

Mise au point d'une méthode de quantification de l'ARN plasmatisque spécifique des VIH-1 de groupe M

Albane Gicquel¹, Véronique Lemée², Marie Gueudin^{1,2}, Elodie Alessandri Gradt^{1,2}, Jean-Christophe Plantier^{1,2}, Alice Moisan^{1,2}

¹Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne (GRAM 2.0), Normandie Université, UNIROUEN, UNICAEN, ²Laboratoire de Virologie associé au CNR VIH, CHU de Rouen

Introduction :

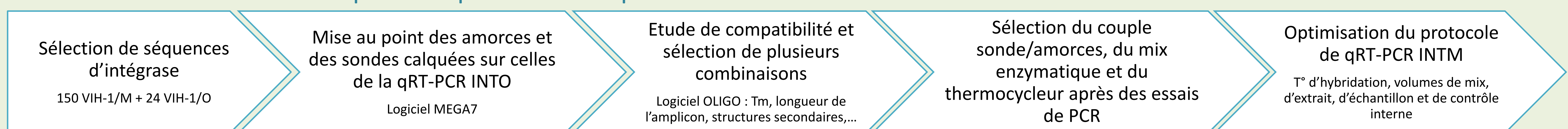
Les propriétés intrinsèques du VIH-1, comme son fort taux de réplication et la faible fidélité de sa transcriptase inverse, sont responsables de sa forte diversité génétique. Des phénomènes de recombinaison entre souches divergentes permettent la genèse de virus recombinants. Ainsi, la co-infection d'un même individu par des VIH-1 de groupe M (VIH-1/M) et de groupe O (VIH-1/O) peut générer des recombinants VIH-1/MO. A ce jour, 28 co-infections VIH-1/M+O et 23 formes recombinantes VIH-1/MO ont été répertoriées. La recombinaison, en fonction de sa localisation dans le génome, peut avoir un impact sur la quantification de l'ARN viral plasmatisque. Les trousse commerciales, utilisées dans le cadre du suivi de patients, sont des méthodes non spécifiques. Or, dans notre contexte d'infections atypiques (co-infection VIH-1/M+O et recombinants VIH-1/MO), une spécificité de groupes est recherchée, afin de distinguer les espèces virales répliquatives. Actuellement, plusieurs méthodes spécifiques sont utilisées au CNR de Rouen, dont la qRT-PCR ciblant la région de l'intégrase VIH-1/O et la qRT-PCR ciblant la région LTR VIH-1/M. La région des LTRs étant décrite comme un point chaud de recombinaison, l'utilisation de la qRT-PCR LTRM dans le contexte de la recombinaison n'est pas toujours appropriée.

Objectifs :

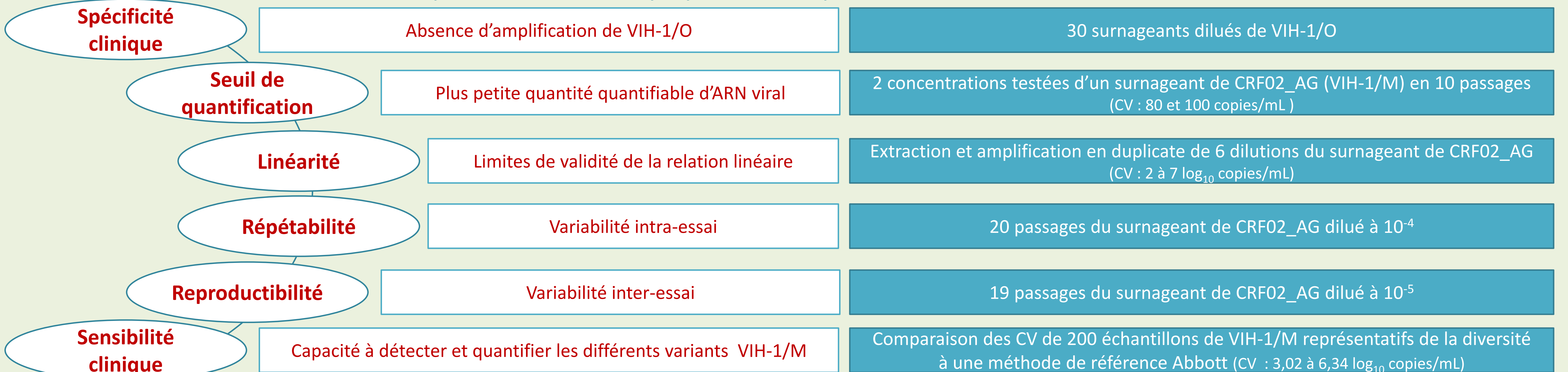
1. Mise au point d'une qRT-PCR spécifique des VIH-1 de groupe M ciblant le gène de l'intégrase
2. Evaluation de ses performances analytiques et cliniques

Matériels et méthodes :

Mise au point du protocole de qRT-PCR INTM



Evaluation des performances analytiques et cliniques de la méthode



CV = Charge virale

Résultats :

Protocole de qRT-PCR INTM retenu

- Méthode Taqman, 2 fluorochromes : Cy5 (CI) & FAM (cible)
- Extraction de l'ARN viral sur l'automate EZ-1 (Qiagen)
- Mix enzymatique : Superscript III RT, trousse RNA Ultrasense One-Step Quantitative RT-PCR system (Invitrogen)
- Thermocycleur : CFX96 (Bio Rad)
- Volumes :
 - extrait = 30µL
 - mix enz. = 20µL
 - CI = 2µL
 - échantillon = 200µL

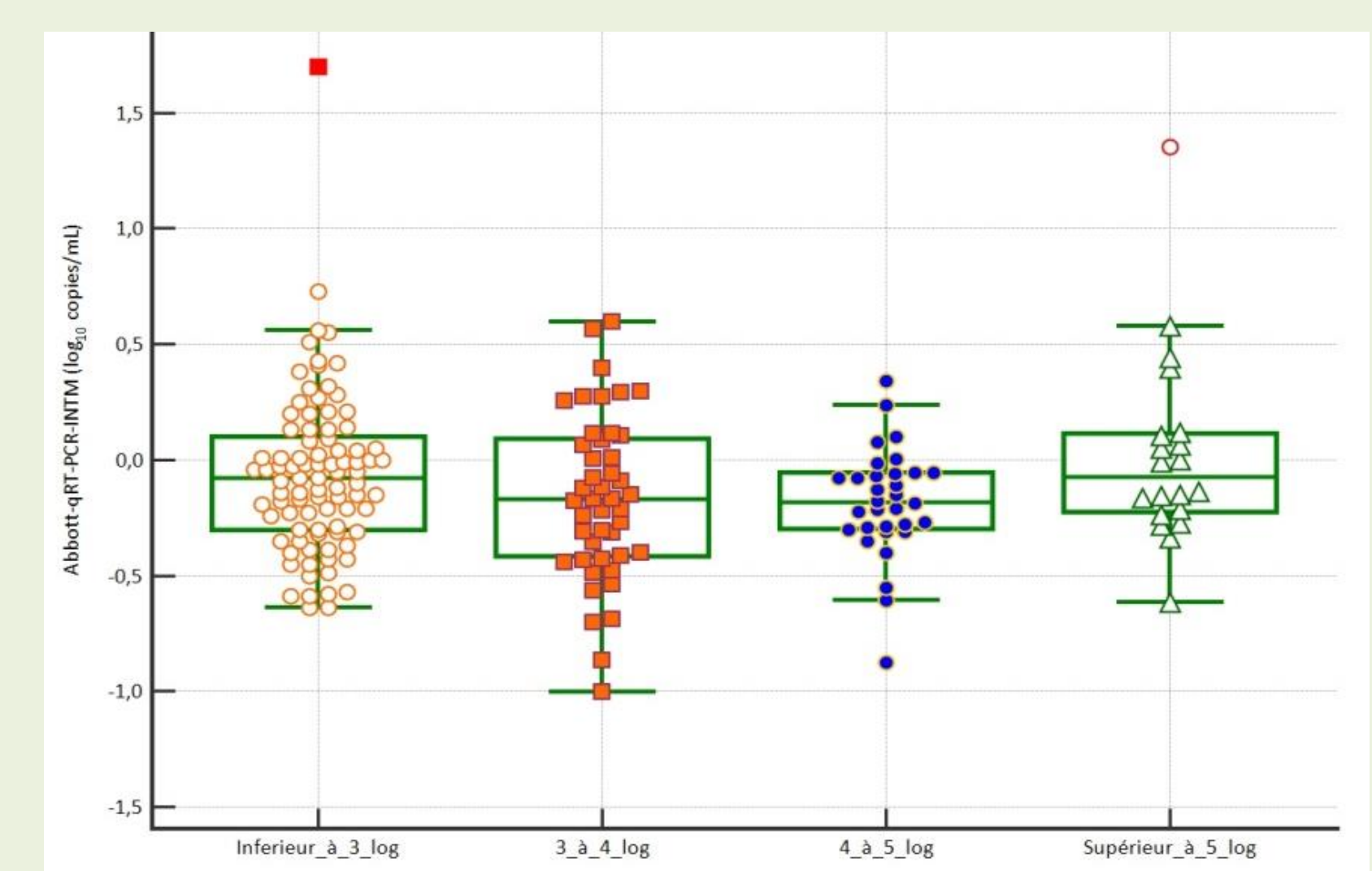
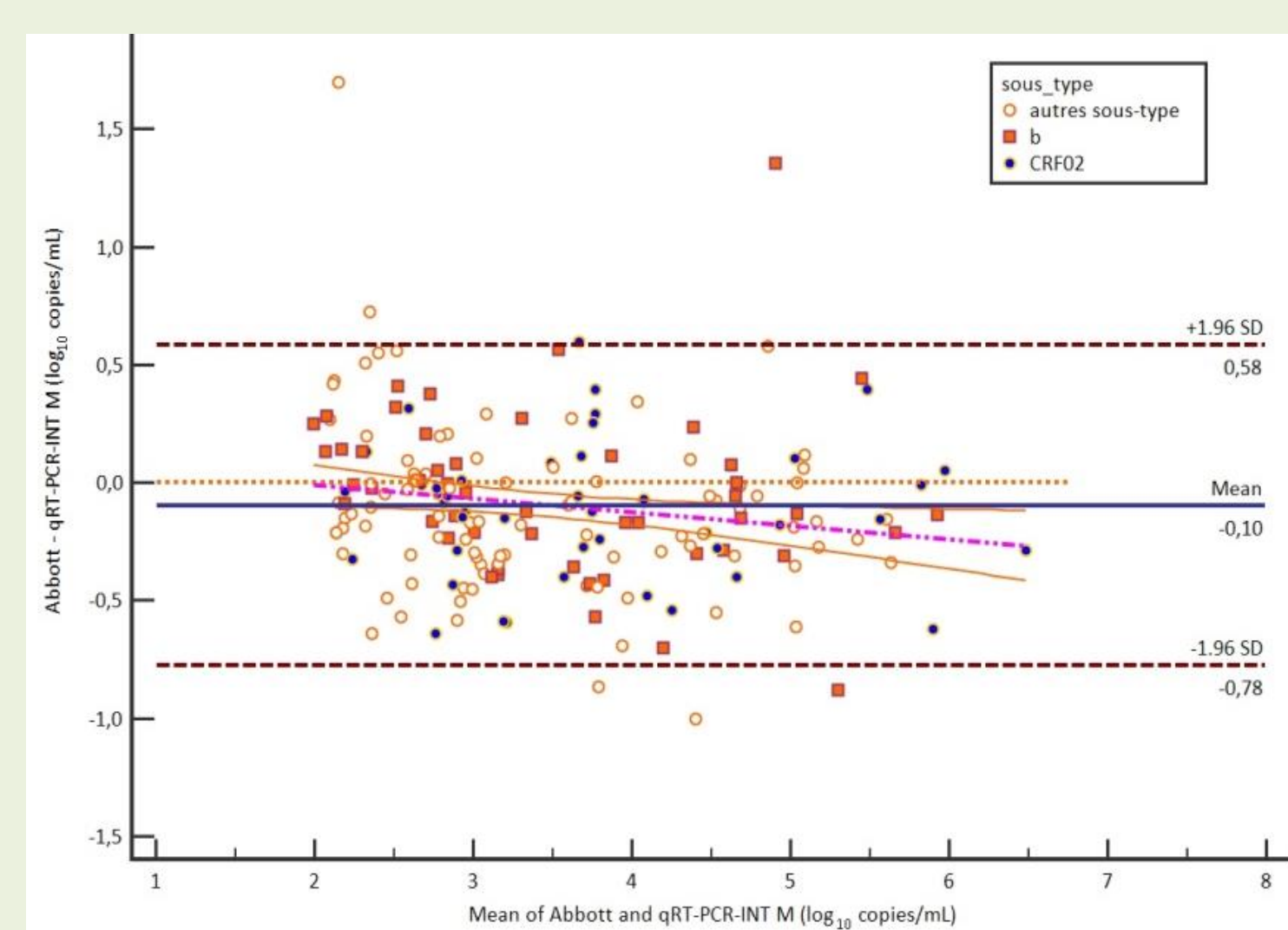
- Température d'hybridation : 60°C

Evaluation des performances analytiques

- Aucun surnageant de VIH-1/O n'a été amplifié, comme voulu
- Seuil de quantification : 100 copies/mL
- Linéarité : de 2 à 7 log₁₀ copies/mL.
- Répétabilité : écart type 0,042 log₁₀ copies/mL*
- Reproductibilité : 0,110 log₁₀ copies/mL*

*écart accepté < 0,25 log₁₀ copies/mL

Evaluation des performances cliniques



⇒ **13,9% de discordances entre la technique de référence Abbott et la qRT-PCR INTM mais bonne corrélation globale**

⇒ **Pas d'impact de la diversité**

⇒ Tendance légère pour la qRT-PCR INTM à une quantification supérieure pour les CV élevées et inférieure pour les CV basses

⇒ Plus grande dispersion des différences des faibles charges virales entre les 2 techniques.

Exploration des discordances par séquençage de la région de l'intégrase ⇒ pas de différence majeure de nucléotides entre les souches et les amorces et la sonde utilisées.

Conclusion :

- Nombreuses difficultés rencontrées lors de la conception des amorces et des sondes spécifiques de VIH-1 de groupe M, du fait d'une grande diversité intragroupe, d'une identité de séquence de 73% avec le VIH-1 de groupe O et du nombre élevé de personnes infectées par ce virus (> 36 millions à l'échelle mondiale). Néanmoins, notre méthode présente :

⇒ une bonne spécificité de groupes

⇒ un pourcentage de discordance proche des autres études de comparaison de méthodes de quantification du VIH-1

⇒ une bonne corrélation avec la technique de référence non spécifique de groupes Abbott

- Seuil de quantification élevé (100 copies/mL) comparé à celui des techniques commerciales (≈ 20-40 copies/mL) et à celui fixé comme objectif à atteindre sous traitement antirétroviral par la European AIDS Clinical Society (50 copies/mL).

⇒ elle reste donc à améliorer afin de détecter les échecs virologiques précoces

Perspectives :

Quantifier avec cette méthode des échantillons de patients co-infectés pour mieux comprendre : - la co-évolution répliquative de ces espèces - la physiopathologie de ces co-infections

Nous tenons à remercier toute l'équipe du laboratoire de Virologie du CHU de Rouen.

Mots clés : VIH – Co-infection – Recombinaison inter-groupes M et O – Quantification (qRT-PCR)