage des différents tests est réalisé *in vitro*. Le test est appliqué sur des échantillons de virus connus, préparés avec des proportions décroissantes de virus X4. Le seuil de détection du test se définit par la dilution à partir de laquelle le test ne détecte plus de souches X4, malgré la présence de ceux-ci.

#### I.3 Taux de non réponses

La complexité de certaines de ces techniques peut conduire à l'absence de réponse indépendamment des variables ci-dessus. En particulier pour les tests phénotypiques, la stabilité des lignées cellulaires, les conditions liées au laboratoire et la rentabilité du processus de production des pseudo-virus peuvent influencer le résultat final. Le taux de non-réponses des différentes techniques a été évalué à partir d'études sur échantillons de patients (afin de s'approcher au mieux des conditions d'utilisation).

##### Réponses en fonction de la charge virale :

Le taux de réponses des différents tests en fonction de la charge virale de l'échantillon étudié dépendra de la qualité de l'amplification par RT-PCR du matériel génétique disponible. Il s'agit d'une étape limitante pour les deux types de techniques (génotypique et phénotypique)

## **II. TECHNIQUES PHÉNOTYPIQUES**

### **II.1 Essai Historique, Test sur cellules MT-2**

Les virus à tropisme X4 ou double X4R5 sont capables d'infecter les cellules MT-2 et de former des syncytia (SI pour syncytia-inducing). Les virus à tropisme R5 sont classés par cette technique comme NSI (pour non-syncytia inducing) donc incapables de produire ces syncytia.

Le principal inconvénient de cette technique est la nécessité de produire une réserve virale à partir de la culture des cellules sanguines mononucléées du patient. Cette extraction nécessite la co-culture des cellules mononucléées du patient avec les cellules d'un donneur non infecté par le VIH, stimulées avec de la phyto-hémagglutinine ou des anticorps anti-CD3 ou anti-CD28 avec ajout d'interleukine-2.

La capacité de cette technique à détecter des souches minoritaires n'a pas été évaluée.

Cette technique est donc longue et peu adaptée à une utilisation dans le cadre de la pratique clinique courante.

### **II.2 Techniques à virus recombinants**

L'autorisation de mise sur le marché des antagonistes des corécepteurs à chimiokines a créé la nécessité du développement de tests de tropisme utilisables en clinique. Plusieurs techniques sont actuellement disponibles ; elles se basent toutes sur les mêmes étapes.

La première étape correspond à une extraction de l'ARN viral des populations plasmatiques de VIH du patient. Cet ARN est ensuite rétro-transcrit en ADNc. Ce patron est amplifié par PCR en utilisant des amorces spécifiques de la zone env. Les amplicons résultants représentent en partie la diversité des séquences env des virus du patient.

Les amplicons sont ensuite insérés dans un vecteur d'expression du gène env. Un deuxième vecteur non répliatif dépourvu de cette même zone env est construit. Ces vecteurs sont transférés dans une lignée cellulaire pour produire des virus recombinants.

Pour la détermination du tropisme, les pseudos virus produits sont mis en culture sur deux lignées cellulaires différentes : ces lignées cellulaires expriment à leur surface le récepteur CD4 et un seul des corécepteurs (soit CXCR4, soit CCR5). Les lignées cellulaires varient selon les techniques. Après un à quatre cycles de réplication virale, les cellules infectées expriment un gène indicateur pré intégré. Son expression est quantifiée par une réaction de bioluminescence ou un signal colorimétrique. Les virus à tropisme R5 infecteront de façon préférentielle les lignées cellulaires présentant le corécepteur CCR5. Les virus à tropisme double ou les patients infectés à la fois par des virus à tropisme CCR5 et CXCR4 présenteront une infection des deux lignées cellulaires. Le tropisme peut-être confirmé par l'application d'un antagoniste spécifique d'un des deux corécepteurs lors de la phase d'infection des lignées.

Les tests de détermination phénotypique par virus recombinants présentent deux inconvénients principaux. Les cultures virales ne peuvent être réalisées que dans le cadre de laboratoires de niveau de confinement 3, ce qui limite la généralisation de ces techniques. Ces techniques complexes ont un cout élevé.

Ces techniques présentent comme première étape limitante la RT-PCR, la qualité de l'amplification déterminera toutes les autres étapes.

Un autre point déterminant est lié à la production de pseudo-virus, qui dépendra à la fois de la stabilité des lignées cellulaire et de la qualité du recueil de ceux-ci.

Il s'agit de techniques complexes pour lesquelles il existe de multiples étapes qui peuvent faire échouer le rendu du résultat final.

Deux tests phénotypiques ont été mis sur le marché : PhénoSense env Essay ou Trofile aux Etats unis (largement utilisé actuellement dans le cadre de l'accès élargi au maraviroc) et VIRCO BVBA en Belgique.

### II.2.1 Trofile™ (Monogram Biosciences) ou Phenosense env Essay

Dans cette partie, il est fait référence à la version initiale du test qui a été utilisée pour les essais d'AMM. Une nouvelle version de ce test a été présentée à différents congrès internationaux sur le VIH qui présente- en principe - des caractéristiques de laboratoire améliorées pour la détection des souches minoritaires. Aucune publication des essais de validations de ce test ne sont disponibles, aussi il ne sera pas abordé dans ce rapport.

Il s'agit d'une technique à simple cycle. Cette technique utilise une région de 2,5 Kb du gène env. Le vecteur est construit par enzymes de restriction. Dans cet essai la lignée cellulaire co-infectée est la lignée HEK293 (*Human Embryonic Kidney*). Le gène de détection exprime une luciférase dont l'activité est déterminée par quantification de la lumière émise.

#### II.2.1.1 Concordance des résultats

Au sein d'une étude (44), ce test a été appliqué à 38 souches virales à tropisme connu (techniques historiques), avec une concordance de 100%.

#### II.2.1.2 Seuil de détection des souches minoritaires

Trofile™ a correctement détecté les souches X4 dans des mixtures X4/R5 jusqu'à un ratio de 1 : 9 (dans 100% des cas). La détection de souches X4 ou double est de 85% pour des mélanges de 5%. La limite de détection des quasi-espèces à tropisme X4 ou double se situe entre 5 % et 10%. (44). Le nombre de copies /ml de souches virales dans ces échantillons n'est pas référencé.

#### II.2.1.3 Taux de non réponses

Un total de 6 études a été identifié pour évaluer cette variable. Les essais Motivate n'ont pas été retenus puisque le taux d'échec n'apparaît pas dans l'article publié (16).

**Tableau 4.** -Essais réalisés avec TROFILE comme test de tropisme

ESSAI	Médicament testé	CV copies/ml	% échecs	Echantillons identifiés
Wilkin 2007 (20)	Vicriviroc	≥5 000	4 (15/406)	391
Hunt 2006 <sup>s</sup> (19)		Mo : 36300 (15 135 – 114 300)	2,5 (29/1158)	1125
Melby 2006 <sup>s</sup> (21)		Me : 100 000	5 (37/761)	724
Moyle 2005 <sup>s</sup> (18)		> 1000	28 (245/861)	563
Brumme 2005 <sup>s</sup> (17)		Mo : 120 000 (13 000–420 000°)	17,8 (212/1191)	979
Suleiman 2007 (15)	Vicriviroc	Mo : 22 300	15	451

§ : Essais épidémiologiques. Mo: Moyenne; Me Mediane; CV Charge Virale

Le taux de non réponse de Trofile™ varie de 2.5% à 28% selon les études ci-dessus.

Le plus grand taux d'échec apparait dans l'étude où la charge virale est la plus basse. Dans cette étude, les CV du groupe de patients dont le tropisme a été déterminé et celles du groupe non diagnostiqué sont significativement différentes (médiane 12 793 copies/ml: de 3 784 à 51 666 copies/ml pour les échantillons non diagnostiqués ; médiane de 39 325 copies/ml; de 11 557 à 129 015 copies/ml pour les échantillons phénotypés;  $P < .001$ ).

Réponses en fonction de la charge virale :

Dans cette même étude, un étalonnage en fonction des charges virales des échantillons a été réalisé.

Cette technique nécessite une charge virale du patient supérieure à 1000 copies par ml (La RT-PCR permet une amplification de 94% des échantillons au dessus de 500 c/ml et de 100% au dessus de 1000c/ml). Entre 100 et 500 c/ml, l'amplification n'est efficace que pour 77 % des échantillons.

II.2.1.4 Problèmes organisationnels

L'application de ce test nécessite un laboratoire à niveau de confinement 3 ce qui constitue un obstacle à la diffusion de la technique.

Il n'est de plus disponible qu'aux Etats-Unis dans un laboratoire de la compagnie californienne qui a contribué à son développement. Les échantillons doivent donc y être envoyés ce qui allonge le temps de réponse (entre une et deux semaines pour le transport et deux semaines pour la réponse).

Le coût de ce test (plusieurs centaines d'euros) est actuellement pris en charge par le fabricant du maraviroc (Pfizer) dans l'attente d'une inscription à la NABM.

En résumé TROFILE présente plusieurs aspects favorables.

- C'est le test de détermination du corécepteur du VIH le plus utilisé dans les essais de développement des molécules anti-CCR5.
- Il semble posséder un seuil de détection des quasi-espèces minoritaires entre 5 et 10%, et fonctionne avec des CV supérieures à 1000 c/ml.
- Son utilisation donne des résultats suffisamment fiables pour permettre l'administration du maraviroc : il a été utilisé pour les essais de validation du médicament.

Il reste pourtant certaines incertitudes quant à son efficacité sur des échantillons de patients :

- lors des essais MOTIVATE, 8% (79 de 1042) des patients R5 à la visite initiale ont présenté un basculement virologique vers des souches doubles ou mixtes lors du contrôle d'inclusion (28). Ce phénomène ne peut s'expliquer uniquement par une pression de sélection du traitement optimisé ;
- comme il a été évoqué dans le chapitre IV.3.1 du contexte, au moins une partie des souches X4 chez les patients en échec thérapeutique est liée à la préexistence de souches X4 non détectées lors du test ;
- l'utilisation de ce test via un seul laboratoire situé hors d'Europe pose des problèmes organisationnels.

## II.2.2 *Phenoscript Env Essay*<sup>TM</sup> (VIRliance)

La séquence du gène *env* est de 900 bp (zone qui correspond aux boucles variables V1 à V3). Les virus recombinants sont produits dans des cellules HEK293-T par recombinaisons homologues. Les cellules infectées pour la détection du tropisme sont des cellules U373MG-CD4. La détection se fait par colorimétrie, selon l'activité de la bêta galactosidase cotransfectée. (45)

### II.2.2.1 Capacité diagnostique:

Seule une étude a été identifiée pour évaluer l'efficacité de ce test (46). Le taux de concordance de Phenoscript et de Trofile, testés sur 79 échantillons de patients est de 81.5%.

### II.2.2.2 Seuil de détection de souches minoritaires X4.

Nous ne disposons pour cette variable d'efficacité que des données extraites des résumés de présentations. Un étalonnage similaire à celui décrit pour TROFILE semble indiquer que la détection est acceptable jusqu'à des niveaux de X4 de 5 à 10%.% (47)

### II.2.2.3 Taux de non réponses

Pour l'essai Skrabal *et al.* (46), Phenoscript a donné un résultat pour 90 des 93 échantillons testés. Le taux de non-réponses est donc de 3,2%. Aucune autre donnée n'est disponible.

#### Réponse en fonction de la charge virale

Nous ne disposons pour cette variable d'efficacité que des données extraites des résumés de présentations faites par l'équipe des développeurs à différents congrès. Pour des échantillons plasmatiques au dessus de 10 000 c/ml le test est efficace dans 100% des cas. Les échantillons entre 10 000 et 1000 copies /ml obtiennent un résultat dans 94% des cas. En dessous de 1 000 c/ml, la réponse du test est limitée par le taux de succès de la PCR de seulement 63% (47).

### II.2.2.4 Problèmes organisationnels :

Le niveau de confinement nécessaire à cette technique est le même que pour TROFILE.

Le laboratoire qui réalise ce test se trouve en France, ce qui présente un avantage par rapport à TROFILE pour les temps de réponse comme pour les problèmes de transport. Néanmoins, ce test n'est actuellement pas commercialisé par la firme détentric.

#### En Résumé, PhenoScript Env Essay :

- se base sur le même principe que TROFILE et offre des résultats de validation globalement semblables ;
- présente un seuil de détection de souches minoritaires apparemment satisfaisant ;
- néanmoins, les informations sur l'utilisation de ce test sur échantillons de patients en situation réelle sont limitées.
- Ce test n'est actuellement pas commercialisé par la firme détentric.

### II.2.3 *Virco tropism platform (Virco BVBA, Belgique)*

Le premier pas est une amplification par RT-PCR des régions variables V1 à V4 de la gp120 (NH2-V4).

Ces amplicons sont utilisés dans cette plateforme soit pour une analyse génotypique par algorithmes, soit pour une détermination phénotypique du corécepteur.

Seule l'analyse phénotypique est décrite dans cette partie.

Les amplicons de cette région sont co-transfectés dans une bactérie avec un vecteur viral dépourvu de cette zone, mais codant pour une protéine fluorescente, eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*). Le plasmide d'ADN résultant est ensuite transfecté dans des cellules 293T. Les virus recombinants infectent deux lignées de cellules U87 différentes n'exprimant qu'un type de corécepteur chacune.

La production de cette protéine est détectée par un microscope à fluorescence. (48)

#### II.2.3.1 Concordance des résultats

Aucune publication satisfaisante n'a été identifiée pour estimer la sensibilité et spécificité de ce test. Dans les études publiées, les résultats obtenus avec ce test phénotypique sont comparés aux résultats obtenus avec leurs propres tests génotypiques.

#### II.2.3.2 Seuil de détection de souches minoritaires X4

Dans les essais de validation, ce test semble capable de détecter des populations minoritaires jusqu'à 10% pour des charges virales supérieures à 100 000 copies par ml (48).

#### II.2.3.3 Taux de non-réponses :

Seule une étude ayant utilisé cette technique sur plasma de patients a été identifiée. Le test a rendu une réponse pour tous les échantillons analysés [61] (49).

#### Réponses en fonction de la charge virale

Toutes les études identifiées ont été réalisées sur des échantillons avec des charges virales > 100 000 copies/ml.

#### En Résumé :

Ce test se base sur les mêmes techniques que celles utilisées par les autres tests à virus recombinants.

Il y a trop peu de données publiées pour pouvoir conclure avec sécurité sur les performances diagnostiques de ce test.

### II.2.4 *Test à virus recombinant du laboratoire de virologie de Toulouse*

Les données dont nous disposons pour ce test proviennent d'une seule étude publiée (50).

#### II.2.4.1 Capacité diagnostique :

Ce test n'a été comparé qu'avec les tests génotypiques.

#### II.2.4.2 Seuil de détection des souches minoritaires

Ce seuil pour ce test serait compris entre 5 et 10% pour ce test

#### II.2.4.3 Taux de non réponses

Dans l'étude citée, ce test n'a pas rendu de résultat que pour 2 échantillons de 102 (1,9 %).



Réponse en fonction de la charge virale

Non référencé

**III. TECHNIQUES GÉNOTYPIQUES**

Les techniques génotypiques se basent sur le même principe des tests génotypiques de résistance : à partir de la séquence de l'ARN viral plasmatique, des algorithmes permettent de prédire le phénotype du virus.

**III.1 Base physiologique – structure gp120**

La glycoprotéine de surface gp120 est composée d'environ 480 acides aminés organisés en deux groupements différents:

- Cinq régions constantes présentent des séquences conservées parmi les différentes souches virales (C1-C5).
- Cinq boucles (V1-V5) hypervariables qui diffèrent d'un isolat viral à l'autre (51).

Les principaux déterminants du tropisme du VIH se situent dans la région hypervariable V3 de la protéine d'enveloppe gp120 (52).

Cependant, plusieurs auteurs ont mis en évidence que des mutations même ponctuelles d'autres zones de cette glycoprotéine de surface peuvent être à l'origine d'une modification du tropisme (voir tableau 5).

**Tableau 5.** Domaines de la protéine *env* associés avec l'utilisation des corécepteurs. D'après Weber et al. (53)

Domaines	Propriétés
V3	le phénotype X4 est lié à la présence d'acides aminés chargé positivement (en particulier) en position 11 et 25 le phénotype R5 se caractérise par l'absence de charges positives (charges négatives ou neutres)
V2	Charge nette supérieure chez les variants X4,
V1	Une substitution ponctuelle (S141N) peut induire une modification du tropisme cellulaire,
C1-V4	Des mutations au sein de cette zone peuvent faire varier le tropisme

**III.2 Principe Technique**

Comme pour les tests phénotypiques, la première étape, après l'extraction du matériel génétique, est une amplification par RT-PCR du génome viral extrait de l'échantillon du patient. Cette étape est suivie du séquençage de la zone codant pour la boucle V3 de la gp120.

Plusieurs algorithmes prédictifs peuvent ensuite être appliqués. Ils sont produits à partir de bases de données de séquences analysées provenant de virus de tropisme connu. Plusieurs algorithmes sont disponibles en ligne sur des sites Internet collaboratifs d'accès libre.

**III.3 Algorithmes disponibles**

**Algorithmes complexes :** Ils sont produits à partir de bases de données de séquences analysées provenant de virus de tropisme connu. Plusieurs algorithmes sont disponibles en ligne sur des sites Internet collaboratifs d'accès libre.

**Algorithmes simples :** ils se basent sur la présence d'acides aminés à des zones précises de la boucle V3 (11/25 par exemple) ainsi que sur la charge nette des

acides aminés de la boucle pour déterminer la probabilité d'utilisation du corécepteur. Ces algorithmes simples ne dépendent pas de l'exploitation des bases de données.

### III.3.1 PSSM

Les matrices de scores avec positions spécifiques (Position specific scoring matrices) se basent sur l'assignation d'un score à la séquence analysée qui décrit sa probabilité de présenter un tropisme ou un autre. L'application à la boucle V3 permet de différencier trois types de phénotypes : R5 qui présente un score bas, X4 un score haut et R5X4 pour les scores intermédiaires. Certains algorithmes PSSM déterminent la probabilité d'induire un syncytium ou non par le virus dont la séquence *env* est analysée (SI/NSI).

Cette méthode de classification est en accès libre sur internet :

- <http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/pssm/>

### III.3.2 SVM

Les machines à vecteurs de support (SVM) sont des algorithmes d'apprentissage statistique pour la classification supervisée en différentes classes des séquences biologiques par exemple. Un élément important des SVM est l'utilisation d'une fonction, appelée noyau, pour mesurer la similarité entre n'importe quelle paire d'éléments à classer, des séquences dans notre cas. En utilisant différents noyaux, on peut obtenir une grande variété de SVM avec des performances différentes sur un problème de classification donné.

Les techniques *geno2pheno* et *wetcat* se basent sur cette technique. Ils sont disponibles gratuitement à partir de sites collaboratifs d'accès en ligne :

- <http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>
- <http://genomiac2.ucsd.edu:8080/wetcat/tropism.html>

### III.3.3 SVM avec noyau à segments distants :

Dans l'essai Boisvert (53), l'utilisation de l'algorithme SVM se fait avec un noyau statistique nouveau (noyau à segments distants) qui permet une analyse non linéaire des séquences.

### III.3.4 Réseaux de neurones artificiels

Ce sont des modèles et algorithmes adaptatifs pour l'analyse de données, la classification, l'approximation de fonctions.

### III.3.5 Arbres décisionnels

Il s'agit d'une technique d'apprentissage supervisée qui combine une technique d'agrégation et une technique particulière d'induction d'arbres de décision.

### III.3.6 Descripteurs structurels :

V3SD est un algorithme qui se base sur la distribution tridimensionnelle de 5 acides aminés de la boucle V3 pour établir une probabilité d'utilisation de corécepteur.

### III.3.7 Méthode dite 11/25

Cette technique plus simple détermine que les virus porteurs d'acides aminés chargés positivement (Lysine ou Arginine) en position 11 et 25 de la boucle V3 de la gp120 sont associés aux VIH à tropisme X4

### *III.3.8 Charge électrostatique nette*

La charge des acides aminés de la boucle V3 est différente selon le corécepteur d'entrée du VIH utilisé. Cette méthode détermine le tropisme viral à partir de la charge estimée de la séquence de la boucle V3.

## **III.4 Analyse d'efficacité.**

### *III.4.1 Articles sélectionnés*

Un total de 18 articles évaluant les performances diagnostiques des tests génotypiques a été retenu. Un des articles a été écarté puisqu'il comparait le taux de concordance de deux algorithmes génotypiques sans utiliser de test diagnostique de contrôle (40).

De ces 17 articles, 8 essais ont utilisé différents algorithmes diagnostics sur des séquences de la boucle V3 de souches virales de VIH à tropisme connu. Deux essais ont extrait directement leurs séquences V3 à partir d'échantillons plasmatiques de patients. Néanmoins les analyses n'ont pas porté sur échantillon entier comme en pratique clinique. Certaines séquences extraites ont été exclues de l'analyse (notamment les séquences avec trop d'amplicons différents). Le corécepteur de ces séquences a été déterminé par un test phénotypique. Les résultats de tropisme sont donnés pour chaque séquence clonale et non par échantillon.

Les résultats de ces 10 articles sont présentés dans le tableau 6. Les études sur séquences d'isolats clonaux doivent être considérées comme des essais d'étalonnage des algorithmes diagnostiques. Leurs résultats seront présentés séparément, puisqu'ils apportent un niveau d'évidence inférieur quant à l'efficacité de ces algorithmes en pratique clinique

Seuls 7 essais ont réalisé les déterminations de tropisme par génotypage direct de plasma de patients infectés.

Ces études ont été sélectionnées pour l'analyse d'efficacité des techniques de tropisme génotypiques sur échantillons de patients. Ces études comparent les résultats obtenus avec différents algorithmes sur des échantillons de patients infectés par le VIH. Les essais utilisent comme test de référence un test phénotypique.

Il n'est pas possible de combiner les résultats de ces différentes études étant donné l'hétérogénéité de leurs protocoles : les caractéristiques des patients (les charges virales varient 50 à 100 000 copies /ml), la technique de contrôle sélectionnée (pour les neuf essais il y a 4 tests de référence différents), le type d'extraction des échantillons (8 essais ont réalisé une amplification de l'ARN plasmatique, alors qu'une amplifie également l'ADN pro-viral des cellules mononucléées), le nombre d'échantillons testés varie de 34 à 952 selon les études.

### *III.4.2 Résultats obtenus sur séquences isolées des gènes env.*

Le tableau 6 synthétise les résultats de ces 10 essais réalisés sur séquences isolées de la boucle V3.

La plupart des séquences sont tirées de la banque de données de Los Alamos, de l'institut National de la Santé des Etats-Unis d'Amérique.

Les algorithmes appliqués présentent une bonne capacité discriminative sur les séquences isolées de matériel génétique de VIH. L'algorithme 11/25, le plus simple, présente en fonction des séries une sensibilité pour la détection des variants X4 allant jusqu'à 94% avec une spécificité supérieure à 90% pour tous les essais, sauf celui de Sing et al.

Les valeurs prédictives positives disponibles de l'algorithme 11/25 (probabilité que l'échantillon présente effectivement des souches à tropisme X4 ou R5X4 si le résultat du test génotypique est X4) varient de 43% (54) à 83% (55). La combinaison de l'algorithme basé sur la charge avec l'algorithme 11/25 permet d'obtenir une VPP de 100% dans une étude (55).

L'utilisation d'un nouveau noyau d'analyses pour l'application de l'algorithme SVM semble permettre un gain conséquent de sensibilité : pour les trois études avec SVMwetcat, la sensibilité varie de 22 à 76 % ; l'analyse des résultats avec le noyau Kernel aboutit à une sensibilité de 94%. Ces résultats devraient être évalués sur des échantillons de patients.

**Tableau 6.** Résumé des couples sensibilité / Spécificité des algorithmes utilisés sur séquences isolées de la boucle V3 ; Entre parenthèses les VPP.

ESSAI (Auteur Année)	Briggs 2000 (56)	Resch 2001 (54)	Jensen 2003 (57)	Sing 2007 (58)	Xu 2007 (59)	Boisvert 2008 (53)	Sander 2007 (60)	Low 2007 (61)	Mefford 2008* (62)	Delobel 2007* (55,62)
Origine séquences	Los Alamos	Différentes Bases	NR	Los Alamos	Los Alamos	Los Alamos	Différentes Bases	GenBank	6 patients	26 patients
N séquences	24	216	257	1100	1073	1425	514	920	30	112
<b>TESTS</b>										
11/25		53/91 (43)	90/96	92/60			61/94 (76)	30/93		94/93 (83)
11/25 Modifié			76/98					44/88	43 <sup>\$</sup>	
11/25 + Charge										94/100 (100)
Charge									83 <sup>\$</sup>	100/93 (84)
SVM Wetcat				(63)76/60			73/94 (80)	22/90	63 <sup>\$</sup>	
SVM Geno2Pheno								45/91	90 <sup>\$</sup>	
SVM Kernel						94/95				
PSSM <sub>X4R5</sub>				72/60	70/95 (93)			34/95	33 <sup>\$</sup>	
PSSM <sub>SI</sub>			84/96					24/97	73 <sup>\$</sup>	
Neural Network		75/94 (68)								
Briggs	91 <sup>\$</sup>									
Random Forest					85/98 (99)				53 <sup>\$</sup>	
V3SDcbeta							69/94 (79)			
V3SD <sub>SCWRL</sub>							77/94 (81)			
V3SD <sub>SCWRL</sub> + indicateur							80/94 (81)			

\*: Les séquences V3 ont été extraites directement de souches de patients, Le tropisme été déterminé par un test phénotypique (de gauche à droite : un test basé sur l'induction de syncytium, TRT,) ; \$ : % de concordance global du test ; NR : Non référencé. Los Alamos: banque de données de séquences de VIH du *National Institute of Health*, Etats-Unis d'Amérique;

### III.4.3 Capacité diagnostique :

Seule l'analyse des résultats sur échantillons plasmatiques permet une approximation au plus juste des performances diagnostiques en pratique clinique

**Tableau 7.** résumé des performances diagnostiques (couple sensibilité / spécificité) des techniques génotypiques sur échantillons de patients.

ESSAI (Auteur Année)	Poveda 2007 (64)	Garrido 2008 (63)	De Mendoza 2008 (49)	Saracino 2007 (65)	Saracino 2007 (65)	Sing 2007 (66)	Skrabal 2006 (46)	Raymond 2008 (50)	Poveda 2009 (67)	Poveda 2009 (67)
Contrôle	Phenoscript	Phenoscript	VIRCO BVBA	MT2	MT2	TROFILE	TROFILE	T.Pheno Propre	TROFILE	TROFILE
CV (copies /ml)	Me 20 000 (de 1 000 à 50 000)	Me 25 000	Mo 26 000	>50	>50	NR	NR	Me : 18 000 (de 4000 à 1000 000)	> 1000	Me : 15800 (de 11000 à 45700)
N échantillons	83	150	61	34 plasma	34 PBMC	952	74	103	202	118
<b>TESTS</b>										
11/25				17/75	50/78	26/94		<b>65/94</b>	75	
11/25 + Charge								<b>77/96</b>		
SVM + Données cliniques						<b>63/94</b>				
SVM Wetcat	70,5	69/83	<b>70/92</b>			40/94			68	
Geno2Pheno	71	74/77	70/72	50/63	83/61		86,5	<b>88/87</b>	76/58	
PSSM <sub>X4R5</sub>	85	69/89	10/96					<b>69/97</b>	59/89	
PSSM <sub>SINSI</sub>		62,5/91,2	30/100	17/75	50/82			<b>77/94</b>	61/87	
PSSM <sub>X4R5-8</sub>										<b>93/69</b>
PSSM <sub>SINSI-6.4</sub>										<b>93/71</b>
Charge		<b>47/92</b>	10/96							

CV : charge virale, l'écart interquartile est présenté entre parenthèses ; Contrôle : Test utilisé comme référence; T.Pheno Propre : Test Phénotypique de conception propre; NR : non référencé; Mo : moyenne; Me : Médiane. PBMC : cellule sanguine mononuclée ; Les résultats présentés seuls correspondent au % de concordance avec le test de référence ; Les résultats en gras correspondent au meilleur couple sensibilité/spécificité pour chaque algorithme

On observe une grande variabilité des performances diagnostiques en fonction de l'essai : La sensibilité diagnostique varie de 10% à 93%. La spécificité varie de 61 % à 94%

Les résultats obtenus avec un même algorithme sont très différents d'une étude à l'autre.

Geno2pheno semble être l'algorithme dont les performances sont les plus stables indépendamment du comparateur. La sensibilité varie de 70 % à 88% (sauf pour un essai où la sensibilité est de 50%). pour une spécificité entre 58 % et 87%

L'équipe de Garrido *et al.* (63). a réalisé une sous analyse en fonction du sous-type des souches de VIH-1 des patients. Tous les algorithmes ont présenté une

sensibilité clairement inférieure pour les VIH de sous-type non-B par rapport à ceux des sous-types B (passant de 100 à 46 pour SVM wetcat). La spécificité étant relativement similaire pour les deux sous-types. Cette perte de sensibilité correspondrait à une surestimation des souches de VIH à tropisme X4.

Dans l'étude de Saracino *et al.*(65), 34 échantillons de patients infectés par le VIH-1 ont été analysés selon deux méthodes : l'extraction l'ADN proviral et de l'ARN a été faite à partir du plasma et des PBMC. Les souches inductrices de syncytia ont été significativement mieux détectées par les différents algorithmes à partir des séquences virales des PBMC ( $p < 0,05$ ) que celles du plasma.

Une étude récente d'une équipe INSERM (50) a comparé les déterminations de tropisme obtenues à partir des techniques génotypiques avec celles d'un test phénotypique. L'essai de référence est un essai phénotypique de conception propre, capable de détecter des populations minoritaires X4 présentes entre 5% et 10 %. Les 103 échantillons évalués proviennent de patients en échec virologique avec une charge virale d'au moins 400 copies / ml.

Dans cette étude, les valeurs prédictives des différents algorithmes (sauf Geno2pheno) sont supérieures à 80%. En particulier la combinaison des algorithmes 11/25 et de la méthode des charges, offre une valeur prédictive positive de 87% et négative de 92%. Il reste pourtant une variance importante des résultats. Pour l'algorithme le plus performant (la combinaison 11/25 et charge) l'intervalle de confiance de la valeur prédictive positive est compris entre 66 et 97%.

L'essai de l'équipe Poveda (67) a été réalisé sur 202 échantillons de patients inclus dans le programme d'accès élargi au maraviroc ; le tropisme a été déterminé à la fois par le test Trofile<sup>TM</sup> et par des techniques génotypiques en utilisant différents algorithmes.

La concordance avec le test phénotypique a varié de 66% pour l'algorithme geno2pheno (utilisé avec un taux de faux positifs prédéfini de 20%) à 80% pour PSSM<sub>X4/R5</sub>.

Les performances diagnostiques des tests génotypiques sont globalement inférieures (avec Trofile<sup>TM</sup> comme test de référence) à celles observées par l'équipe de Raymond (qui utilise un autre test phénotypique à virus recombinant) : par exemple pour PSSMX4/R5 le couple sensibilité / spécificité est de 59 % / 89 % et 61% / 87 % pour PSSMSI/NSI.

Poveda *et al.* ont publié dans le même article un essai d'amélioration des performances diagnostiques des algorithmes PSSMSINISI et PSSMX4R5 avec comme comparateur TROFILE<sup>TM</sup>. Pour cela les seuils de catégorisation des algorithmes PSSM (voir chapitre III.3.1) ont été modifiés à partir d'un étalonnage basé sur courbes ROC (*Receiver Operating Characteristics*) ; les algorithmes avec les nouveaux seuils sont PSSMSINISI-6.4 et PSSMX4R5-8.

Trofile<sup>TM</sup> et les techniques avec les nouveaux seuils de catégorisation ont été appliqués sur 118 échantillons plasmatiques de patients infectés par le VIH et sous traitement antirétroviral. La concordance entre Trofile et PSSMSINISI-6.4 et PSSMX4R5-8 est très similaire à celle d'autres études pour les versions initiales de PSSM : 76 et 75 % respectivement. Les couples sensibilité / spécificité ont été pour PSSMSINISI-6.4 de 93% / 71% et pour PSSMX4R5-8 de 93% / 69 %. La probabilité d'administrer le maraviroc à un patient faussement diagnostiqué comme R5 est donc faible ; néanmoins près de 30 % d'échantillons de patients infectés par des virus VIH-1 à tropisme R5 exclusifs sont classés comme X4 ou double/mixte et ne recevraient pas de traitement par inhibiteur du CCR5.

#### III.4.4 Détection des souches X4 minoritaires.

Il y a extrêmement peu de données publiées concernant les techniques génotypiques.

Une seule étude (55) a réalisé un étalonnage des résultats obtenus avec des algorithmes informatiques en fonction du pourcentage de populations minoritaires X4 et R5X4. Le seuil de détection se situe selon cette étude aux alentours de 20%.

Cette technique s'approchant des tests génotypiques de résistances, le rapport d'experts sur le traitement du patient infecté par le VIH, apporte une approximation : « *Après une expérience ample de ces procédés de tests de résistance, on estime que les méthodes de séquençage ne permettent pas la détection de sous-populations minoritaires au-dessous d'un seuil correspondant à 20 p. 100 de la population globale. Différentes méthodes ont été décrites pour la détection des variants résistants minoritaires : PCR spécifique d'allèle, séquençage à une copie (single genome sequencing), séquençage ultrasensible (ultradeep sequencing) ; ces méthodes permettent d'atteindre une sensibilité de 0,1 à 1 p. 100 pour la détection des variants minoritaires. Leur coût fait que ces techniques sont réservées à des cas particuliers uniquement.* » (43)

#### III.4.5 Taux de non réponses

Le taux de non réponses (mauvaise extraction, amplification défectueuse) oscille entre 3,2% pour une étude sur 79 échantillons (46) et 0% pour les autres.

##### Réponses en fonction de la charge virale :

Nous n'avons pas identifié de littérature concernant ce point précis de l'évaluation des tests génotypiques.

#### III.4.6 Problèmes organisationnels

Le niveau de confinement nécessaire est plus faible : les laboratoires de virologie réalisant déjà les tests génotypiques de résistance peuvent prendre en charge cette technique. Une quarantaine de laboratoires en France réalisent ces tests de résistance ; ils sont majoritairement publics mais quelques laboratoires privés réalisent également ces tests.

L'accès libre à plusieurs de ces algorithmes garantit une diffusion de la technique rapide.

À l'instar des algorithmes d'interprétation des tests génotypiques de résistance, les algorithmes de détermination du tropisme peuvent être réévalués et adaptés.

En Résumé, Tests de tropisme génotypiques :

Les résultats des algorithmes présentent une concordance de plus de 80% avec des tests phénotypiques chez des patients avec de charges virales relativement élevées. (>400 c/ml).

La détection des souches minoritaires avec ces tests reste l'inconnue principale, et l'efficacité thérapeutique du maraviroc semble en dépendre. De même, la qualité de la détection pour des charges virales inférieures à 1000 copies/ml reste à établir.

Les tests génotypiques présentent plusieurs avantages par rapport aux tests phénotypiques :

- simplicité technique. Ce test, après extraction du matériel viral, implique la réalisation d'une RT-PCR pour analyse informatisée des amplicons. Dans les laboratoires de virologie déjà en charge des tests génotypiques de résistance, il pourra être couplé avec la réalisation du test de résistance, sur le même prélèvement. Le niveau de confinement nécessaire pour cette technique est bas ;
- un coût en principe plus faible, la technique étant plus simple que celle des tests phénotypiques.



#### **IV. RECOMMANDATIONS IDENTIFIÉES POUR LA DETERMINATION DU TROPISME**

Une recherche manuelle des différentes recommandations nationales pour la prise en charge des patients infectés par le VIH a été faite. Deux guides de traitement précisant la place des tests de tropisme ont été identifiés, le guide édité par le ministère de la santé des Etats Unis et celui de la France.

(42,43)

Les deux guides thérapeutiques recommandent la réalisation d'un test avant tout traitement par inhibiteur des CCR5. Ces deux rapports indiquent que la réalisation d'un test de tropisme en cas d'échec thérapeutique avec cette classe d'antirétroviraux pourrait être recommandable ; même s'ils insistent sur le manque de données concluantes sur les résistances aux inhibiteurs des CCR5.

Le guide étatsunien recommande le test Trofile™ pour la détermination du tropisme, en indiquant que les tests génotypiques doivent être considérés en phase de recherche. Les recommandations françaises sont plus nuancées et précisent que la détermination par tests génotypiques pourrait être valide.

#### **V. TEST DE TROPISME – ECHEC THÉRAPEUTIQUE**

Il n'existe pas de données formelles dans la littérature disponible pour établir une stratégie sur les résistances au maraviroc. Néanmoins l'émergence de souches X4 s'est associée à l'échec de traitement dans les essais d'AMM. Deux guides nationaux de prise en charge des patients infectés par le VIH (un français et l'autre des états unis d'Amérique (42,43)) considèrent cohérente la réalisation d'un test de tropisme en cas d'échec thérapeutique.

## CONCLUSIONS

---

### I. INDICATIONS

#### *I.1.1 Préalable au traitement par inhibiteur du récepteur CCR5*

La détermination du tropisme viral est nécessaire en préalable au traitement inhibiteur du CCR5, ce traitement n'étant pas efficace pour les patients infectés par des virus à tropisme autre que R5.

#### *I.1.2 Situation d'échec thérapeutique.*

D'après avis d'experts la réalisation d'un test de tropisme est indiquée en cas d'échec thérapeutique sous traitement par inhibiteur du CCR5 pour guider le clinicien.

### II. CONTRÔLE QUALITÉ

Les experts consultés en groupe de travail s'accordent sur l'importance de la réalisation d'un contrôle de qualité national et coordonné, quelle que soit la technique utilisée. L'AFSSAPS et l'ANRS (action coordonnée 11) travaillent actuellement à la mise en place de celui-ci.

### III. TESTS PHÉNOTYPIQUES

#### III.1 Tests Phénotypiques historiques

Il n'existe que peu de données d'efficacité sur ce test. En se basant sur l'avis d'experts, l'utilisation de cette technique en pratique courante est limitée par ses contraintes techniques.

#### III.2 Tests Phénotypiques à virus recombinants

##### *III.2.1 Performances*

TROFILE TM a démontré être suffisamment fiable pour administrer le Maraviroc. Cependant, les patients classés comme R5 par TROFILE TM qui se sont révélés en fait X4 dans les essais MOTIVATE montrent l'imprécision de ce test.

Les autres tests à virus recombinants avec des caractéristiques de laboratoire similaires à celles affichées par TROFILE TM (fonctionnant avec des charges virales supérieures 1000 c/ml, avec un seuil de détection de X4 minoritaires en laboratoire de 5 à 10%) pourront être utilisés pour administrer le maraviroc à une condition : la réalisation contrôle qualité coordonné.

##### *III.2.2 Aspects organisationnels*

La diffusion de ces techniques est limitée par les contraintes techniques. Il est nécessaire pour la réalisation de ces tests d'utiliser un laboratoire avec un confinement de niveau 3.

Le test commercial le plus amplement accessible n'est disponible que dans un laboratoire aux EUA. Aucune donnée sur le contrôle qualité de celui-ci n'a été identifiée. Un seul laboratoire de virologie hospitalier est en mesure de fournir un test phénotypique à virus recombinants en France ; en effet une formation spécifique du personnel de laboratoire ainsi qu'un investissement lourd sont nécessaires à la mise en place de ces tests.

Le délai moyen de rendu des résultats est d'environ 3 semaines pour Trofile™. Aucune donnée pour les autres tests à virus recombinants n'est disponible, mais ce délai devrait être similaire d'après les experts consultés.

## IV. TESTS GÉNOTYPIQUES

### IV.1.1 Performances

Il n'existe pas de réponse tranchée sur l'efficacité diagnostique clinique des tests de tropisme génotypiques. Leur concordance diagnostique en laboratoire semble acceptable (environ 90%) avec les tests phénotypiques. Une étude récente avec une actualisation de l'algorithme PSSM a permis d'atteindre une sensibilité de 93% avec une spécificité de 71%. Néanmoins plusieurs inconnues persistent :

Contrairement aux tests phénotypiques de tropisme, les réponses en fonction des CV et en particulier pour des CV faibles n'ont pas été évaluées. De même, le seuil de détection des souches minoritaires reste à déterminer. Ce seuil pourrait être similaire à celui des tests de résistance : 20%.

Les incertitudes actuelles quand à la fiabilité des tests génotypiques peuvent occasionner une perte de chance pour le patient : d'une part, l'administration à tort du traitement à un patient infecté par des souches virales à tropisme X4 ou mixte /double, donc d'un traitement non efficace pour ce patient (retardant l'administration d'un traitement efficace) et d'autre part, cette administration à tort peut favoriser l'émergence de résistances aux autres antirétroviraux de la trithérapie.

L'étude ANRS « GenoTropism », en cours, apportera données sur l'utilisation de ces tests en pratique clinique (une synthèse du protocole est disponible en Annexe IV du rapport).

Il s'agit d'une étude multicentrique (19 centres) sur 300 prélèvements de patients infectés par le VIH-1. La détermination phénotypique du tropisme VIH-1 par le test Trofile™ sera comparée à l'analyse génotypique par 4 algorithmes de prédiction seuls ou en combinaison. La corrélation entre la prédiction du tropisme par le test phénotypique et par les algorithmes génotypiques sera étudiée.

Les relations entre la prédiction génotypique du tropisme et la réponse virologique et immunologique au maraviroc seront également analysées (objectif secondaire).

### IV.1.2 Aspects organisationnels

Le niveau de confinement nécessaire pour la réalisation de ces tests est celui d'un laboratoire L2. Pour la France, l'option qui semble généralisable le plus rapidement est celle de l'utilisation des tests génotypiques de tropisme étant donné que tous les laboratoires qui réalisent les tests de résistance sont en mesure de l'appliquer. L'élargissement potentiel des indications du maraviroc pourrait générer un surcroît des demandes de déterminations.

À l'instar des algorithmes d'interprétation des tests génotypiques de résistance, les algorithmes de détermination du tropisme peuvent être réévalués et adaptés.

---

## ANNEXES

---

### I. MÉTHODE GÉNÉRALE D'ÉLABORATION D'UN RAPPORT D'ÉVALUATION D'UNE TECHNOLOGIE DE SANTÉ

L'évaluation des technologies de santé est, selon l'*Institute of Medicine* (1985) « une démarche dont l'objet est d'examiner les conséquences à court et à long terme, de l'usage d'une technologie particulière sur les individus et sur la société dans son ensemble. Elle prend en compte la sécurité, l'efficacité expérimentale et pragmatique d'une technologie, ainsi que son impact économique (coût, rapport coûts/résultats et implications budgétaires) ; elle analyse également ses implications sociales et éthiques et met à jour les points à approfondir en terme de direction de recherche ». L'objectif est d'éclairer la décision publique par un avis argumenté prenant en compte les différentes dimensions du sujet.

#### **Analyse critique des données identifiées de la littérature scientifique**

Une recherche documentaire méthodique est effectuée d'abord par interrogation systématique des bases de données bibliographiques médicales et scientifiques sur une période adaptée à chaque thème. En fonction du thème traité, des bases de données spécifiques peuvent être consultées. Une étape commune à toutes les études consiste à rechercher systématiquement les recommandations pour la pratique clinique, conférences de consensus, revues systématiques, méta-analyses et autres travaux d'évaluation déjà publiés au plan national et international. Tous les sites Internet utiles (agences gouvernementales, organisations professionnelles, ...) sont consultés. Les documents non accessibles par les circuits conventionnels de diffusion de l'information (littérature grise) sont recherchés par tous les moyens disponibles. Par ailleurs, les textes législatifs et réglementaires pouvant avoir un rapport avec le thème sont consultés. Les recherches initiales sont mises à jour jusqu'au terme du projet. L'examen des références citées dans les articles analysés permet de sélectionner des articles non identifiés lors de l'interrogation des différentes sources d'information. Enfin, les membres des groupes de travail et de lecture peuvent transmettre des articles de leur propre fonds bibliographique. Le paragraphe « Recherche documentaire » présente le détail des sources consultées ainsi que la stratégie de recherche propres à ce rapport d'évaluation.

#### **La position argumentée de professionnels de santé**

Les organisations professionnelles sont consultées pour connaître les travaux réalisés sur le sujet et pour proposer une liste d'experts de la technique à évaluer, des autres options thérapeutiques ou de la pathologie étudiée. Le groupe de travail est composé d'une dizaine de professionnels de différentes spécialités, de différents modes d'exercice (public et libéral, universitaire et non-universitaire) et de différentes localisations géographiques. Chaque membre du groupe de travail a rempli une déclaration publique d'intérêts qui a été examinée par la HAS. En cas d'intérêts déclarés, la HAS a estimé qu'ils étaient compatibles avec participation des personnes concernées, au groupe de travail, eu égard à leur expertise par rapport au sujet. La déclaration publique d'intérêts de chacun des membres est mise en ligne sur le site internet de la HAS ; le cas échéant, les intérêts déclarés pouvant avoir un lien avec le sujet évalué, sont présentés dans le rapport. Le groupe de travail se réunit en général une fois. Un rapport présentant la problématique, le champ, la méthode et l'analyse critique de la littérature est envoyé aux membres du groupe de travail avec un questionnaire pour recueillir leur position de manière formalisée et standardisée avant la réunion. Lors de la réunion, les membres du groupe de travail discutent sur la base de leur expertise et de l'analyse de la

littérature des différents critères permettant d'estimer la validité de la technique (ratio efficacité/sécurité, indications, place dans la stratégie de prise en charge, conditions de réalisation, ...) et aboutissent, le cas échéant, à un consensus. La réunion est menée d'une manière structurée en s'appuyant sur une liste de questions. Le compte rendu de la réunion (discussion et position finale) est rédigé par la HAS et envoyé aux membres du groupe de travail pour validation.

Au vu de l'analyse critique de la littérature identifiée et de la position argumenté des professionnels de santé du groupe de travail, le Collège de la HAS, après examen et validation du dossier par la Commission évaluation des actes professionnels (CEAP) conclut quant à la validité de la technologie de santé étudiée en précisant selon les cas, ses indications, sa place dans la stratégie de prise en charge des patients, les conditions de sa bonne réalisation, les conséquences de son introduction dans le système de soins. La composition du Collège de la HAS et de la CEAP sont présents sur le site internet de la HAS.

## **II. CRITÈRES D'ÉCHEC THÉRAPEUTIQUE DANS LES ÉTUDES MOTIVATE**

L'échec thérapeutique sous maraviroc dans ces essais est défini par au moins un des critères suivants:

- augmentation de la CV  $\geq 3$  fois la CV basale, après 2 semaines de traitement ;
- diminution inférieure à 0,5 log de la CV après 8 semaines ;
- diminution inférieure à 1 log de la CV après 8 semaines, après une diminution de la CV d'au moins 2 log ;
- augmentation de la CV jusqu'à 5000 copies /ml ou plus, quand dans au moins deux prélèvements, des niveaux inférieurs ou égaux à 400 copies / ml avaient été détectés.

## **III. COMPTE-RENDU DU GROUPE DE TRAVAIL**

Ce document correspond à la synthèse des points évoqués au cours du groupe de travail qui a eu lieu le 09 Mars 2009, au siège de la Haute Autorité de Santé.

Un certain nombre de professionnels invités à participer à cette réflexion ont considéré ne pas avoir l'expertise suffisante pour intégrer le groupe de travail ; ce qui a induit la constitution d'un groupe restreint.

D'autre part, il a été demandé aux experts de se prononcer sur une série de propositions qui reprennent les points essentiels du rapport élaboré à partir de l'analyse de la littérature disponible.

Le dernier point de ce compte rendu correspond à une synthèse des positions du groupe d'experts sur l'efficacité des différentes techniques ainsi que sur les aspects organisationnels de leur mise en place.

### **III.1 Composition du groupe de travail**

- Pr. Patrice MASSIP, Service des maladies infectieuses et Tropicales, Hôpital Purpan, Toulouse
- Pr François SIMON, Service de microbiologie, CHU Saint- Louis, Paris
- Pr Jacques IZOPET Laboratoire de Virologie, Hôpital Purpan, Toulouse
- Pr Patrice MORAND, laboratoire de virologie, CHU, Grenoble
- Dr Anne BOURGARIT, Service de Médecine Interne, CHU Saint Louis, Paris
- Dr Jade GHOSN, Service de Médecine Interne, Hôpital Bicêtre, Paris

- Pr Brigitte AUTRAN Laboratoire d'Immunologie cellulaire et tissulaire, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, est intervenue en particulier pour la partie IV.

Le Dr Fernando ARENZANA-SEISDEDOS, de l'unité de pathogénie virale - Institut Pasteur Paris, qui était invité s'est excusé.

### III.2 Contexte

Le maraviroc est une petite molécule, antagoniste sélectif et réversible du récepteur à chimiokines CCR5. Celsentri® est le premier médicament de la classe des antagonistes du récepteur CCR5 à obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). Cette AMM a été obtenue par procédure centralisée de l'Agence européenne du médicament le 18 septembre 2007. Le maraviroc en association avec d'autres médicaments antirétroviraux, est indiqué dans le traitement de l'infection par le VIH-1 à tropisme détecté uniquement CCR5 chez l'adulte prétraité par des antirétroviraux.

Cette indication est basée sur les données de tolérance et d'efficacité de deux essais en double aveugle contrôlés contre placebo chez des patients prétraités par des antirétroviraux.

Avant le traitement par maraviroc, il est nécessaire de confirmer que seul le virus VIH-1 à tropisme CCR5 est détecté (c'est à dire qu'aucun virus à tropisme CXCR4 ou à tropisme double/mixte n'est détecté) sur un échantillon sanguin récemment prélevé. Il n'existe pas actuellement de test de référence pour la détermination de l'utilisation des récepteurs à chimiokines par le VIH-1.

### III.3 Population cible

#### Proposition :

Les indications, la prévalence de virus X4 dans la population prétraitée, l'existence d'alternatives thérapeutiques limitent la population cible du maraviroc.

#### Position du groupe :

Le groupe de travail considère dans son ensemble que la population cible du maraviroc dans l'état actuel de ses indications est effectivement limitée. Plusieurs essais cliniques sont en cours avec maraviroc. Ils démontreront peut être l'utilité du médicament pour des stades plus précoces de la maladie, ce qui permettrait d'en faire bénéficier plus de patients. En effet, la proportion de patients non traités présentant des souches X4 est d'environ 20 %. Chez les patients prétraités et en échec thérapeutique (comme il est indiqué actuellement) ce même taux est compris entre 40 et 50%.

Il serait plus utile de pouvoir administrer ce médicament en troisième ou quatrième ligne de traitement et non plus chez des patients aux options limitées comme c'est le cas aujourd'hui.

Il faut souligner la capacité du maraviroc à passer facilement la barrière hémato encéphalique (ainsi que les autres barrières physiologiques), contrairement à d'autres antirétroviraux, ce qui peut en faire une option potentiellement utile dans les affections neurologiques liées à l'infection par VIH.

### III.4 Evaluation de l'efficacité des techniques phénotypiques et génotypiques

#### III.4.1 Critères d'évaluation (détection des souches minoritaires)

##### Proposition :

La détection des souches minoritaires X4 est un critère essentiel d'évaluation des tests de tropisme (l'émergence de ces souches est associée à l'échec thérapeutique)

La valeur seuil des souches minoritaires X4 permettant une administration fiable du maraviroc reste à déterminer.

La valeur seuil du test utilisé pour l'AMM pourrait constituer une bonne approximation du pré requis minimal.

##### Position du groupe :

Dans l'essai MOTIVATE, 57 % des patients en échec sous maraviroc présentaient des souches à tropisme X4 ou double ; seulement 6% des patients du bras placebo en échec étaient dans cette situation. L'analyse phylogénique a permis d'établir qu'une partie au moins des souches X4 ou doubles des patients sous maraviroc en échec provenaient de l'émergence de souches minoritaires préexistantes.

Le test utilisé lors des essais d'AMM, TROFILE™ ne détecte donc pas toutes les souches X4 plasmatiques présentes. Cependant ces souches n'ont pas été systématiquement recherchées en début de traitement chez les patients en succès sous maraviroc.

Pour essayer d'établir le seuil de détection de souches minoritaires du test, le laboratoire qui propose ce test a fait un étalonnage sur souches clonales. Les mélanges clonaux X4/R5 avec des proportions décroissantes de virus X4 ont été testés. Le Test a correctement déterminé la présence de souches virales X4 dans 100% des cas à des dilutions de X4 de 10% et dans 85 % pour les échantillons à 5%.

Les experts considèrent que cet étalonnage est discutable pour 3 raisons principales :

- la charge virale des échantillons de virus clonaux n'a pas été référencée par le laboratoire (faire une détection sur 5 logs ou sur 1 log n'est techniquement pas équivalent) ;
- la signification clinique de cet étalonnage de laboratoire reste à établir ;
- la détermination sur échantillons clonaux ne reflète qu'en partie la capacité de détermination sur échantillon de patient.

Le seuil de souches minoritaires à partir duquel le maraviroc ne peut être efficace n'a pas été établi.

Un test validé pour l'administration du maraviroc devrait permettre de détecter les souches minoritaires aussi bien que Trofile™, cependant le seuil annoncé par le fabricant reste un étalonnage de laboratoire dont la valeur clinique est incertaine.

#### III.4.2 Tests historiques

Ce test se base sur la co-culture des PBMC du patient avec des cellules MT2 (qui ne présentent que le corécepteur CXCR4). Les virus à tropisme X4 ou double X4R5 sont capables d'infecter les cellules MT-2 et de former des syncytia (SI pour

*syncytia-inducing*). Les virus à tropisme R5 sont classés par cette technique comme NSI (pour *non-syncytia inducing*) donc incapables de produire ces syncytia.

**Proposition :**

La technique MT2 est longue, complexe et peu adaptée à la détermination du corécepteur du VIH-1, en pratique courante.

**Position du groupe :**

Le groupe de travail considère que le *turn-over* de la technique n'est pas très différent de celui des techniques à virus recombinant. Le principal inconvénient est sa capacité à rendre des résultats avec des échantillons avec une charge virale (CV) basses. Même s'il n'existe pas d'étude d'étalonnage avec cette technique, à partir des données disponibles, on peut supposer qu'en dessous de 5000 copies / ml, le taux d'échec serait trop important. La nécessité d'une charge virale si haute rend son utilisation peu pertinente dans l'actualité en occident ; en effet les patients sous traitement antirétroviral présentent souvent des CV relativement basses même en cas d'échec thérapeutique.

**III.4.3 Tests phénotypiques à virus recombinants**

Les tests phénotypiques à virus recombinants se basent sur les mêmes étapes :

- Extraction de l'ARN viral des populations plasmatiques de VIH du patient
- Amplification par PCR de la zone d'enveloppe du virus (*env*)
- Co - transfection des amplicons de la zone d'enveloppe avec des vecteur d'expression du gène *env* dans une lignée cellulaire pour produire des virus recombinants
- Infection par ces virus recombinants de lignées cellulaires porteuses du récepteur CD4 et un seul des corécepteurs (soit CXCR4, soit CCR5)
- Détection par bioluminescence ou réaction enzymatique.

Actuellement seul Monogram (TROFILE™) fournit un test commercial. Eurofins, qui est en possession du brevet du test Phenoscript™ a décidé de ne pas le commercialiser pour le moment.

L'équipe de virologie de Toulouse a également développé un test phénotypique de tropisme dont les performances analytiques sont similaires à celles du test Trofile™ (50).

**III.4.3.1 Performances diagnostiques**

**Proposition :**

Le test phénotypique utilisé dans les études d'AMM du maraviroc, est un test validé pour la détermination du tropisme dans le cadre du traitement par anti-CCR5 ; au vu du dossier d'AMM, la détermination par ce test est de qualité suffisante pour permettre une utilisation fiable du médicament

Un test phénotypique à technique recombinante possédant de caractéristiques d'efficacité similaires (100% > 1000c/ml; X4 : 5-10%) pourrait être utilisé en préalable à l'administration du Maraviroc, sous réserve de la validation par un contrôle de qualité

Ce Test doit être considéré comme comparateur pour la détermination du corécepteur du VIH-1



### Position du groupe :

TROFILE™ a démontré être suffisamment fiable pour administrer le Maraviroc, puisque ce médicament a été efficace chez les patients détectés R5 par ce test. Néanmoins TROFILE™ peut donner le résultat R5 chez des patients infectés par des populations doubles (l'analyse phylogénique l'a démontré).

A notre connaissance, aucun contrôle de qualité externe effectué par le laboratoire Monogram n'a été réalisé.

Un test à virus recombinants avec des caractéristiques similaires à celles affichées par TROFILE™ (fonctionnant avec des charges virales supérieures à 1000 c/ml, avec un seuil de détection de X4 minoritaires en laboratoire de 5 à 10%) ne pourra être considéré comme comparable sans plus de données (contrôle qualité, utilisation en pratique clinique pour l'administration de maraviroc). La complexité des techniques, la variabilité des approches rendent très difficile une comparaison stricte et formelle des méthodes. Il est essentiel d'établir un contrôle de qualité comme celui qui existe déjà pour les tests génotypiques de résistance. L'ANRS à travers l'action coordonnée 11, en collaboration avec l'AFSSAPS, travaillent déjà à la mise en place de ce contrôle de qualité pour les tests de tropisme.

Les experts du groupe de travail ont exprimé l'importance que tout test de tropisme utilisé soit soumis aux contrôles pertinents dans le cadre d'un contrôle de qualité coordonné.

TROFILE™ doit être considéré comme un bon comparateur; néanmoins il n'est pas le test de référence. Les patients classés comme R5 par TROFILE™ qui sont en fait X4 dans les essais MOTIVATE montrent l'imprécision de ce test.

Il n'existe pas de test de référence pour la détermination de l'utilisation du corécepteur du VIH-1.

### III.4.3.2 Problèmes organisationnels

#### Diffusion de la technique

Il est nécessaire pour la réalisation de ces tests d'utiliser un laboratoire avec un confinement de niveau 3. Une formation spécifique du personnel de laboratoire ainsi qu'un investissement lourd seront incontournables. Ces investissements humains et matériels ne seront rentables que si un nombre important d'échantillons sont testés. Pour toutes ces raisons, les techniques phénotypiques sont réservées à un nombre restreint de laboratoires spécialisés en France.

A l'heure actuelle seul le laboratoire du CHU de Toulouse est en mesure de fournir un test phénotypique soumis à un contrôle de qualité.

#### Temps de réponse :

Le temps de réalisation *stricto sensu* des tests génotypiques est plus court que celui des tests phénotypiques ; 5 jours face à 10 jours respectivement.

Néanmoins le grand nombre de tests génotypiques (de résistance) ainsi que la nécessité d'avoir un nombre suffisant d'échantillons pour initier les déterminations ont pour conséquence de retarder le rendu effectif du résultat : 3 semaine en moyenne pour un test génotypique de résistance (comparable au temps moyen de rendu du test Trofile™ à l'heure actuelle) ; ce délai de 3 semaines est considéré par les infectiologues du groupe comme acceptable pour une utilisation clinique.

### III.4.4 Tests génotypiques de tropisme

#### III.4.4.1 Technique

Comme pour les tests phénotypiques, la première étape, après l'extraction du matériel génétique, est une amplification par RT-PCR du génome viral extrait de l'échantillon du patient. Cette étape est suivie du séquençage de la zone codant la boucle V3 de la gp120.

Plusieurs algorithmes prédictifs peuvent ensuite être appliqués.

Algorithmes complexes : Ils sont produits à partir de bases de données de séquences analysées provenant de virus de tropisme connu. Plusieurs algorithmes sont disponibles en ligne sur des sites Internet collaboratifs d'accès libre.

Algorithmes simples : ils se basent sur la présence d'acides aminés a des zones précises de la boucle V3 (11/25 par exemple) ainsi que sur la charge nette des acides aminés de la boucle pour déterminer la probabilité d'utilisation du corécepteur.

Ces algorithmes simples ne dépendent pas de l'exploitation des bases de données et présentent des performances au moins aussi bonnes que les autres algorithmes disponibles actuellement.

#### Zone de séquençage

##### **Proposition :**

La région hypervariable V3 de sa protéine d'enveloppe gp120 est la zone ciblée par les tests génotypiques. D'autres zones de la glycoprotéine gp120 peuvent être à l'origine d'une modification du tropisme. L'extension du séquençage à ces zones pourrait présenter un intérêt pour augmenter la sensibilité des algorithmes génotypiques.

##### **Position du groupe :**

Aucune étude n'a démontré l'utilité d'analyser des régions autres que V3 pour la détermination du tropisme.  
D'un point de vue technique, le polymorphisme de longueur des zones V1 à V5 de la gp120 rend un séquençage et surtout une analyse de plusieurs zones ou d'une zone étendue extrêmement difficile et peut se révéler moins rentable.  
Pour ce qui est de l'efficacité, il n'y a pas –à l'heure actuelle- de données suffisantes pour chercher à séquencer d'autres zones en dehors de la boucle V3.

#### Extraction des séquences à amplifier :

##### **Proposition :**

Plusieurs études suggèrent une prévalence des souches à tropisme X4 plus importante dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) que dans le plasma pour un même patient. Dans une étude, la sensibilité d'un test génotypique a été augmentée par l'extraction du matériel viral des PBMC du patient.  
L'extraction sur SANG TOTAL peut être plus recommandable par rapport à l'extraction sur échantillon de plasma pour la détermination du tropisme.

**Position du groupe :**

Cette discordance entre les caractéristiques des virus détectés dans le plasma avec ceux des autres compartiments est connue et a été étudiée, notamment pour ce qui est des résistances aux antirétroviraux. L'intérêt clinique de réaliser les tests de résistance sur les virus d'autres compartiments que le compartiment plasmatique n'a pas été établi. Dans les faits, l'extraction du matériel génétique du compartiment plasmatique apparaît efficace et suffisant ; il n'y a pas de données qui pourraient laisser penser qu'il en serait autrement pour les tests génotypiques de tropisme.

Algorithmes

**Proposition :**

L'intégration de ces paramètres cliniques associés aux souches X4, a permis d'améliorer la sensibilité de l'algorithme SVM de 39,8% à 63% dans une étude sur séquences V3 extraites de bases de données. L'intégration de ces données cliniques et biologiques doit être recommandée pour l'optimisation des algorithmes

**Position du groupe :**

Il n'existe pas de données suffisantes pour savoir quelles données cliniques sont utilisables. . L'efficacité de l'intégration des données cliniques (CD4, charge virale) aux algorithmes de génotypage n'est pas démontrée (68).

III.4.4.2 Seuil de détection des souches minoritaires

**Proposition :**

Le seuil de détection des variants minoritaires pour les tests génotypiques de résistance (20% - 30%) peut être une bonne approximation du seuil de détection pour les tests de tropisme génotypiques.

**Position du groupe :**

La détection de souches minoritaires par les tests de résistance génotypiques est effectivement de 20 à 30%. Ce qui veut dire qu'en dessous de ce seuil les variants minoritaires potentiellement résistants ne sont pas détectés. Il faut rappeler que malgré ce facteur en principe limitant, les tests génotypiques de résistance ont démontré leur utilité pour l'optimisation des traitements antirétroviraux. Cette utilité a été démontrée pour des patients avec des charges virales relativement hautes (>1000 c/ml). En pratique clinique, les professionnels sont confrontés à des patients présentant des CV de plus en plus basses même chez ceux en situation d'échec. Quand on réalise ces tests de résistance sur des échantillons à charge virale faible, il est difficile de prévoir l'efficacité de l'extrapolation clinique de la détermination des résistances. Les cliniciens insistent qu'en pratique, pour des CV en dessous de 500 c/ml, ils ne demandent pas la détermination du test de résistance pour guider leurs choix.

Même si cette approximation de 20% semble raisonnable, il n'y a pas d'évidence formelle sur le seuil de détection des variants minoritaires pour les tests génotypiques de tropisme. (Ceci est vrai aussi pour les tests phénotypiques voir II.1)

On ne connaît pas d'ailleurs le seuil de variants minoritaires X4 ou doubles à partir duquel le maraviroc n'est plus efficace.

### III.4.5 Efficacité diagnostique des tests génotypiques de tropisme

#### Proposition :

Un seuil de 20% de détection des souches minoritaires est suffisant pour une administration fiable du maraviroc.

La détermination du tropisme par génotypage est suffisamment fiable pour être utilisée au préalable du traitement par antagoniste du récepteur à chimiokines CCR5

#### Position du groupe de travail :

Il n'existe pas de données sur le seuil réel de variants X4 susceptible d'avoir une influence sur l'efficacité du traitement par maraviroc.

L'analyse par séquençage ultrasensible réalisé par Swenson et al. sur les échantillons d'un essai réalisé avec TROFILE comme test de référence semble indiquer que la présence de variants X4 présents à moins de 10%, aurait une influence relative sur l'efficacité d'une quadrithérapie avec Maraviroc. Il s'agit de données présentées au CROI, conférence sur les rétrovirus et infections opportunistes de 2009. Cette analyse rétrospective a été réalisée sur 202 échantillons de patients de l'étude 1029 où les patients détectés comme X4 ou Double /Mixte ont été randomisé sur trois bras de traitement : traitement optimisé avec maraviroc 1 fois par jour, maraviroc 2 fois par jour ou placebo ; dans cet essai la maraviroc n'a pas démontré d'efficacité.

Dans le bras maraviroc 2 fois par jour, les patients avec des proportions de X4 < 10 % ont montré des réductions supérieures à celles observées chez ceux présentant des proportions de X4 <10%. (69)

Ces données sont rétrospectives, leur valeur clinique réelle reste à déterminer, même si elles donnent des pistes de recherche.

Les algorithmes génotypiques comparés aux tests phénotypiques sur échantillons de patients (50) ont montré une bonne concordance, et une sensibilité aux alentours de 80%, avec une spécificité supérieurs à 90%.

En prenant ces chiffres comme références, on a donc deux cas de figure pour un patient testé par génotypage :

S'il est détecté X4, on n'administre pas le maraviroc. Environ 10% de patients qui auraient pu bénéficier du traitement doivent être réorientés vers d'autres traitements.

S'il est détecté R5, deux options sont possibles :

Administer le maraviroc avec un risque d'environ 20% qu'il soit X4. Le risque d'échec thérapeutique lié à cette mauvaise classification est difficilement évaluable. Néanmoins certains experts insistent sur le fait qu'initier une trithérapie avec maraviroc chez un patient avec peu d'options thérapeutiques (un ou deux antirétroviraux pleinement efficaces d'après les tests de résistance) et infecté par des souches X4 majoritaires –non détectées-, correspondrait presque à administrer une bi ou monothérapie fonctionnelle. Le taux d'échecs sous monothérapie et bithérapie a été considéré inacceptable depuis longtemps. D'ailleurs même s'il ne s'agit pas d'un patient avec peu d'option, cette incertitude de détection des souches X4 peut de toute façon retarder de plusieurs mois l'administration d'une combinaison pleinement efficace.

Réaliser un Test phénotypique de confirmation, ce qui d'après le groupe n'est pas viable d'un point de vue organisationnel. En effet dans ce cas de figure, le patient devrait attendre en moyenne 2 x 3 semaines (temps de rendu moyen des résultats de chaque technique) pour initier un traitement ce qui est excessif. De plus un

nouveau prélèvement nécessite une deuxième consultation, ce qui alourdit encore le cout du typage.

En somme il n'existe pas de réponse tranchée sur l'efficacité diagnostique clinique des tests de tropisme génotypiques. Leur concordance diagnostique en laboratoire semble acceptable (environ 90%) avec les tests phénotypiques. Les réponses en fonction des charges virales et en particulier pour des CV faibles n'ont pas été évaluées. Le seuil de détection des souches minoritaires reste à évaluer. Et surtout le seuil nécessaire pour que le maraviroc soit efficace reste inconnu.

Une étude de l'ANRS est en cours pour essayer de confirmer l'équivalence biologique.

Il s'agit d'une étude retro-prospective observationnelle et multicentrique (19 centres) pour laquelle 300 prélèvements de patients seront analysés. La détermination phénotypique du tropisme VIH-1 sera réalisée dans le cadre de l'essai ouvert d'accès précoce au maraviroc, également sur le prélèvement de screening, par le test Trofile

La prédiction génotypique du tropisme sera réalisée à partir de la séquence gp120 en utilisant au moins 4 algorithmes de prédiction (PSSM, Decision Tree, Geno2 Pheno, 11/25), seuls ou en combinaison.

L'objectif principal est d'étudier la corrélation entre la prédiction du tropisme par le test phénotypique et par les algorithmes génotypiques. Il s'agit donc ici d'étudier la concordance entre les résultats phénotypique et les résultats obtenus par chacun des 4 algorithmes étudiés

Avec cette étude prospective nous disposerons également de données permettant d'étudier la relation entre la prédiction génotypique du tropisme et la réponse virologique et immunologique au maraviroc. La transposition clinique de ces résultats impliquera encore une part d'incertitude.

### III.5 Perspectives

#### III.5.1 Mécanismes d'échappement au maraviroc – détection des résistances.

Trois mécanismes de résistance ont été avancés pour les patients sous traitement par maraviroc :

- basculement dû à l'émergence de souches minoritaires X4 du à la pression de sélection du traitement ;
- apparition de novo de mutations au sein du génome des souches R5, leur permettant d'utiliser CXCR4 ;
- apparition de mutations au sein du génome des souches R5, leur permettant d'utiliser CCR5 malgré l'union à celui-ci du maraviroc (mécanisme démontré in vitro pour d'autres antagonistes du CCR5).

#### Proposition :

L'échec thérapeutique au sein des études pivot d'AMM a été associé avec l'émergence de souches virales à tropisme X4

Malgré l'absence d'essai de confirmation de son utilité, la réalisation d'un test de tropisme pourrait être nécessaire en cas d'échec thérapeutique sous maraviroc.

**Position du groupe :**

Il existe un corpus insuffisant de données pour établir une stratégie sur les résistances au Maraviroc.

Cependant, il semble logique de réaliser un test de tropisme en cas d'échec sous maraviroc. Dans ce cas la réalisation d'un test génotypique apporterait plus d'information puisqu'il serait possible de documenter les mutations de la boucle V3 associées à cette résistance. Les autres zones à séquencer en cas de résistance au maraviroc ne sont pas établies. Il est nécessaire de réaliser des études complémentaires dans cette situation.

**III.5.2 Immunomodulation et antagonistes du CCR5**

L'association de la délétion homozygote  $\Delta 32$ -CCR5 avec un risque accru d'infection par Flavivirus : cette mutation du gène CCR5 (homozygote dans 1 % de la population caucasienne, 10 % sous sa forme hétérozygote) expose à un risque accru d'infection symptomatique à virus du Nil occidental (West Nile Virus) Cette mutation serait également plus fréquente chez les patients développant une encéphalite liée au virus TBEV (virus de l'encéphalite à tiques).

La notification de 4 lymphomes (2 Hodgkin et 2 non-Hodgkin) a été rapportée dans un essai de phase II sous vicriviroc. Du fait de l'association connue entre ces lymphomes et le Virus Epstein Barr (EBV) une étude poussée a été menée. Seul un patient avec lymphome Hodgkin a présenté biopsie ganglionnaire hautement positive pour EBV ; et aucun des autres 116 patients testés ne présentaient de séroconversion pour EBV.

**Position du groupe :**

Le récepteur CCR5 et son ligand CCL5 (RANTES) semble réguler le chimiotactisme lymphocytaire en particulier dans le système nerveux central. Les lymphocytes T mémoire effecteurs nécessitent la présence de CCR5 pour déterminer leur chimiotactisme.

Sur modèle murin, il a été établi que CCR5 est redondant. C'est à dire que le recrutement des leucocytes au sein du système nerveux central est efficace malgré l'absence de CCR5 (souris CCR5 -/-) (70)

Néanmoins il semble qu'un système immunitaire ayant toujours fonctionné avec CCR5 ne puisse réaliser un recrutement efficace avec les autres récepteurs à chimiokine disponibles.

Plus récemment Glass et al ont démontré l'importance –toujours sur souris knockout (CCR5-/-)- que le récepteur CCR5 est un déterminant de la survie au WNV, en régulant la migration des leucocytes dans le SNC. (34)

Si les implications cliniques réelles de l'inhibition du CCR5 par les antagonistes des récepteurs à chimiokines ne sont pas établies, les données expérimentales dont on dispose indiquent qu'une surveillance étroite est recommandable.

La mutation CCR5 delta32 a été associée avec une moindre réactivation virus oncogénique Epstein Barr (VEB) chez les patients receveurs d'un halo-transplant de cellules souches hématopoïétiques. (71). Néanmoins il n'est pas impossible que CCR5 régule également le chimiotactisme lymphocytaire pour cette infection de la même façon que pour les infections à Flavivirus.

Les antagonistes de CCR5 pourraient également favoriser la reconstitution immunitaire en bloquant la réplication virale résiduelle dans le tissu lymphoïde associé aux muqueuses digestives. Les antagonistes de CCR5 pourraient avoir également un effet protecteur sur les lymphocytes CD4 en freinant l'activation immunitaire cellulaire.

Chez des patients sous traitement antirétroviral stable, en succès virologique (ARN VIH < 50 copies/ml de plasma) mais présentant une restauration immunologique incomplète (CD4 < 350/mm<sup>3</sup>), l'adjonction de maraviroc pourrait donc permettre un gain significatif de lymphocytes CD4. Cette hypothèse est en cours d'évaluation dans le cadre d'une étude ANRS (**Marimuno**).

### III.5.3 Tropisme – Marqueur pronostique ?

L'association de l'émergence de virus à tropisme double ou X4 avec l'avancement de la maladie par VIH est établie depuis longtemps.

Le tropisme viral constitue donc une ligne de recherche intéressante dans l'évaluation pronostique du patient VIH, comme d'autres marqueurs comme les marqueurs d'activation (HLA DR, CD38) par exemple. Néanmoins il n'existe pas d'évidence suffisante pour sa transposition clinique.

## III.6 Synthèse des positions sur les différentes techniques de tropisme

Cette synthèse correspond à une reprise globale des arguments sur les 2 techniques par les membres du groupe.

### III.6.1 Aspect organisationnels

#### Tests phénotypiques

Actuellement il n'existe qu'un laboratoire public de virologie en mesure de réaliser ce test (personnel formé, structure adaptée, confinement de niveau 3).

Le Laboratoire privé est aux Etats Unis d'Amérique et oblige à envoyer les échantillons par messagerie

Le temps de rendu d'un résultat est actuellement d'environ 3 semaines

#### Tests génotypiques

Tous les laboratoires de Virologie réalisant les tests de résistance génotypique sont en mesure de réaliser les tests de tropisme génotypique (une quarantaine environ).

Le temps de rendu des résultats sera probablement en pratique courante de 2 à 3 semaines.

### III.6.2 Performance diagnostiques

#### Tests phénotypiques

Ces tests et en particulier Trofile<sup>TM</sup> dans sa version standard a été utilisé pour les essais d'AMM du Maraviroc. La catégorisation par ce test permet donc une efficacité suffisante du traitement.

Les performances nécessaires pour la détection des souches minoritaires X4 en pratique clinique restent à déterminer. En effet l'émergence de souches X4 non détectées initialement chez une partie des patients considérés comme porteurs de virus R5 en échec thérapeutique souligne les incertitudes existant sur ce point. La présence de virus X4 minoritaires avant traitement chez des patients en succès thérapeutique est également probable.

La détection de souches minoritaires entre 5 et 10 % pour des mixtures d'isolats clonaux ne décrit qu'en partie le seuil de détection de souches minoritaires pour un patient donné.

Le test de Monogram est de facto le comparateur pour la détermination du tropisme du VIH-1 ; il ne peut être considéré en aucun cas comme un Test de référence ou *Gold Standard*.

#### Tests génotypiques

Ces tests présentent une concordance importante avec les tests phénotypiques en laboratoire.

Les algorithmes complexes sont issus des données extraites des bases de données. Dans ces bases de données encore beaucoup de séquences génétiques de souches virales sont associées à un tropisme viral déterminé par des techniques relativement hétérogènes. La qualité de ces bases de données concernant le tropisme augmentera cependant progressivement. On peut donc espérer une meilleure prédiction avec ces algorithmes à l'avenir. Il importe de noter que des algorithmes simples fondés sur les acides aminés 11/25 de V3 et la charge nette sont aussi performants notamment sur les virus de sous-type B (7<sup>th</sup> European HIV Drug Resistance Workshop – Stockholm 2009).

On ne sait pas formellement si le maraviroc est efficace chez les patients détectés R5 par un test génotypique, même si un faisceau concordant de données indirectes semblent l'indiquer.

Le seuil de détection des souches minoritaires reste à démontrer et pourrait correspondre à celui des tests génotypiques de résistance (20-30%).

#### *III.6.3 Contrôle qualité*

Le groupe tient à insister sur les incertitudes qui pèsent sur les performances diagnostiques des deux techniques ainsi que sur la complexité des techniques de détermination du tropisme.

L'établissement d'un contrôle de qualité similaire à celui existant déjà pour les tests de résistance est donc une condition indispensable à l'utilisation d'un test de tropisme, quelque soit la technique employée.

#### *III.6.4 Évaluation globale*

Les tests phénotypiques semblent assez fiables pour administrer le maraviroc avec sécurité, bien qu'il existe des incertitudes sur la détection de variants minoritaires.

Les tests génotypiques semblent présenter une bonne équivalence biologique avec les tests phénotypiques.

La transposition directe de ces résultats à la clinique devra s'appuyer sur les résultats de l'étude ANRS « GenoTropism ». Il faut insister sur le fait que d'un point de vue organisationnel pour la France, l'option qui semble la plus pérenne est celle de l'utilisation des tests génotypiques de tropisme étant donné le nombre de laboratoires étant d'ores et déjà en mesure de l'appliquer. La découverte potentielle de nouvelles indications pour le maraviroc pourrait générer aussi un surcroît de déterminations, la population cible du maraviroc étant pour le moment assez restreinte. Le même test génotypique permettra également de documenter en partie les échecs des traitements comportant des antagonistes de CCR5.



## **IV. PROTOCOLE DE L'ÉTUDE « GENOTROPISM » : ÉTUDE DE LA CORRÉLATION GÉNOTYPE DE LA GP120/ PHÉNOTYPE POUR LE TROPISME R5/X4 DU VIH-1 ET CORRÉLATION À LA RÉPONSE VIROLOGIQUE AU MARAVIROC**

### **IV.1 Investigateurs**

#### **Virologie**

- Dr Bernard Masquelier  
Laboratoire de Virologie, CHU de Bordeaux
- Dr Diane Descamps - Pr Françoise Brun-Vézinet  
Laboratoire de Virologie, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris
- Dr Anne-Geneviève Marcelin - Pr Vincent Calvez  
Laboratoire de Virologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris

#### **Pour le Groupe ANRS AC11 Résistance.**

#### **Clinique**

- Pr Jacques Reynes  
Service des Maladies Infectieuses, CHU de Montpellier

#### **Méthodologie**

- Dr Philippe Flandre  
Inserm UMR S 720, Paris

### **IV.2 Rationnel**

Les inhibiteurs de co-récepteurs du VIH-1 constituent une nouvelle classe d'antirétroviraux (ARVs) d'un intérêt potentiel pour le traitement des patients déjà en échec avec les classes précédentes. Le maraviroc est une molécule anti-CCR5, active sur les souches VIH-1 de tropisme R5, y compris sur l'ensemble des virus R5 résistants aux autres ARVs. Le maraviroc a récemment démontré son efficacité chez des patients à virus à tropisme R5 et en échec virologique multiple avec des autres ARVs. La détermination du tropisme avant traitement est un point critique pour la prescription du maraviroc. Le tropisme peut être défini par des tests phénotypiques utilisant des virus recombinants incluant tout ou partie de la gp120 du virus à étudier et des lignées cellulaires exprimant CCR5 ou CXCR4. En parallèle à cette approche phénotypique, des approches génotypiques visant à prédire le tropisme des souches VIH-1 en fonction de leur séquence dans la région hypervariable V3 de la gp120 ont été développées. La plus simple « règle 11/25 » classe le virus comme X4 en cas de présence d'acides aminés chargés positivement (lysine ou arginine) aux positions 11 et/ou 23 de la boucle V3. D'autres approches bioinformatiques ont été proposées : matrice de score spécifique des positions (PSSM), Support vector machine ([www.geno2pheno.org](http://www.geno2pheno.org); [www.genomiac2.ucsd.edu](http://www.genomiac2.ucsd.edu)), réseaux neuronaux, arbre Décisionnel10. Aucune de ces approches bioinformatiques n'est complètement corrélée au tropisme phénotypique. A titre d'exemple, la prédiction par geno2pheno a montré 86% de concordance avec le test phénotypique Trofile. Dans le but de permettre un accès facile et sûr à la prédiction génotypique du tropisme, il est donc essentiel d'évaluer plus en avant ces approches génotypiques, en les corrélant avec le tropisme phénotypique d'une part, et à la réponse virologique au Maraviroc d'autre part, et en optimisant un algorithme génotypique permettant de prédire le phénotype avec les meilleures spécificités et sensibilité.

### IV.3 Objectifs de l'étude

**Objectif principal :** étudier la corrélation entre la prédiction génotypique du tropisme VIH-1 vers les co-récepteurs CCR5 et CXCR4 et la détermination du tropisme par test phénotypique recombinant.

**Objectifs secondaires :**

- étudier la relation entre la prédiction génotypique du tropisme R5/X4 avant traitement et la réponse virologique et immunologique à un inhibiteur du CCR5, le maraviroc ;
- étudier l'évolution génotypique virale en cas de charge virale détectable un ou trois mois après le début du traitement par maraviroc.

### IV.4 Méthodes

#### Type d'étude

Étude observationnelle, multicentrique, rétro-prospective.

#### Patients

Étude multicentrique réalisée dans le contexte de l'essai en ouvert d'accès précoce (EAP) du maraviroc pour lequel 19 centres et environ 300 patients sont prévus à la phase de screening, pour une inclusion finale de 150 patients.

Critères d'inclusion :

- patients infectés par le VIH-1
- âge  $\geq$  18 ans
- Prétraités par antirétroviraux et en échec virologique avec un ARN VIH-1 plasmatique  $\geq$  1000 copies/mL.
- Inclus dans la phase de screening du protocole d'accès élargi (Expanded Access Protocol) au Maraviroc en France.

#### Méthodes virologiques

Le séquençage de la gp120 (région C2V3) du VIH-1 sera réalisé à partir d'un aliquot de plasma stocké pour la charge virale dans les différents laboratoires participants au moment de la visite de screening de l'EAP maraviroc, sans prélèvement supplémentaire.

Les méthodes et amorces utilisées pour le séquençage de la gp120 figurent dans le site <http://www.hivfrenchresistance.org>

La détermination phénotypique du tropisme VIH-1 sera réalisée dans le cadre de l'EAP maraviroc, également sur le prélèvement de screening, par le test Trofile (Monogram Biosciences, San Francisco, CA, USA).

La prédiction génotypique du tropisme sera réalisée à partir de la séquence gp120 en utilisant au moins 4 algorithmes de prédiction (PSSM, Decision Tree, Geno2 Pheno, 11/25), seuls ou en combinaison.

Le sous-type VIH-1 sera déterminé à partir de la séquence C2V3 par la méthode de neighbor joining avec les deux paramètres de Kimura.

L'évolution du tropisme à M1 et/ou M3 après le début du traitement pourra être étudiée par séquençage de la gp120 en cas de charge virale  $>500$  copies/ml.

### Autres données clinico-virologiques

Les données suivantes collectées dans le cadre de l'EAP maraviroc, seront nécessaires à l'analyse descriptive, ou aux corrélations clinico –virologiques :

- Tropisme VIH-1 au screening, déterminé par Trofile
- Stade clinique à l'inclusion
- Date de prélèvement pour test Trofile
- Date de début de traitement par Maraviroc
- ARN VIH-1 plasmatique au screening, au début du traitement par maraviroc, puis à M1, M3, M6,
- Numération lymphocytaire CD4 (+) au screening, au début du traitement par maraviroc, puis à M1, M3, M6
- Nadir des CD4
- Traitement associé au maraviroc
- Génotype de résistance RT et protéase et éventuellement gp41 au moment du screening ou dans les 3 mois précédents, sous traitement antirétroviral
- Liste des molécules préalablement administrées.

## IV.5 Méthodologie et analyse statistique

### IV.5.1 Objectif principal

L'objectif principal est d'étudier la corrélation entre la prédiction du tropisme par le test phénotypique et par les algorithmes génotypiques. Il s'agit donc ici d'étudier la concordance entre les résultats phénotypique et les résultats obtenus par chacun des 4 algorithmes étudiés (PSSM, Decision Tree, Geno2 Pheno, 11/25). Pour chaque étude de corrélation phéno-géno les résultats se présenteront sous la forme du tableau ci-dessous, où l'effectif de chacune des cellules est représenté par les lettres de a → i. La mesure de concordance permettant de quantifier l'accord entre les deux techniques se nomme Kappa. Cette mesure estime la probabilité d'accord entre les 2 techniques corrigée par le fait que cet accord peut survenir par hasard.

		Résultat phénotypique		
		CCR5	CXCR4	Dual
Résultat génotypique algorithme X	CCR5	a	b	c
	CXCR4	d	e	f
	Dual	g	h	i

Cette estimation peut être comparée à 0 permettant de réaliser un test d'hypothèse avec comme hypothèse nulle : pas de concordance ( $\kappa=0$ ). L'étude des 4 différents algorithmes génotypiques produira donc l'estimation de 4 mesures du Kappa avec pour chaque fois un test rejetant ou non l'existence d'une concordance significativement différente de 0.

Ces résultats permettront soit de déterminer un algorithme préférentiel, celui produisant un test significatif et l'estimation du kappa la plus grande dans l'étude de concordance avec le test phénotypique, soit, dans le cas où aucun des Kappa ne

serait significativement différent de 0, de suggérer un nouvel algorithme en plus grande concordance avec le test phénotypique.

Il est à noter que même dans le cas où un algorithme génotypique produirait une mesure de kappa significativement différente de 0 un nouvel algorithme pourrait néanmoins être construit dans le but d'obtenir une plus forte corrélation.

#### *IV.5.2 Corrélation tropisme génotypique/réponse virologique et immunologique*

La classification du tropisme selon la méthode génotypique produit une variable discrète. Le choix de la méthode statistique pour étudier l'association entre le tropisme et la réponse virologique dépendra de la nature de la variable réponse.

Dans le cas d'une variable continue, telle que la baisse de la charge virale, les tests non-paramétriques du type Kruskal-Wallis seront privilégiés. Ce test permettra de comparer la baisse de charge virale à un temps donné entre les 3 groupes de tropisme (CCR5, CXCR4 ou Dual). Les résultats pourront être estimés en valeurs médianes et interquartiles (25%-75%). Dans le cas d'une réponse virologique discrète (répondeurs versus non répondeurs) le test de Fischer sera préféré. Ce test permettra de comparer la proportion de répondeurs entre les 3 groupes de tropisme (CCR5, CXCR4 ou Dual).

#### **Aspects réglementaires**

Ce protocole d'étude sera soumis à l'avis de la Commission Nationale Informatique et Liberté et au Comité Consultatif de Traitement de l'Information dans la Recherche Scientifique et Médicale, Paris, France. Chaque patient recevra une feuille d'information lors de son inclusion dans l'étude.

#### **Valorisation des données**

Les investigateurs seront responsables de la valorisation des données pour le groupe ANRS AC11 Résistance

---

## REFERENCES

---

1. European Medicines Agency. Scientific discussion. Celsentri. London: EMEA; 2007.
2. Tsibris A. Update on CCR5 inhibitors: scientific rationale, clinical evidence, and anticipated uses. PRN Notebook 2007;12.
3. Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995;332(4):201-8.
4. Taylor JMG, Wang Y, Ahdieh L, Chmiel JS, Detels R, Giorgi JV, *et al.* Causal pathways for CCR5 genotype and HIV progression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000;23(2):160-71.
5. Desjardins SF, Berchiche YA, Haddad E, Heveker N. CXCR4, un récepteur de chimiokine aux multiples talents. *Med Sci (Paris)* 2007;23(11):980-4.
6. Moore JP, Doms RW. The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(19):10598-602.
7. HIV-1 entry : study of the trafficking of CCR5 and design of antiretroviral strategies 2009. <<http://institut.cochin.inserm.fr>> [consulté le 7-9-0009].
8. Coakley E, Petropoulos CJ, Whitcomb JM. Assessing chemokine co-receptor usage in HIV. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18(1):9-15.
9. Weber J, Piontkivska H, Quiñones-Mateu ME. HIV type 1 tropism and inhibitors of viral entry: clinical implications. *AIDS Rev* 2006;8(2):60-77.
10. Kawamura T, Gulden FO, Sugaya M, McNamara DT, Borris DL, Lederman MM, *et al.* R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(14):8401-6.
11. Tersmette M, de Goede RE, Al BJM, Winkel IN, Gruters RA, Cuypers HT, *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):2026-32.
12. Koot M, Keet IPM, Vos AHV, de Goede REY, Roos MTh, Coutinho RA, *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):681-8.
13. Reynes J. Inhibiteurs du CCR5 : développement clinique et perspectives thérapeutiques antirétrovirales. *Virologie* 2007;11(Num Spéc):120-9.
14. Esté JA, Telenti A. HIV entry inhibitors. *Lancet* 2007;370(9581):81-8.
15. Suleiman J, Sobhie Diaz S, DeJesus E, Slim J, Dunkle L, Alvarez D. HIV Viral tropism in vicriviroc VICTOR-E1 trial: correlations with clinical variables 2007. <<http://www.ias2007.org>> [consulté le 11-9-2009].
16. Gulick RM, Lalezari J, Goodrich J, Clumeck N, DeJesus E, Horban A, *et al.* Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2008;359(14):1429-41.
17. Brumme ZL, Goodrich J, Mayer HB, Brumme CJ, Henrick BM, Wynhoven B, *et al.* Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naïve individuals. *J Infect Dis* 2005;192(3):466-74.
18. Moyle GJ, Wildfire A, Mandalia S, Mayer H, Goodrich J, Whitcomb J, *et al.* Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2005;191(6):866-72.
19. Hunt PW, Harrigan PR, Huang W, Bates M, Williamson DW, Mccune JM, *et al.* Prevalence of CXCR4 tropism among antiretroviral-treated HIV-1-infected patients with detectable viremia. *J Infect Dis* 2006;194(7):926-30.
20. Wilkin TJ, Su Z, Kuritzkes DR, Hughes M, Flexner C, Gross R, *et al.* HIV type 1 chemokine coreceptor use among antiretroviral experienced patients screened for a clinical of CCR5 inhibitor: AIDS clinical

- trial group A5211. *Clin Infect Dis* 2007;44:591-5.
21. Melby T, Despirito M, Demasi R, Heilek-Snyder G, Greenberg ML, Graham N. HIV-1 coreceptor use in triple-class treatment-experienced patients: baseline prevalence, correlates, and relationship to enfuvirtide response. *J Infect Dis* 2006;194(2):238-46.
  22. van Rij RP, Blaak H, Visser JA, Brouwer M, Rientsma R, Broersen S, *et al.* Differential coreceptor expression allows for independent evolution of non-syncytium-inducing and syncytium-inducing HIV-1. *J Clin Invest* 2000;106(8):1039-52.
  23. Delobel P, Sandres-Sauné K, Cazabat M, Pasquier C, Marchou B, Massip P, *et al.* R5 to X4 switch of the predominant HIV-1 population in cellular reservoirs during effective highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;38(4):382-92.
  24. Verhofstede C, Vandekerckhove L, Van Eygen V, Demecheleer E, Vandenbroucke I, Winters B, *et al.* CXCR4-using HIV type 1 variants are more commonly found in peripheral blood mononuclear cell DNA than in plasma RNA. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009;50(2):126-36.
  25. Uittenbogaart CH, Anisman DJ, Jamieson BD, Kitchen S, Schmidt I, Zack JA, *et al.* Differential tropism of HIV-1 isolates for distinct thymocyte subsets in vitro. *AIDS* 1996;10(7):F9-F16.
  26. Andreoletti L, Skrabal K, Perrin V, Chomont N, Saragosti S, Gresenguet G, *et al.* Genetic and phenotypic features of blood and genital viral populations of clinically asymptomatic and antiretroviral-treatment-naive clade A human immunodeficiency virus type 1-infected women. *J Clin Microbiol* 2007;45(6):1838-42.
  27. Haute Autorité de santé. Avis de la commission de la transparence du 11 juin 2008. Celsentri 150 mg comprimés pelliculés. Celsentri 300 mg comprimés pelliculés. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2008.
  28. Fätkenheuer G, Nelson M, Lazzarin A, Konourina I, Hoepelman AIM, Lampiris H, *et al.* Subgroup analyses of maraviroc in previously treated R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2008;359(14):1442-55.
  29. Rosen O, Sharon M, Quadt-Akabayov SR, Anglister J. Molecular switch for alternative conformations of the HIV-1 V3 region: implications for phenotype conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(38):13950-5.
  30. Westby M, Lewis M, Whitcomb J, Youle M, Pozniak AL, James IT, *et al.* Emergence of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4-using virus reservoir. *J Virol* 2006;80(10):4909-20.
  31. Lewis M, Simpson P, Fransen S, Huang W, Whitcomb J, Mosley M, *et al.* CXCR4-using virus detected in patients receiving maraviroc in the phase 3 studies MOTIVATE 1 and 2 originates from a pre-existing minority of CXCR4-using virus. 16th International HIV drug resistance Workshop June 12-16, 2007 Barbados, West Indies 2007. <<http://www.natap.org>> .
  32. Kuhmann SE, Pugach P, Kunstman KJ, Taylor J, Stanfield RL, Snyder A, *et al.* Genetic and phenotypic analyses of human immunodeficiency virus type 1 escape from a small-molecule CCR5 inhibitor. *J Virol* 2004;78(6):2790-807.
  33. Levin J. Safety and efficacy of MARAVIROC (MVC), a novel CCR5 antagonist, when used in combination with optimized background therapy (OBT) for the treatment of antiretroviral experienced subjects infected with dual/mixed tropic HIV-1: 24 week results of a phase 2b exploratory trial. XVI International AIDS conference. August 13-18, 2006. Toronto Canada 2006. <<http://www.natap.org>> [consulté le 16-2-2009].
  34. Glass WG, Lim JK, Cholera R, Pletnev AG, Gao JL, Murphy PM. Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *J Exp Med* 2005;202(8):1087-98.
  35. Lim JK, Louie CY, Glaser C, Jean C, Johnson B, Johnson H, *et al.* Genetic deficiency of chemokine receptor CCR5 is a strong risk factor for symptomatic west Nile virus infection: a meta-analysis of 4 cohorts in the US epidemic. *J Infect Dis* 2008;197:262-5.
  36. Kindberg E, Mickiené A, Ax C, Åkerlind B, Vene S, Lindquist L, *et al.* A deletion in the chemokine receptor 5 (CCR5) gene is associated with tickborne encephalitis. *J Infect Dis* 2008;197(2):266-9.

37. Tsibris AMN, Paredes R, Chadbrun A, Su Z, Henrich TJ, Krambrink A, *et al.* Lymphoma diagnosis and plasma epstein-barr virus load during vicriviroc therapy: results of the AIDS clinical trials group A5211. *Clin Infect Dis* 2009;48:642-9.
38. Pugach P, Marozsan AJ, Ketas TJ, Landes EL, Moore JP, Kuhmann SE. HIV-1 clones resistant to a small molecule CCR5 inhibitor use the inhibitor-bound form of CCR5 for entry. *Virology* 2007;361(1):212-28.
39. Trkola A, Kuhmann SE, Strizki JM, Maxwell E, Ketas T, Morgan T, *et al.* HIV-1 escape from a small molecule, CCR5-specific entry inhibitor does not involve CXCR4 use. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99(1):395-400.
40. Soulié C, Calvez V. Les tests de tropisme du VIH à l'heure de la mise à disposition du 1er anti-CCR5. *Méd Mal Infect* 2008;38(Suppl):S7-11.
41. Soulié C, Marcelin AG, Ghosn J, Amellal B, Assoumou L, Lambert S, *et al.* HIV-1 X4/R5 co-receptor in viral reservoir during suppressive HAART. *AIDS* 2007;21(16):2243-5.
42. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Rockville: AIDSinfo; 2008.
43. Ministère de la santé et des solidarités, Yéni P. Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH . Paris: Flammarion Médecine-Sciences; 2008.
44. Whitcomb JM, Huang W, Fransen S, Limoli K, Toma J, Wrin T, *et al.* Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(2):566-75.
45. Braun P, Wiesmann F. Phenotypic assays for the determination of coreceptor tropism in HIV-1 infected individuals. *Eur J Med Res* 2007;12(9):463-72.
46. Skrabal K, Low AJ, Dong W, Sing T, Cheung PK, Mammano F, *et al.* Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting: degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model. *J Clin Microbiol* 2007;45(2):279-84.
47. Roulet V, Rochas S, Labernardières JL, Mammano F, Faudon JL, Lebel-binay S, *et al.* Phenoscript®Env: Test phénotypique de tropisme viral, détection de quasi-espèce minoritaires de tropisme X4 et détermination du tropisme viral de sous types non-B du VIH-1. Conférence francophone VIH/sida, 2007 Paris, France. INSERM; 2007.
48. Van Baelen K, Vandenbroucke I, Rondelez E, Van Eygen V, Vermeiren H, Stuyver LJ. HIV-1 coreceptor usage determination in clinical isolates using clonal and population-based genotypic and phenotypic assays. *J Virol Methods* 2007;146(1-2):61-73.
49. de Mendoza C., Van Baelen K., Poveda E, Rondelez E, Zahonero N, Stuyver L, *et al.* Performance of a population-based HIV-1 tropism phenotypic assay and correlation with V3 genotypic prediction tools in recent HIV-1 seroconverters. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008;48(3):241-4.
50. Raymond S, Delobel P, Mavigner M, Cazabat M, Souyris C, Sandres-Sauné K, *et al.* Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism. *AIDS* 2008;22(14):F11-F16.
51. Pancera M. Structure, fonction et antigénicité des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH1). *Virologie* 2005;9(6):457-72.
52. Jensen MA, Li FS, van 't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, *et al.* Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *J Virol* 2003;77(24):13376-88.
53. Boisvert S, Marchand M, Laviolette F, Corbeil J. HIV-1 coreceptor usage prediction without multiple alignments: an application of string kernels. *Retrovirology* 2008;5(110).
54. Resch W, Hoffman N, Swanstrom R. Improved success of phenotype prediction of the human immunodeficiency virus type 1 from envelope variable loop 3 sequence using neural networks. *Virology* 2001;288(1):51-62.
55. Delobel P, Nugeyre MT, Cazabat M, Pasquier C, Marchou B, Massip P, *et al.* Population-based sequencing of the V3 region of env for predicting the coreceptor

- usage of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies. *J Clin Microbiol* 2007;45(5):1572-80.
56. Briggs DR, Tuttle DL, Sleasman JW, Goodenow MM. Envelope V3 amino acid sequence predicts HIV-1 phenotype (co-receptor usage and tropism for macrophages). *AIDS* 2000;14(18):2937-9.
57. Jensen MA, Li FS, van 't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, *et al.* Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *J Virol* 2003;77(24):13376-88.
58. Sing T, Low AJ, Beerenwinkel N, Sander O, Cheung PK, Domingues FS, *et al.* Predicting HIV coreceptor usage on the basis of genetic and clinical covariates. *Antiviral Therapy* 2007;12(1097):1106.
59. Xu S, Huang X, Xu H, Zhang C. Improved prediction of coreceptor usage and phenotype of HIV-1 based on combined features of V3 loop sequence using random forest. *J Microbiol* 2007;45(5):441-6.
60. Sander O, Sing T, Sommer I, Low AJ, Cheung PK, Harrigan PR, *et al.* Structural descriptors of gp120 V3 loop for the prediction of HIV-1 coreceptor usage. *PLoS Comput Biol* 2007;3(3):0555-64.
61. Low AJ, Dong W, Chan D, Sing T, Swanstrom R, Jensen M, *et al.* Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4 co-receptor usage in clinical isolates. *AIDS* 2007;21(14):F17-F24.
62. Mefford ME, Gorry PR, Kunstman K, Wolinsky SM, Gabuzda D. Bioinformatic prediction programs underestimate the frequency of CXCR4 usage by R5X4 HIV type 1 in brain and other tissues. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008;24(9):1215-20.
63. Garrido C, Roulet V, Chueca N, Poveda E, Aguilera A, Skrabal K, *et al.* Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *J Clin Microbiol* 2008;46(3):887-91.
64. Poveda E, Briz V, Roulet V, del Mar GM, Faudon JL, Skrabal K, *et al.* Correlation between a phenotypic assay and three bioinformatic tools for determining HIV co-receptor use. *AIDS* 2007;21(11):1487-90.
65. Saracino A, Monno L, Punzi G, Cibelli DC, Tartaglia A, Scudeller L, *et al.* HIV-1 biological phenotype and predicted coreceptor usage based on V3 loop sequence in paired PBMC and plasma samples. *Virus Res* 2007;130(1-2):34-42.
66. Sing T, Low AJ, Beerenwinkel N, Sander O, Cheung PK, Domingues FS, *et al.* Predicting HIV coreceptor usage on the basis of genetic and clinical covariates. *Antivir Ther* 2007;12(7):1097-106.
67. Poveda E, Seclén E, Del Mar González M, García F, Chueca N, Aguilera A, *et al.* Design and validation of new genotypic tools for easy and reliable estimation of HIV tropism before using CCR5 antagonists. *J Antimicrob Chemother* 2009;63(5):1006-10.
68. Recordon-Pinson P, Soulié C, Anies G, Flandre P, Descamps D, Cottalorda J, *et al.* Evaluation of the genotypic prediction of HIV-1 coreceptor tropism in a clinical setting. 17th International HIV drug resistance workshop 10-14 June 2008, Stiges, Spain. *Antivir Ther* 2008;13(Suppl 3):A113.
69. Swenson L, Dong W, Mo T, Woods C, Thielen A, Jensen M, *et al.* Quantification of HIV tropism by "deep" sequencing shows a broad distribution of prevalence of X4 variants in clinical samples that is associated with virological outcome. 16<sup>th</sup> conference on retroviruses and opportunistic infection 2009 Abstract. 2009.
70. Nansen A, Christensen JP, Andreassen SØ, Bartholdy C, Christensen JE, Thomsen AR. The role of CC chemokine receptor 5 in antiviral immunity. *Blood* 2002;99(4):1237-45.
71. Bogunia-Kubrik K, Jaskula E, Lange A. The presence of functional CCR5 and EBV reactivation after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:145-50.