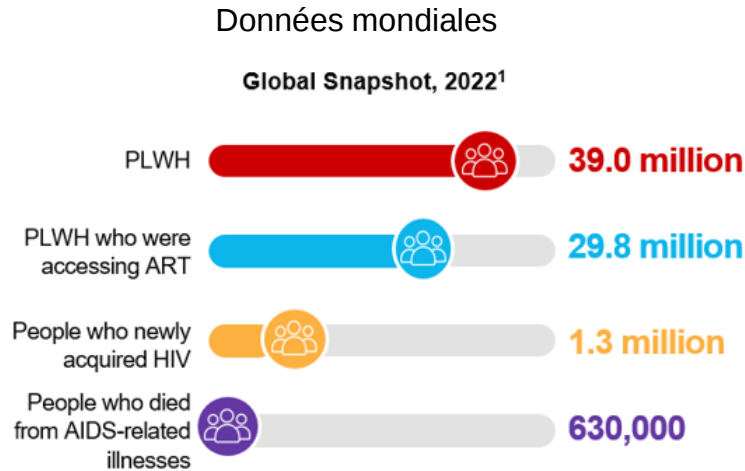


Infection chronique et résistance aux antiviraux : exemple du VIH

E André- Garnier
Laboratoire de Virologie
CHU Hôtel Dieu
elisabeth.andre@chu-nantes.fr

Contexte de l'infection VIH

- Infection chronique évoluant en l'absence de traitement au stade SIDA $<200 \text{ CD4 mm}^3$
- Un problème majeur de santé publique



En France ^{2,3}

180 000 personnes vivent avec le VIH

Jusqu'en 2019 : environ **6 000** nouveaux cas étaient diagnostiqués par an

20% des patients ignorent leur séropositivité

- Des populations plus exposées (HSH, patient(e)s Hétérosexuel(le)s nés à l'étranger)
- Des régions à plus forte prévalence (DROM, IDF)
- Des traitements efficaces → contrôle de l'infection

VIH et traitement

Mourir



1980-90

1^{ère} révolution

Survivre



- VOILÀ CE QU'UN MALADE DU SIDA DOIT AVALER CHAQUE SEMAINE,
- SANS GUERIR POUR AUTANT

1996

2^{ème} révolution

Vivre



**SANS GUERIR MAIS POUVANT
VIVRE NORMALEMENT**



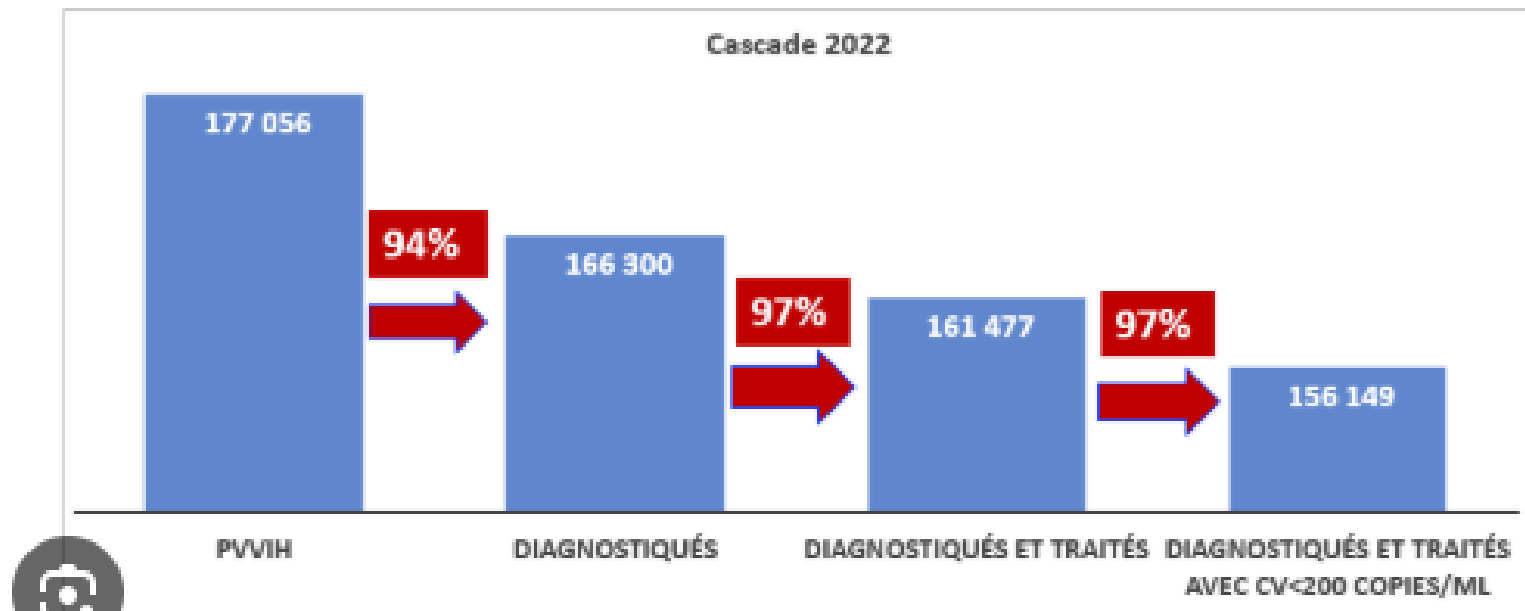
2015

Cascade de la prise en charge en France en 2022

- la “cascade de soins” vise à obtenir 95% des personnes infectées par le VIH connaissant leur statut, 95% des personnes diagnostiquées sous ARV, et 95% des personnes sous ARV connaissant le succès thérapeutique.

CASCADE 2022 en France

- En 2022, **88%** des PVVIH ont une CV<200 copies/mL (Obj 95-95-95 => 86% avec CV <200 copies/mL)



La variabilité du VIH à l'échelle mondiale

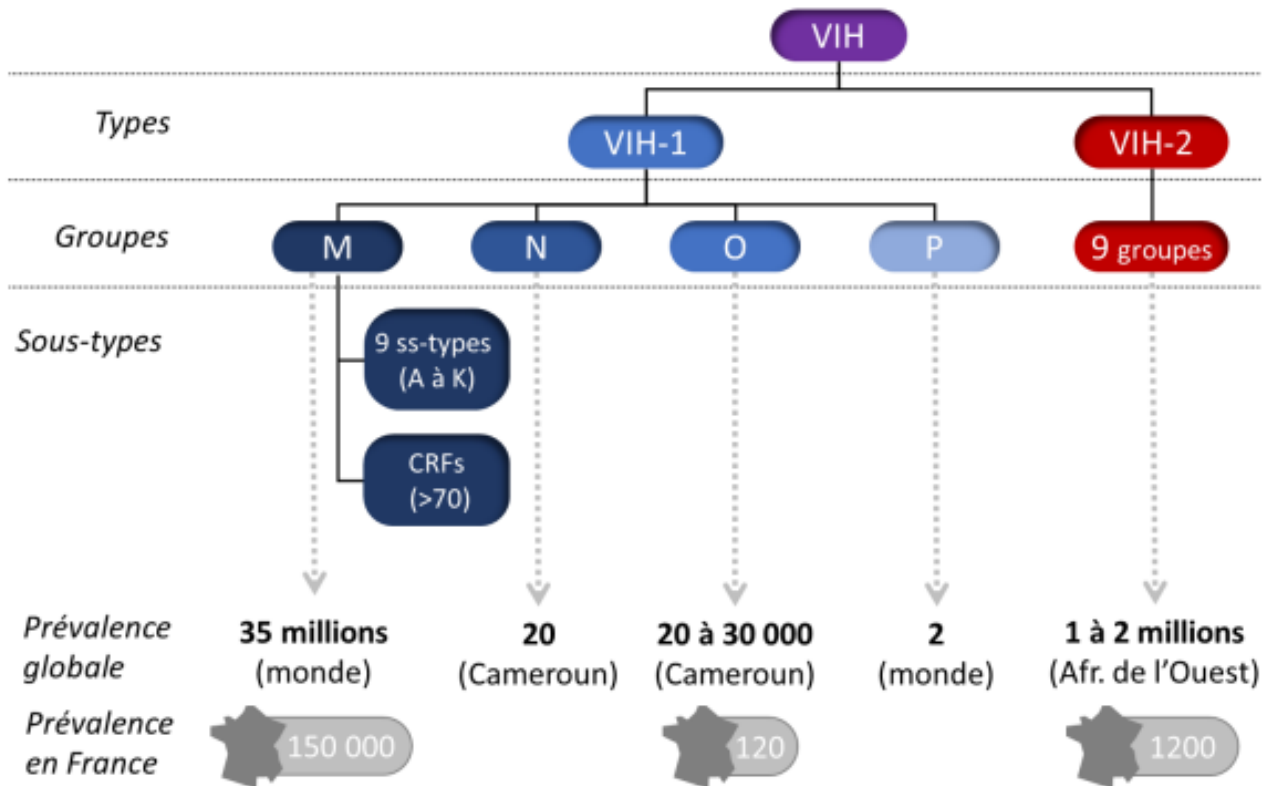


Figure 2. Classification des virus VIH et prévalence respective.

Source : Dr Benoît Visseaux

Rappel sur les ARVs

Introduction sur les ARVs

- Passage d'une infection inévitablement mortelle à **une infection chronique** (intégration du génome virale dans le génome de l'hôte = réservoir)
- Aucun traitement ne permet de guérir de l'infection à ce jour : Les Anti rétroviraux sont virostatiques
- Effets secondaires court et long terme ➔ vers des stratégies d'allègement
- Emergence possible de résistances virales au traitement

Prévention thérapeutique

- toujours pas de vaccin
- Positionnement du traitement en pré-exposition chez les patients très exposés à un risque de contamination (Prep)=> Truvada® (Ténofovir disoproxil + emtricitabine) , en monothérapie tous les jours

Indications de la mise sous ARVs

- «Toute personne infectée par le VIH devrait commencer le traitement ARV le plus tôt possible» (quelque soit son taux de LT CD4+)
- **A titre individuel**
 - Objectif principal du traitement ARV :
=> Empêcher la progression vers le sida en maintenant ou en restaurant un nombre de CD4 > 500/mm³
 - Rendre la CV plasmatique indétectable (< 50 cp/ml), ce qui maximalise la restauration immunitaire et minimalise le risque de sélection de virus résistants.
 - Si l'efficacité immunovirologique est l'objectif principal du traitement ARV, d'autres objectifs doivent être recherchés simultanément :
 - Meilleure tolérance possible, clinique et biologique, à court, moyen et long termes,
 - Amélioration ou préservation de la qualité de vie
 - Réduction de la transmission du VIH
- **Perspective de prévention collective**
 - Données nouvelles suggèrent que le traitement ARV pourrait constituer un outil performant de ↘ risque de transmission du VIH
 - Etudes observationnelles : ↘ risque de transmission sexuelle du VIH chez les patients sous traitement ARV
 - Etude longitudinale au sein d'une cohorte de couples séro-différents en Afrique : 92% d'efficacité protectrice du traitement ARV du partenaire infecté vis-a-vis du partenaire non infecté (IC 95 % 43 % – 99,8 %)
 - Souhait de ↘ risque de transmission sexuelle du VIH peut donc désormais constituer un argument recevable pour l'initiation d'un traitement ARV.

=Traitement à vie

Cibles thérapeutiques

1ere intention : molécules les plus utilisées

- Les enzymes virales

- ☐ la Réverse transcriptase ou Transcriptase Inverse (1987 pour les INTI et 1996 pour les INNTI)
- ☐ la Protéase (1996)
- ☐ l'Intégrase (2007)

Situation de multi échecs thérapeutiques : rarement utilisées

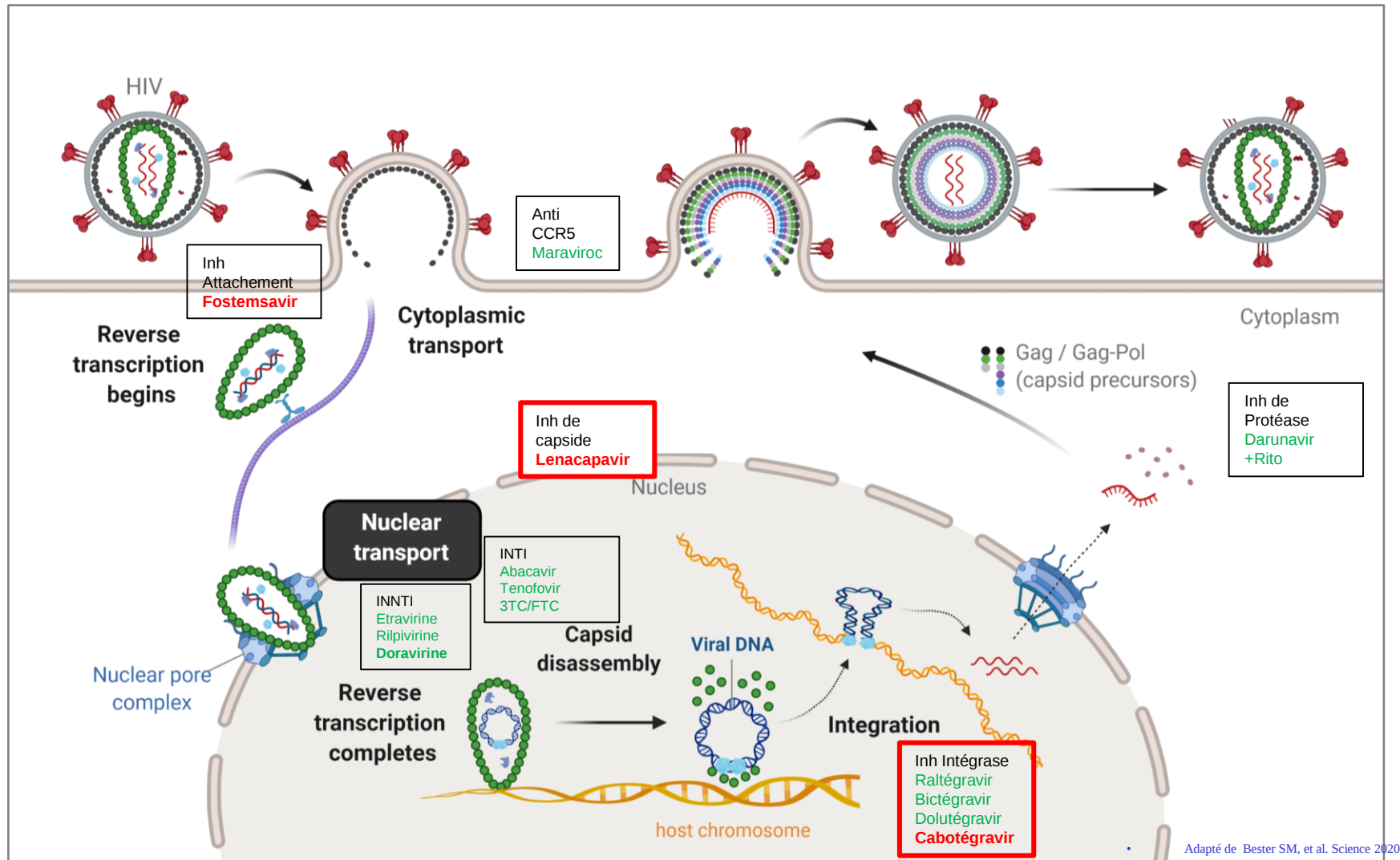
- L'entrée du virus

- ☐ un Inhibiteur de co-récepteur Anti-CCR5 (2010)
- ☐ un inhibiteur d'attachement (2023)

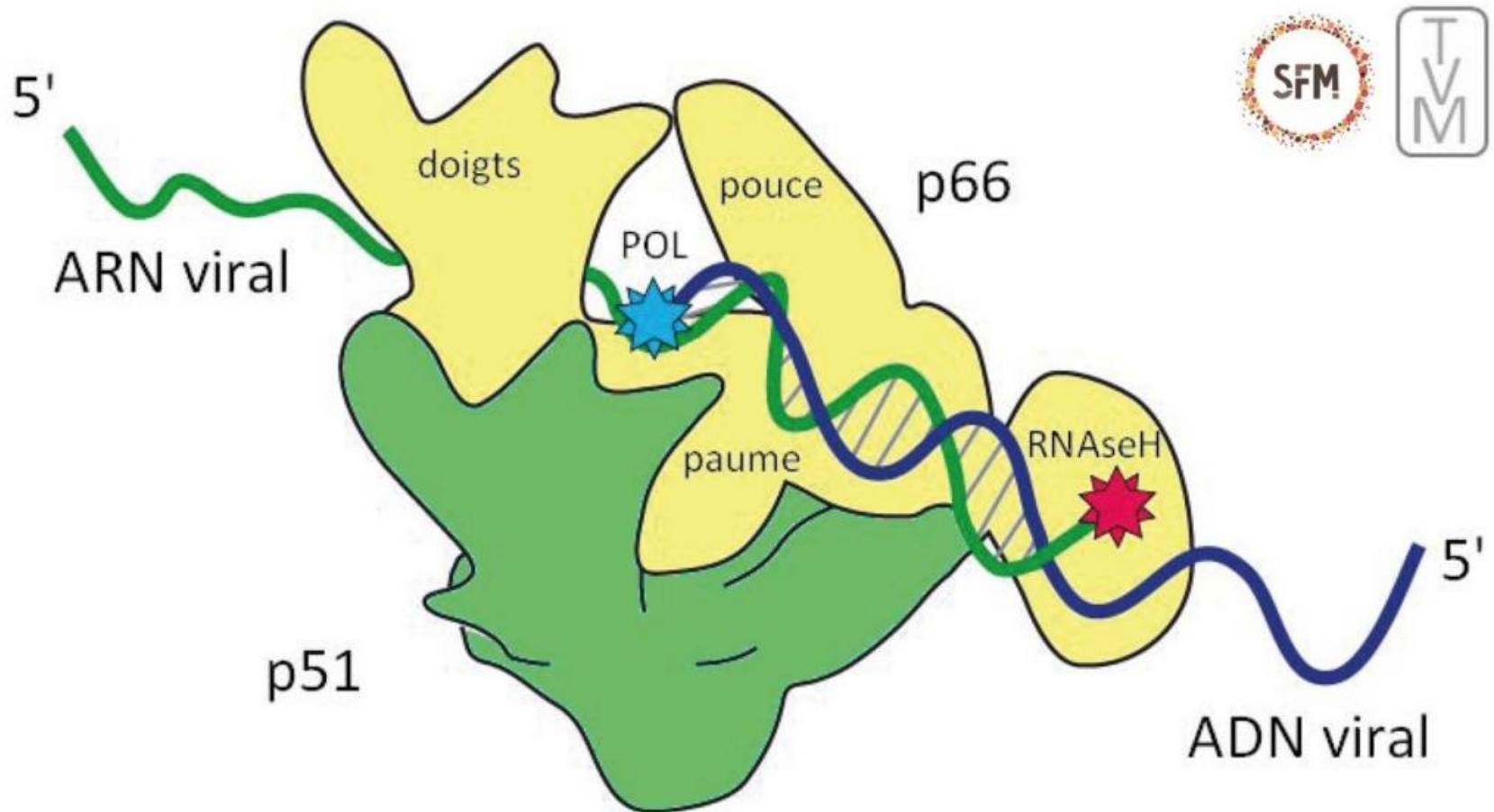
- La maturation des particules virales

- ☐ un inhibiteur de capsid (2024)

Cycle de multiplication du VIH et Cibles thérapeutiques



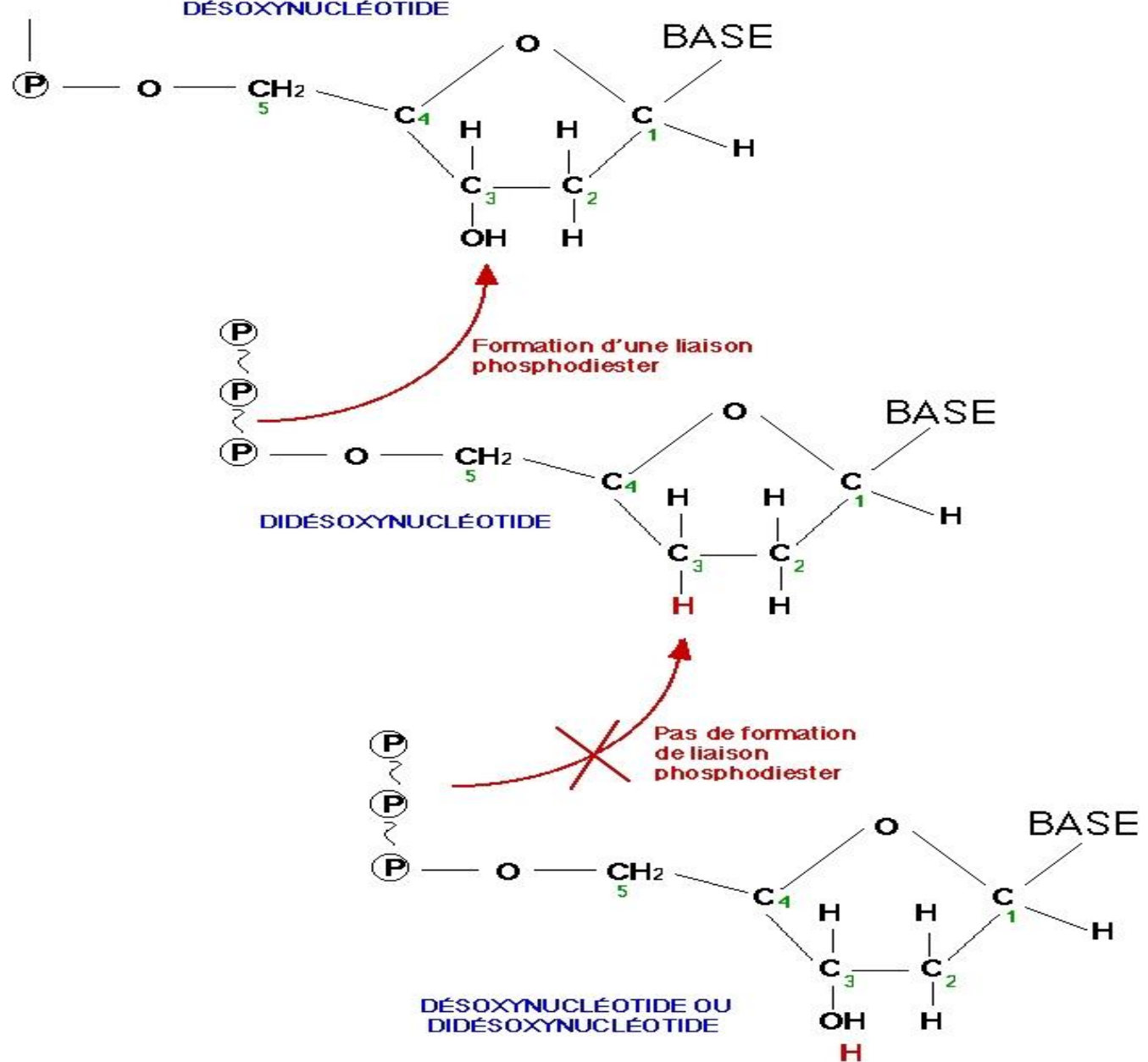
Structure de la Transcriptase inverse (reverse transcriptase RT)



Les inhibiteurs de la réverse transcriptase (RT)

- Inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidique: INTI (1987)
 - terminateurs de chaînes dépourvus de groupement OH 3'
 - inhibition de la synthèse de l'ADNc par compétition avec nucléotides naturels
 - étape de phosphorylation intra-cellulaire
 - +ou – inhibiteur de l'ADN polymérase cellulaire pour les 1ers commercialisés: toxicité mitochondriale
 - Myopathie
 - Lipoatrophie
 - Neuropathies périphériques
 - Pancréatites

➔ Diminution +++ de la toxicité mitochondriale avec les dernières molécules Abacavir, Tenofovir et 3TC/FTC



Mécanisme d'action des INTI

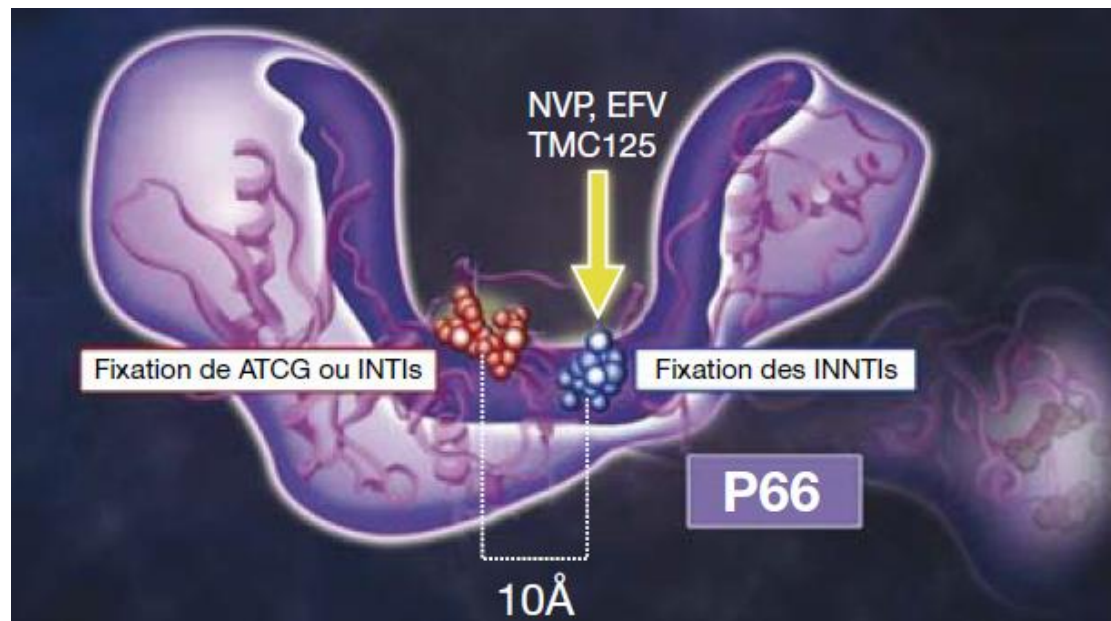
Comprimés d'INTI

- 1 INTI formes génériques
 - Lamivudine 3TC (Epivir®)
 - Abacavir ABC (Ziagen®)
 - Tenofovir TDF (Viread®) VIH et VHB
 - Combinaison de 2 INTI
 - Lamivudine 3TC et Abacavir ABC (Kivexa®)
 - Emtricitabine FTC et Tenofovir TDF (Truvada®)
- ➔ Jamais utilisés seuls sauf pour la combinaison TDF/FTC dans la PreP (prévention du VIH)
- En combinaison en trithérapie avec un ARV d'une autre classe

Inhibiteurs Non-Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INNTI) 1996

INNTI : Structures chimiques très diverses

Inhibiteurs **non compétitifs** : fixation dans une poche hydrophobe située à 10 Å du site catalytique de la TI du VIH-1 (= **mécanisme allostérique**) · **perturbation du site catalytique de la TI**



Hautement sélectifs du **VIH-1**

DCI des INNTI commercialisés en formulation individuelle

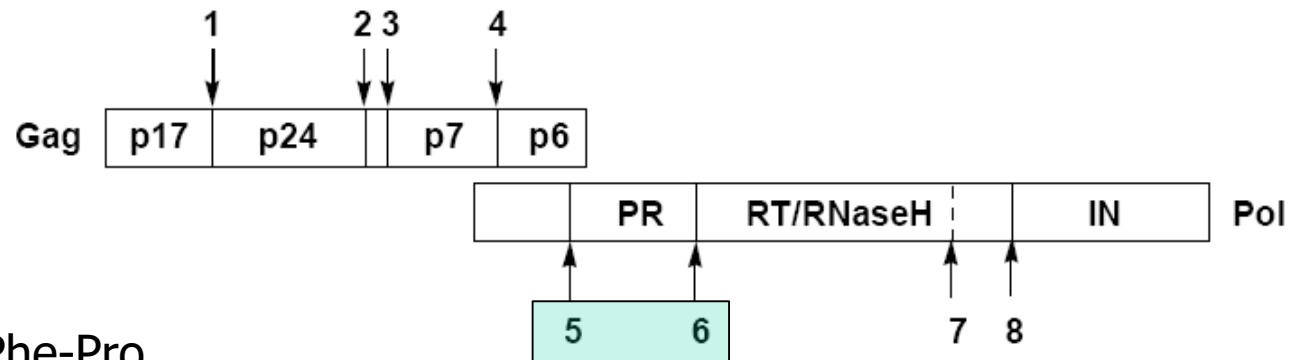
<i>Névirapine</i>	<i>NVP</i>	<i>Viramune</i> ®
<i>Efavirenz</i>	<i>EFV</i>	<i>Sustiva</i> ®
Etravirine	ETV	Intelence ®
Rilpivirine	RPV	Edurant ®
Doravirine	DRV	Pifeltro ®

1ère génération
utilisation peu
fréquente

2ème génération
présente dans les
associations

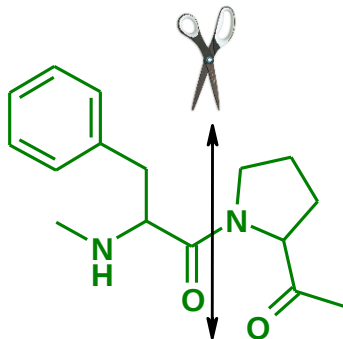
Inhibiteurs de protéase (IP) 1996

Protéase du VIH : Rôle central dans le cycle viral : **intervient dans la dernière étape de la réplication virale** - Réalise le **clivage protéolytique** des polyprotéines précurseurs (Gag et Pol) en protéines structurales et enzymatiques nécessaires à la formation de nouveaux virions



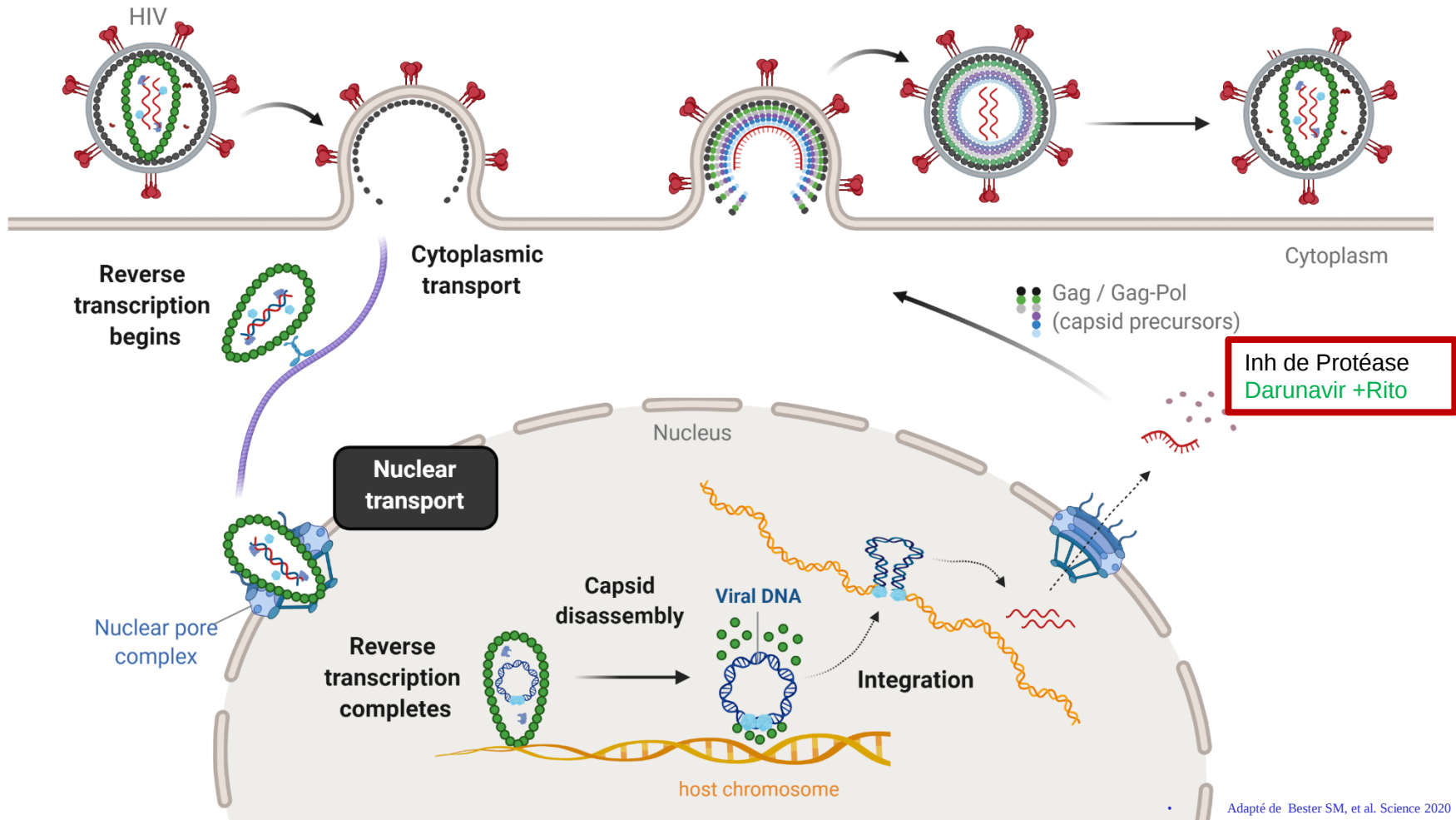
Clivage spécifique : Phe-Pro

(non rencontré chez protéases de mammifères : rénine, pepsine ou cathepsine)



Site	Sequence
1	-Ser-Gln-Asn-Tyr Pro-Ile-Val-Gln-
2	-Ala-Arg-Val-Leu Ala-Glu-Ala-Met-
3	-Ala-Thr-Ile-Met Met-Gln-Arg-Gly-
4	-Pro-Gly-Asn-Phe Leu-Gln-Ser-Arg-
5	-Ser-Phe-Asn-Phe Pro-Gln-Ile-Thr-
6	-Thr-Leu-Asn-Phe Pro-Ile-Ser-Pro-
7	-Ala-Glu-Thr-Tyr Phe-Val-Asp-Gly-
8	-Arg-Lys-Ile-Leu Phe-Leu-Asp-Gly-

Inhibiteurs de protéase (IP)

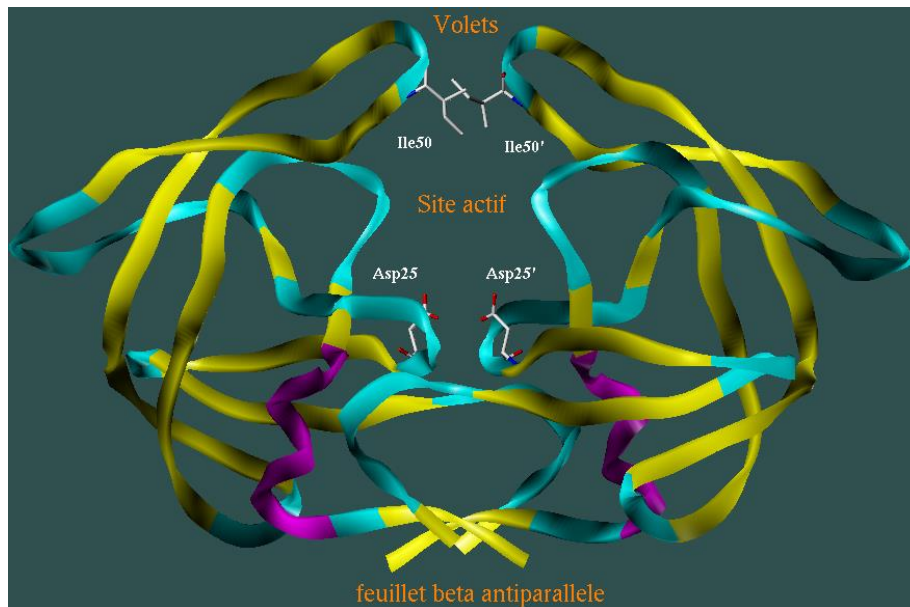


Les inhibiteurs de la protéase

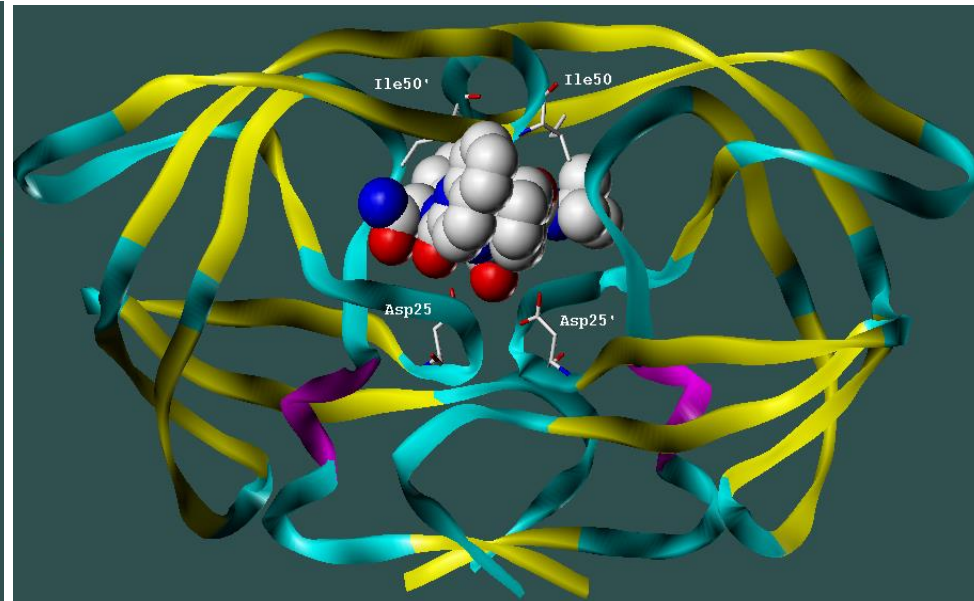
- Blocage de la phase tardive : clivage des protéines codées par gag et pol étape de maturation indispensable
- Métabolisés par le Cyto P450
 - Interactions médicamenteuses
 - Redistribution des graisses, troubles de la glycorégulation, hyperlipidémies
- 7 molécules commercialisées :
 - Molécules peptidomimétiques
 - dernière génération : amélioration de la tolérance, diminution nombre de prise
 - combinaison avec le Ritonavir RTV (Boost) : amélioration de la pharmacologie

La protéase

Conformation ouverte
(absence substrat)



Conformation fermée
(présence substrats protéiques ou
inhibiteurs peptidomimétiques)



Les inhibiteurs de la protéase

association avec ritonavir faible dose ↑ les concentrations

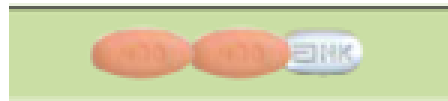
Atazanavir Reyataz ®



2ème génération

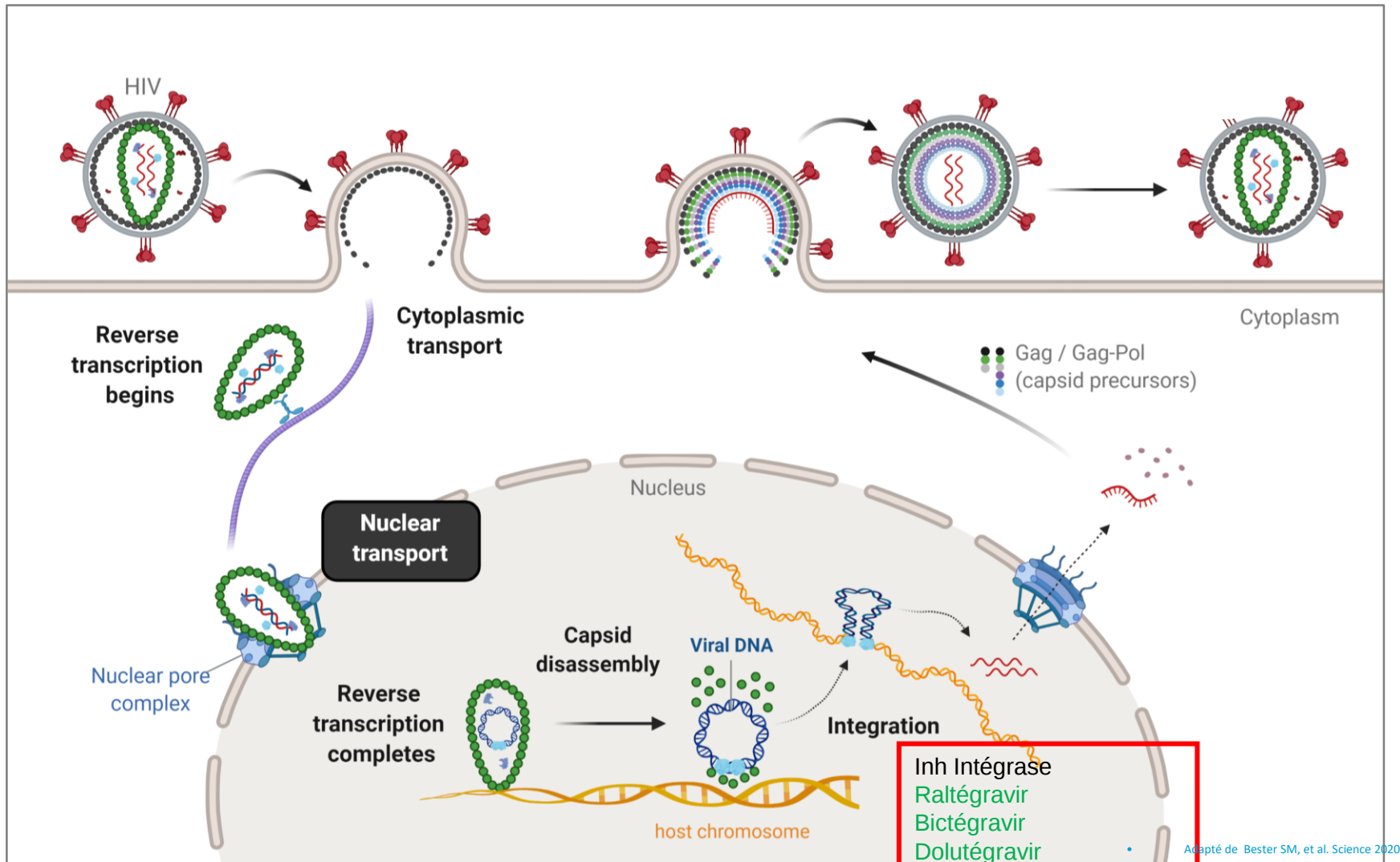
Darunavir

Prézista ®

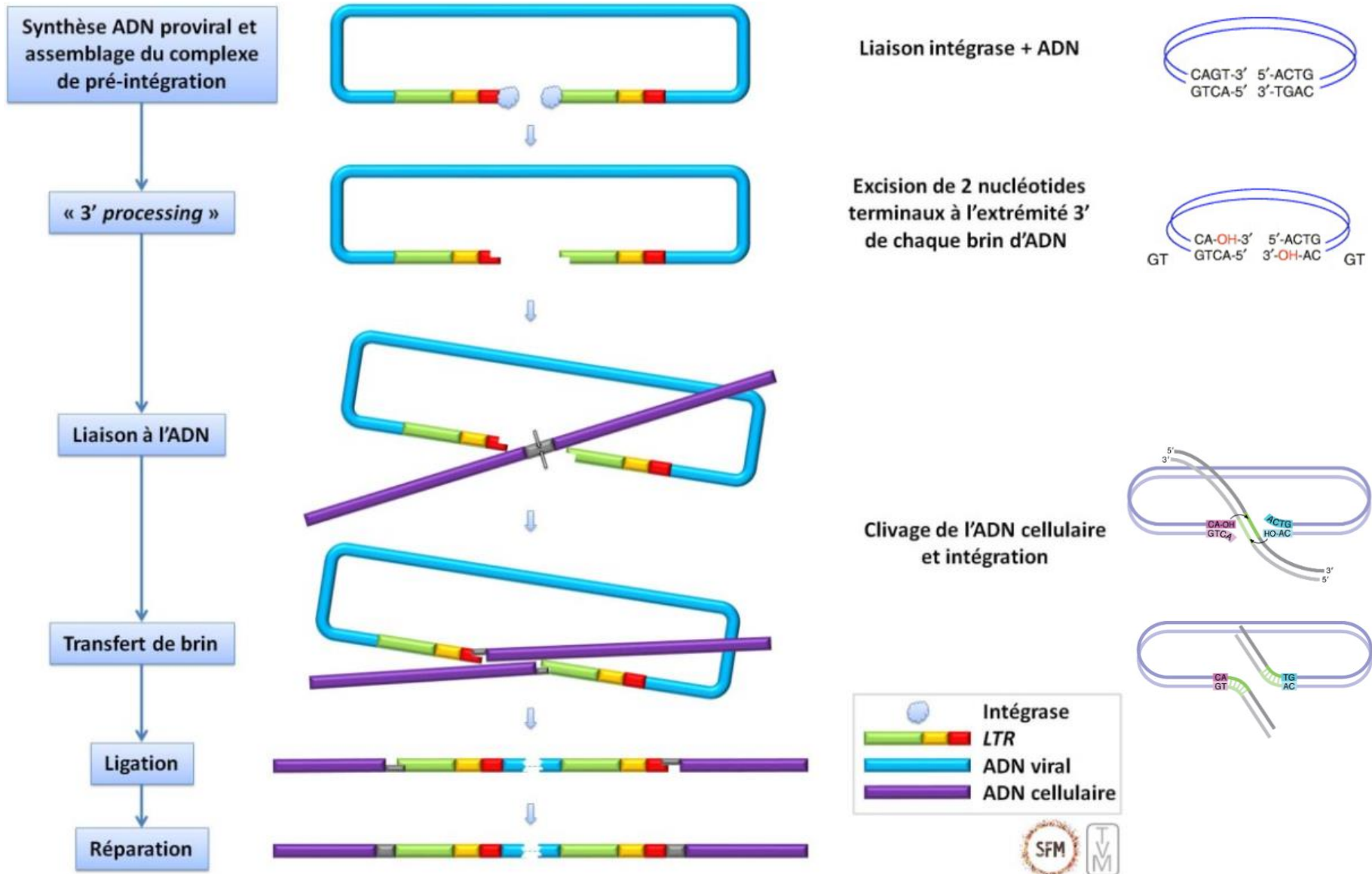


+Ritonavir

Les inhibiteurs d'intégrase



Différentes étapes de l'intégration du génome VIH



Les inhibiteurs d'intégrase de première génération

- Raltégravir (RAL) Isentress® (2011)
 - VO 400 mg 2fs/jour
 - Pas de signes particuliers d'intolérance clinique ou biologique
 - Décroissance rapide de la Charge Virales
 - Moins d'interactions médicamenteuses/ Inhibiteurs de Protéase
- Elvitégravir (EVG) (2014)
 - Doit être boostée
 - Résistance croisée avec le raltégravir
 - ➔ Supplanté par le Bictégravir

Les inhibiteurs d'intégrases de 2^{ème} génération

- Caractéristiques communes
 - Bonne tolérance
 - Barrière génétique élevée
- Dolutégravir (DTG)TIVICAY®
 - 1comprimé 50mg /jour
 - Utilisation en combinaison en comprimé unique
 - Trithérapie : Dolutégravir-Kivexa-lamivudine (Triumeq ®)
 - Bithérapie: Dolutégravir-Lamivudine (Dovato®)
- Bictégravir (BIC)
 - Utilisation en combinaison en comprimé unique 1/jour
 - Bictégravir-Tenofovir Alafénamide –Emtricitabine (Biktarvy ®)
- Cabotégravir(CAB) Vocabria ®
 - 1ère INI utilisable en injectable en combinaison avec la Rilpivirine Rékamby

Inhibiteurs d'intégrase

RAL	ISENTRESS® raltegravir MSD		1 comprimé (400 mg), 2 fois/jour	 	à prendre au cours ou en dehors des repas
	TIVICAY® dolutégravir VIIV HEALTHCARE		selon le profil viral 1 comprimé (50 mg), 1 fois/jour ou 1 comprimé 2 fois/jour	  	à prendre de préférence au cours d'un repas à prendre au cours des repas
ABC+3TC+DTG	TRIUMEQ® abacavir + lamivudine + dolutégravir VIIV HEALTHCARE		1 comprimé (600 mg abacavir + 300mg lamivudine + 50 mg dolutégravir) 1 fois/jour		à prendre de préférence au cours des repas
BIC + FTC + TAF	BICTÉGRAVIR + EMTRICITABINE + TÉNOFOVIR ALAFÉNAMIDE				
	BIKTARVY® GILEAD	1 comprimé (50 mg bictégravir + 200 mg emtricitabine + 25 mg ténofovir alafénamide) 1 fois/jour		 toutes les 24h	à prendre au cours ou en dehors d'un repas

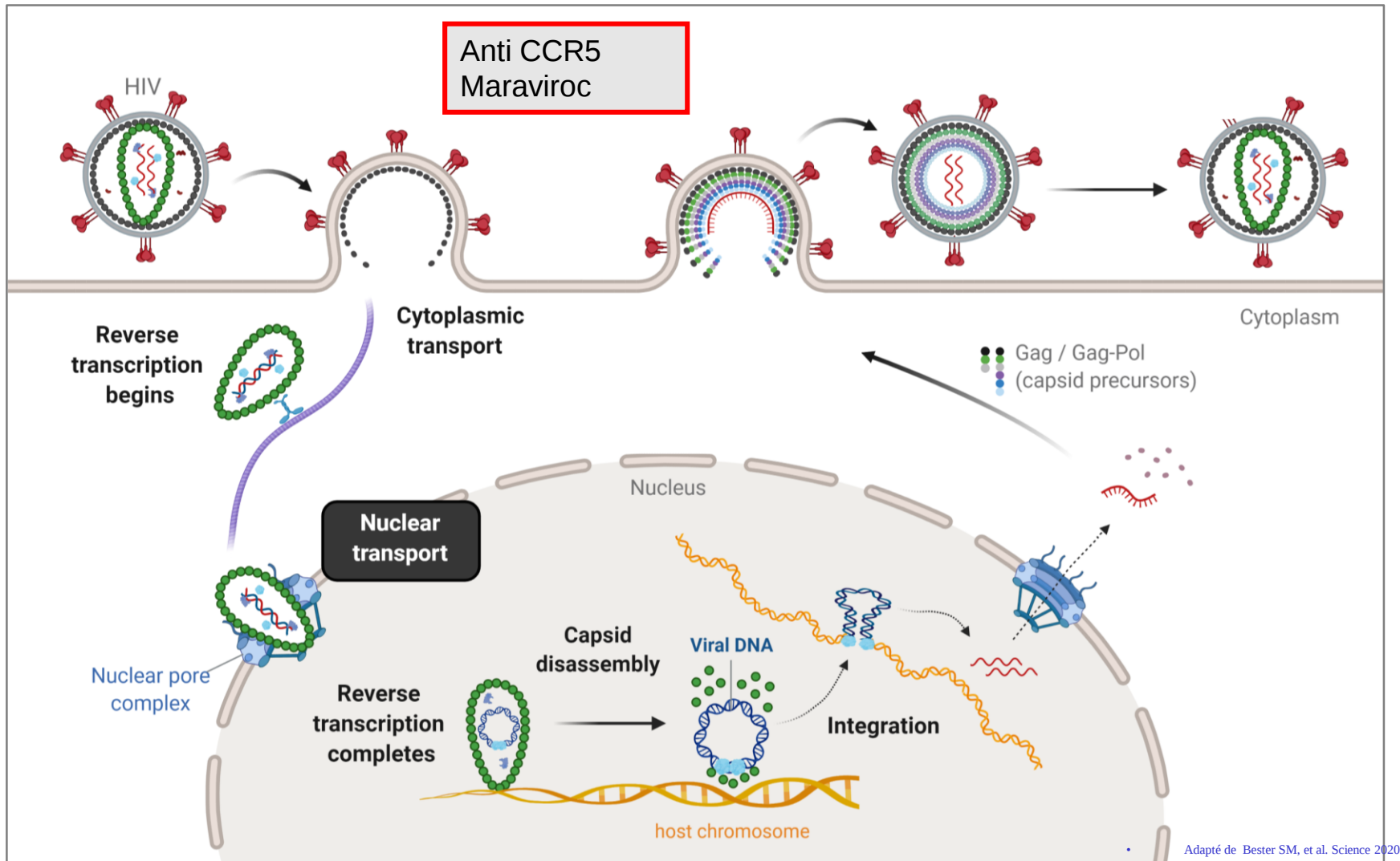
DOVATO
Dolutégravir 50 mg
Lamivudine 300 mg

1 
1x/jour
50 

CBG + RPV	VOCABRIA® VIIV HEALTHCARE + REKAMBYS® JANSSEN	Instauration orale optionnelle : 1 comprimé de cabotégravir (30 mg) pendant 1 mois en association avec, 1 comprimé de rilpivirine (25 mg), 1 fois/jour pendant 1 mois.	  toutes les 24h	à prendre au cours d'un repas
		Injectons d'initiation aux mois 1 et 2 : une injection de 600 mg (3mL) de cabotégravir en association avec une injection de 900 mg (3mL) de rilpivirine.		bien suivre les recommandations
		A partir du mois 4, injection tous les 2 mois : une injection de 600 mg (3mL) de cabotégravir en association avec une injection de 900 mg (3mL) de rilpivirine.		

Les ARVs utilisés chez les patients en multi échecs

L'antagoniste CCR5



Antagonistes du CCR5 : Mécanisme d'action

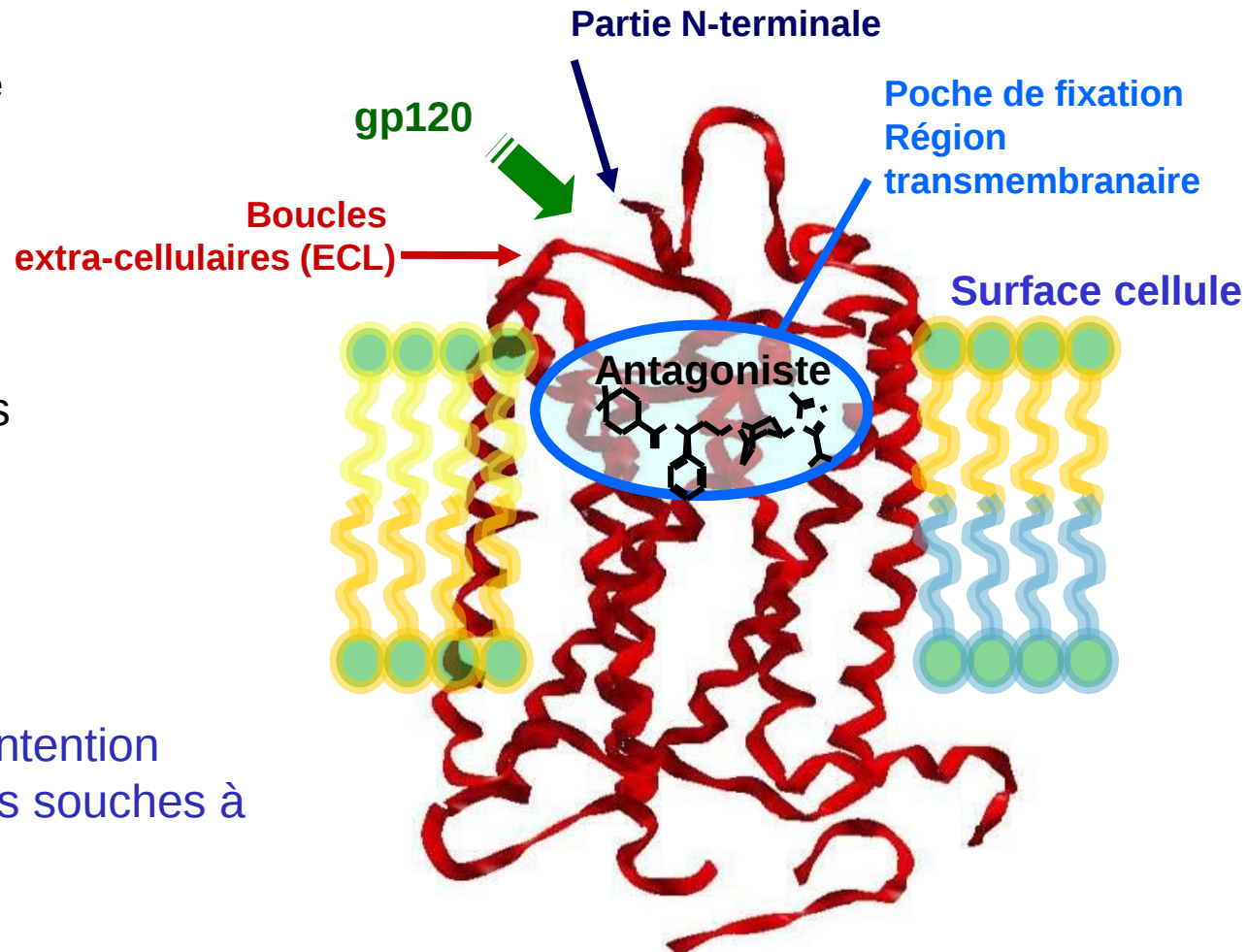
➤ Anti CCR5 : Maraviroc (MVC) Celsentri ®



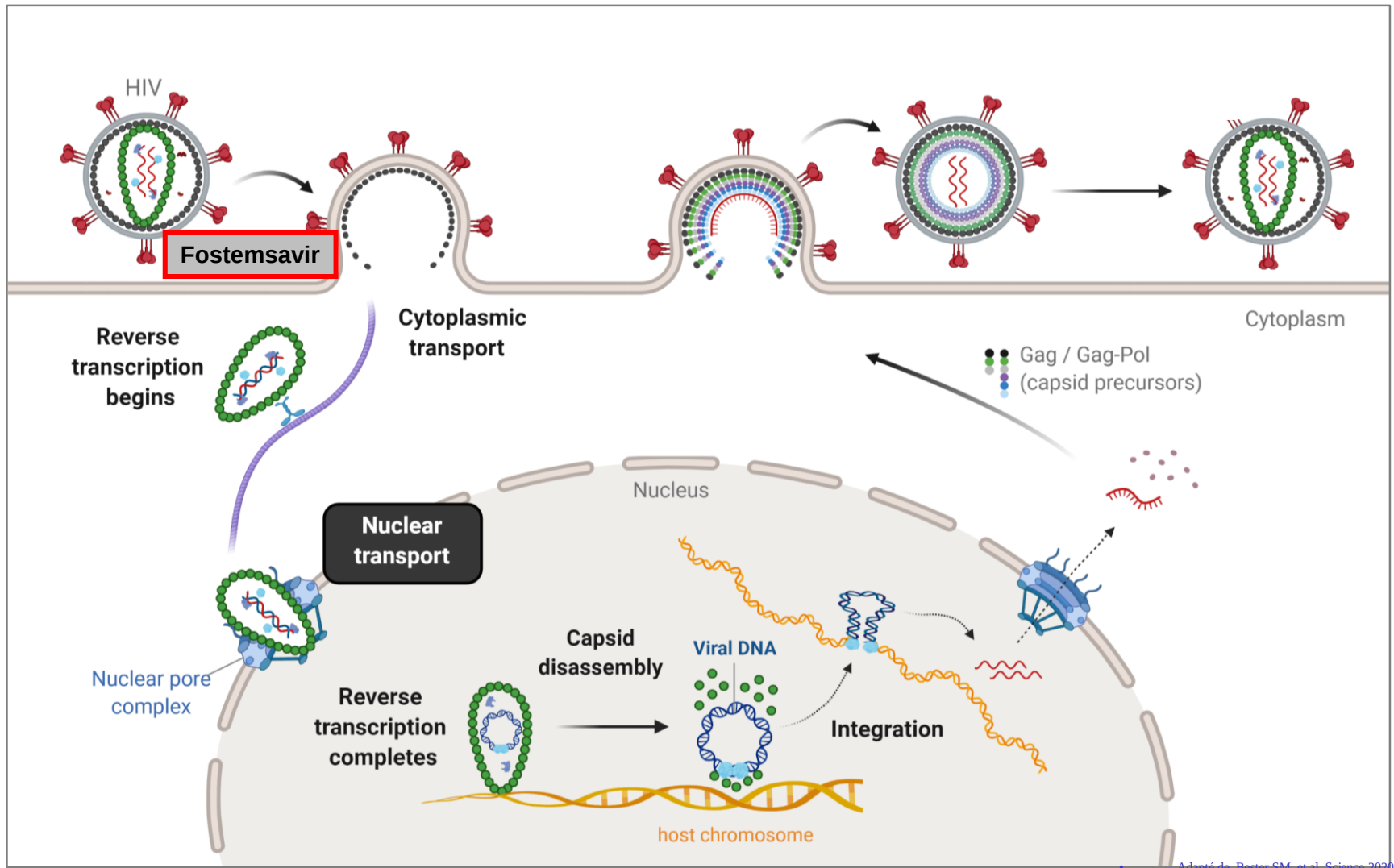
Fixation de l'antagoniste dans la région transmembranaire

➔ Modification conformationnelle de la partie N-terminale et des boucles extracellulaires du CCR5 gênant la fixation de la gp 120

- ⇒ Ttt non utilisé en 1ère intention
- ⇒ Actif uniquement sur les souches à tropisme CCR5



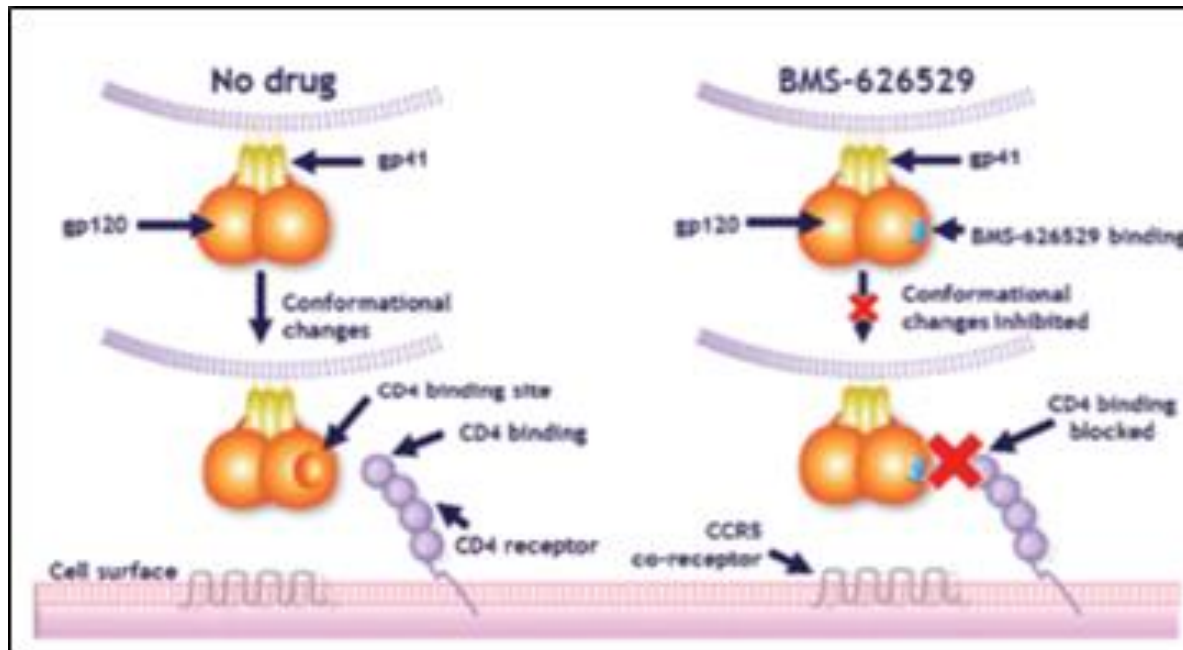
L'inhibiteur d'attachement



Inhibiteur d'attachement

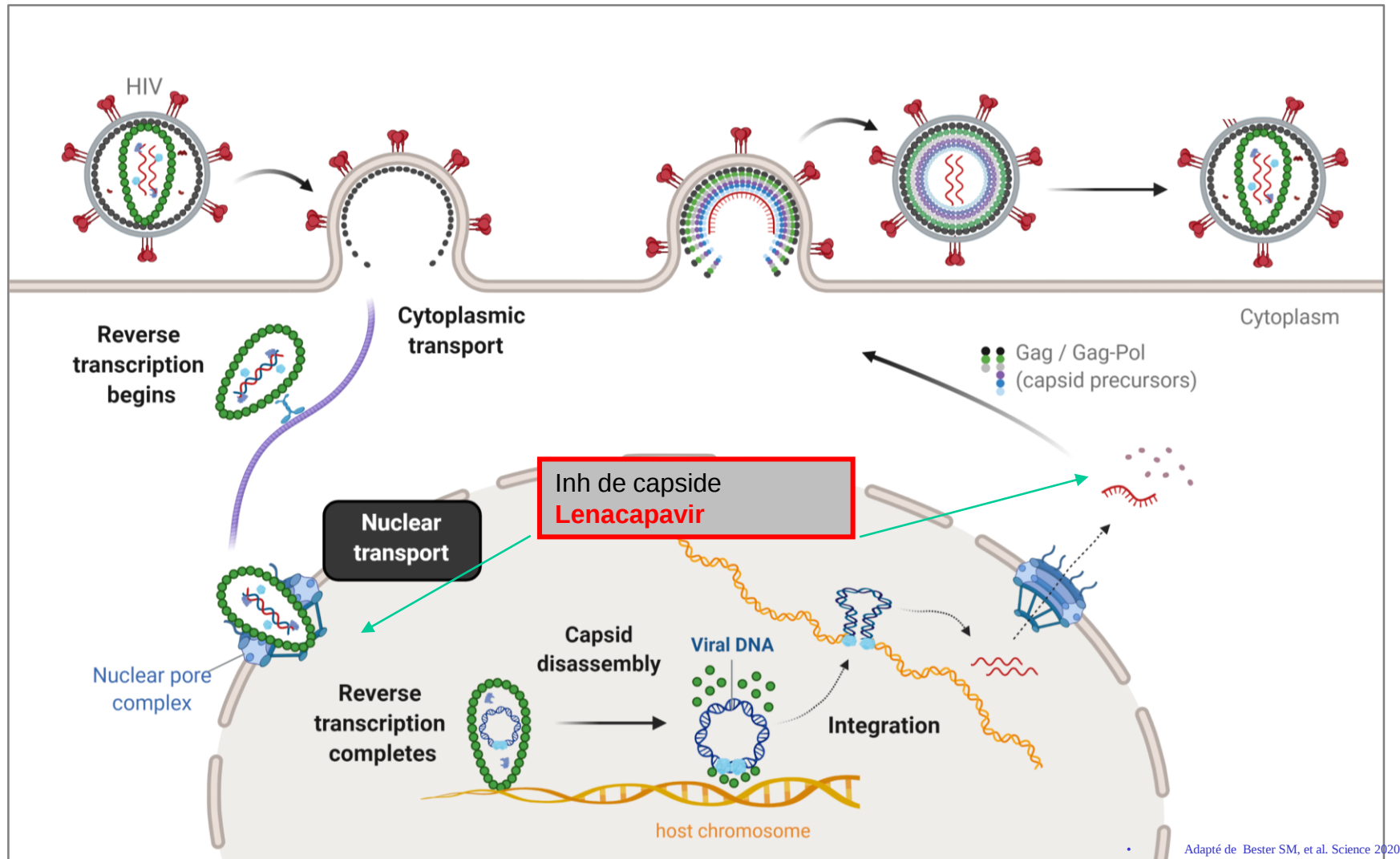
Fostemsavir (Rukobia®) 2023

Pro drogue d'un nouvel inhibiteur d'attachement au récepteur CD4 qui se fixe directement à la gp120 bloquant son changement de conformation



Indications limitées aux patients en impasse thérapeutique pour multi échec

L'inhibiteur de capside

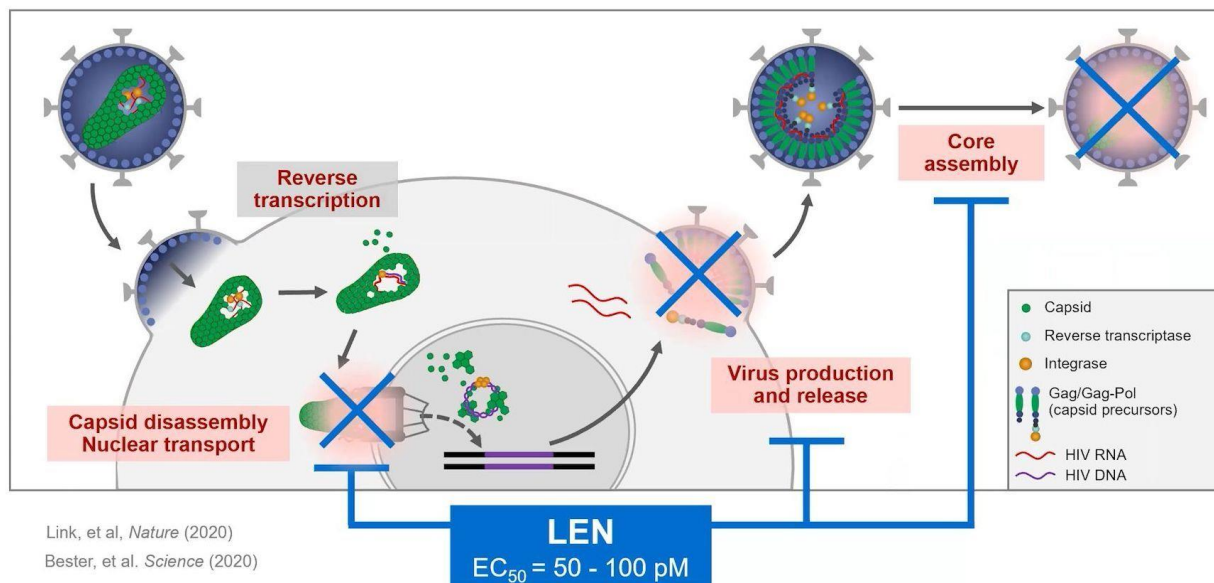


Inhibiteur de capside

Lénacapavir (2023) SUNLECA®

: action à différentes étapes de la multiplication virale

Capsid is Critical at Multiple Stages of HIV Replication Cycle



22

-Indications limitées aux patients en impasse thérapeutique pour multi échecs



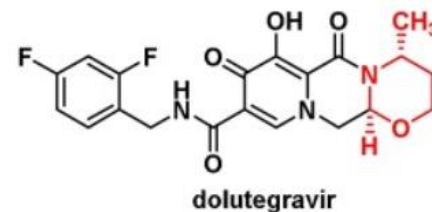
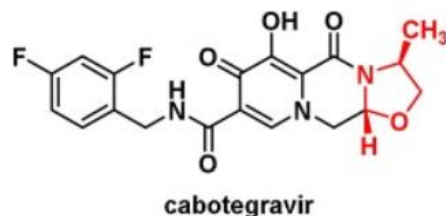
-Administration possible en sous cutanée activité long acting 1 fs tous les 6 mois en combinaison avec un traitement optimisé ou par voie orale hebdomadaire

Depuis 2022...Long acting

- 1ère bithérapie injectable à LP... ou une administration IM tous les 2 mois!



- Cabotegravir VOCABRIA®, nouvel inhibiteur de l'intégrase (INI- analogue structural dolutégravir)
- Rilpivirine REKAMBYS® formulation injectable LP (INNTI)
- Non infériorité de la bithérapie LA vs trithérapie chez des patients contrôlés virologiquement



Initiation de traitement en 2025

- Une **trithérapie** de première ligne associant 2 INTI avec un 3^{ème} agent ou une **Bithérapie** associant un **INI et un INTI (DOVATO® : Dolutégravir + Lamivudine)**
- Nombreuses options validées en termes d'efficacité immunovirologique
- Un choix **individualisé avec le patient** l'objectif étant d'atteindre un niveau maximal d'observance.
- Des recommandations
 - Françaises (dernière actualisation 2024)
 - Européennes (dernière actualisation 2025)

Résumé des différents principaux traitements de 1^{ère} ligne

Classes d'ARV	Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse = INTI	Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse = INNTI	Inhibiteur de protéase = IP « - avir »	Inhibiteur d'intégrase = INI « - gravir »
Mécanisme d'action	Analogue des bases Effet terminateur de chaîne : abs de 3'OH	Inhibition de la TI par fixation sur un site allostérique	Peptidomimétique Molécule « leurre »	Fixation sur le complexe de pré-intégration
Molécules	Lamivudine Emtricitabine Abacavir Ténofovir : - Disoproxil - Alafénamide	Rilpivirine Etravirine Doravirine	Darunavir + Boost (inh enzymatique = ritonavir)	Raltégravir Dolutégravir Bictégravir Cabotégravir

Facteurs pris en compte individualisant le traitement en fonction du patient

- Le niveau de charge virale (< ou > à 100 000 copies/ml)
- **La tolérance** attendue du traitement
- **La facilité de prise** en fonction des conditions et du rythme de vie du patient
- **Les interactions médicamenteuses** attendues avec d'éventuels autres traitements concomitants
- **Les comorbidités**, en particulier cardio-vasculaire, rénale, hépatique, les conduites addictives et les troubles psychiatriques, l'existence d'une tuberculose
- Les résultats du **test de résistance génotypique pré-thérapeutique** (12% de souches avec des mutations de résistance initiales)
- Les conséquences potentielles d'un échec sur les options thérapeutiques ultérieures
- Les résultats de la recherche **de l'allèle HLA-B*5701 pour dépister le risque d'hypersensibilité à l'abacavir**
- **Le coût** du traitement

La Charge virale VIH pour le suivi de l'infection chronique

Monitorage de la charge virale VIH

- En parallèle d'un suivi immunologique **CD4**
- Mesure la quantité de génome viral dans le plasma (expression en copies/ml et log copies/ml d'ARN VIH)

En moyenne CV initiale autour de 100 000 cp/ml (5 log cp/ml)

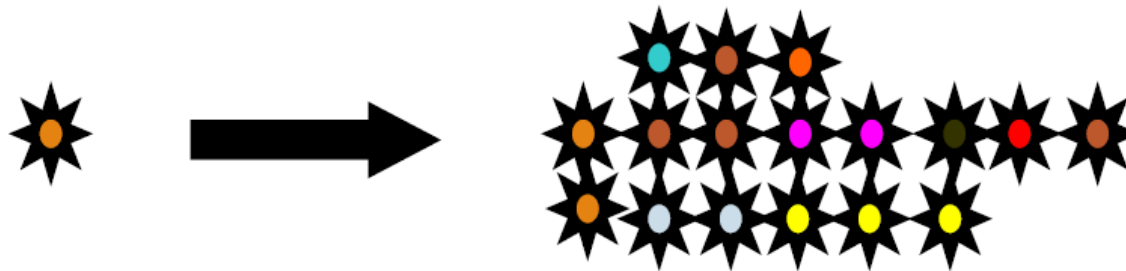
- Charge virale contrôlée seuil à 50cp/ml
- Patient **traité**
 - à la mise sous traitement ARVs (1ère ligne)
 - CV à **J0 (en parallèle du génotype)**
 - Contrôle à **1** mois : baisse de CV attendue = -1 log
 - Contrôle à 3 mois, 6 mois (indétectabilité de la CV)
 - Contrôle **2 à 3 fois par an** fonction du reste du bilan
 - Si CV détectable au cours du suivi
 - Jamais indétectable : revoir Observance, PK, puissance association ARVs
 - Blip : rebond de CV lors d'un contrôle puis indétectabilité , faire un contrôle pour affirmer l'échappement
 - **Échappement virologique (2CV de suite >50cp/ml , 1,3 log Cp/ml):**
génotype et discussion nouvelle thérapeutique

La résistance aux ARVs

Evolution individuelle

QUASI-ESPECE VIRALE

- En primo-infection, virus génétiquement très homogène dans l'organisme
- Infection **dynamique**, évolution de la population virale en raison des erreurs de la transcriptase inverse au cours de la réplication (une erreur tous les 10 000 nucléotides) : **variabilité nucléotidique** → Apparition progressive d'un **mélange complexe de variants qui évoluent de façon différente et parfois indépendante au niveau des différents tissus et cellules** = **quasi-espèce virale** au sein des individus infectés

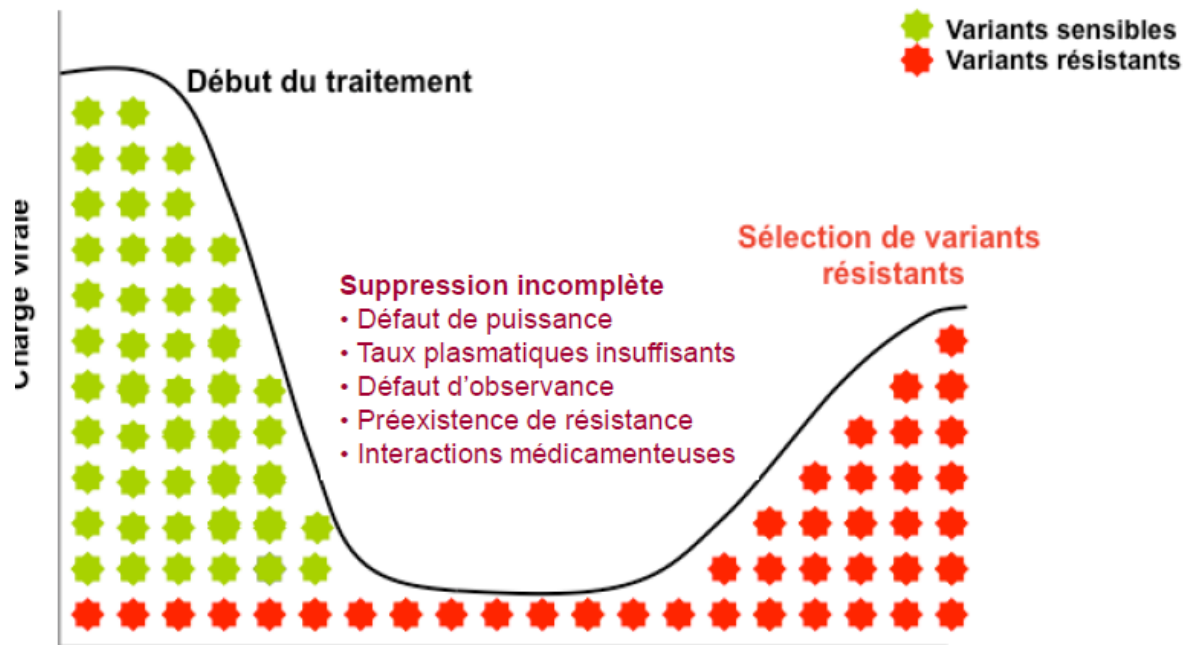


- Conséquences : grand pouvoir d'adaptation, échappement aux réponses immunitaires et échappement possible aux thérapeutiques antirétrovirales par sélection des mutants résistants au sein de la quasi-espèce



Emergence de Résistance

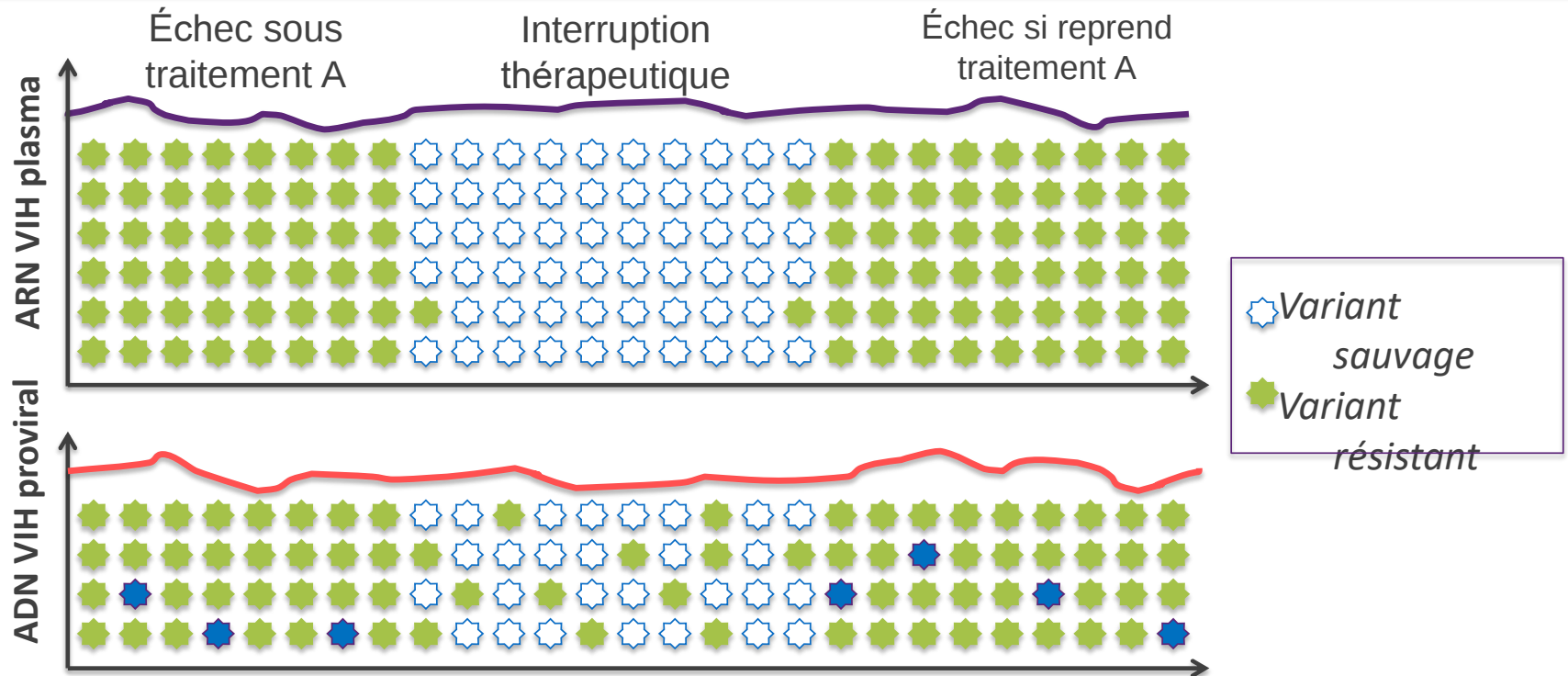
- En l'absence d'ARV : le virus sauvage/sensible est le plus adapté et le plus prévalent de la quasiespece virale
- Sous pression de sélection anti rétrovirale : les variants résistants peuvent émerger en raison de leur avantage réplcatif dans certaines circonstances



Facteurs favorisant l'émergence de virus résistants

Traitement antérieur	•Variants résistants sélectionnés précédemment •Archivage des mutations dans les sanctuaires et ré-émergence lors de la réintroduction du ttt
Stade de la maladie	•Risque plus important d'échec si stade avancé
Puissance ARV	•Risque en cas de combinaison sub-optimale d'ARVs (recommandations)
Observance patient	•Mauvaise observance ou arrêt thérapeutique risque de concentration sous optimale contribuant à l'émergence rapide de mutations
Concentration de l'ARV	•Variation individuelles du métabolisme et de la PK: modification des C° intra cellulaire avec risque d'émergence mutation

Problématique de la Résistance Archivée



Le virus muté s'intègre dans le génome de l'hôte et est donc archivé

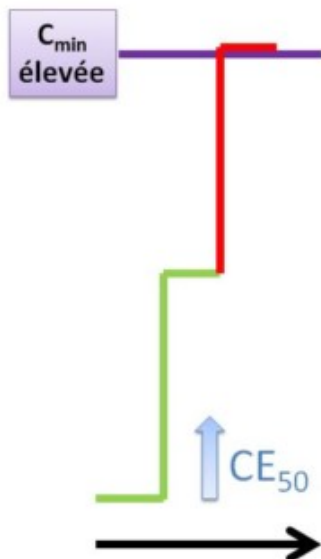
Barrière génétique aux ARVs

Barrière génétique faible

Forte baisse de sensibilité pour une mutation et C_{min} élevée

→ Une seule mutation engendre un haut niveau de résistance

- 3TC/FTC
- INNTI (EFV, NVP et RPV)
- INI de 1^{re} génération (RAL et EVG)
- Inhibiteur de fusion

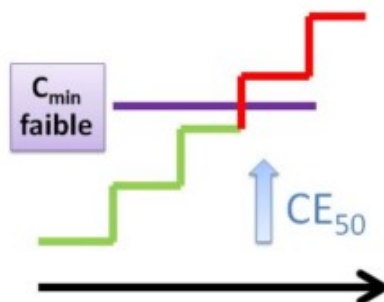


Barrière génétique intermédiaire

Changement modéré de sensibilité pour une mutation et C_{min} faible

→ Une à deux mutations diminuent la sensibilité

- AZT, TDF, ABC
- ETR

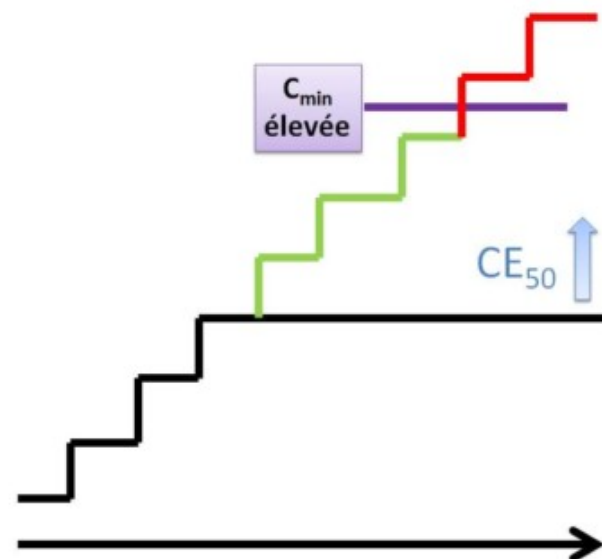


Barrière génétique élevée

Peu de modification de la sensibilité pour une mutation et C_{min} élevée

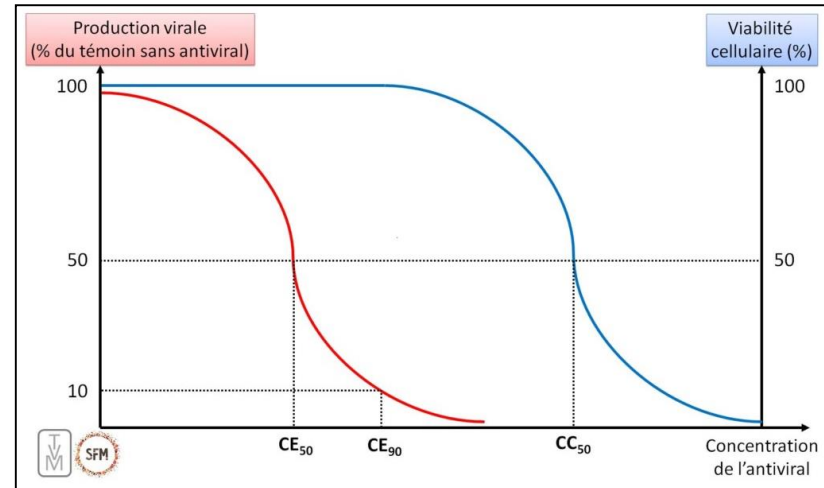
→ Plusieurs mutations diminuent la sensibilité

- IP potentialisés par ritonavir ou cobicistat
- INI de 2^e génération (DTG)



Tests phénotypiques réservés à la recherche

- Méthode **RVA** (Recombinant Virus Assay)
 - Construction d'un virus recombinant : souche de laboratoire ayant incorporé le fragment amplifié par PCR (RT ou Prot)
 - Culture à différentes concentrations d'ARVs
 - Comparaison avec le virus sauvage de la CI50 ou CI90
- Test réservé à la recherche
 - Technique lourde, onéreuse
 - Pas de bénéfice démontrer en pratique clinique/génotype

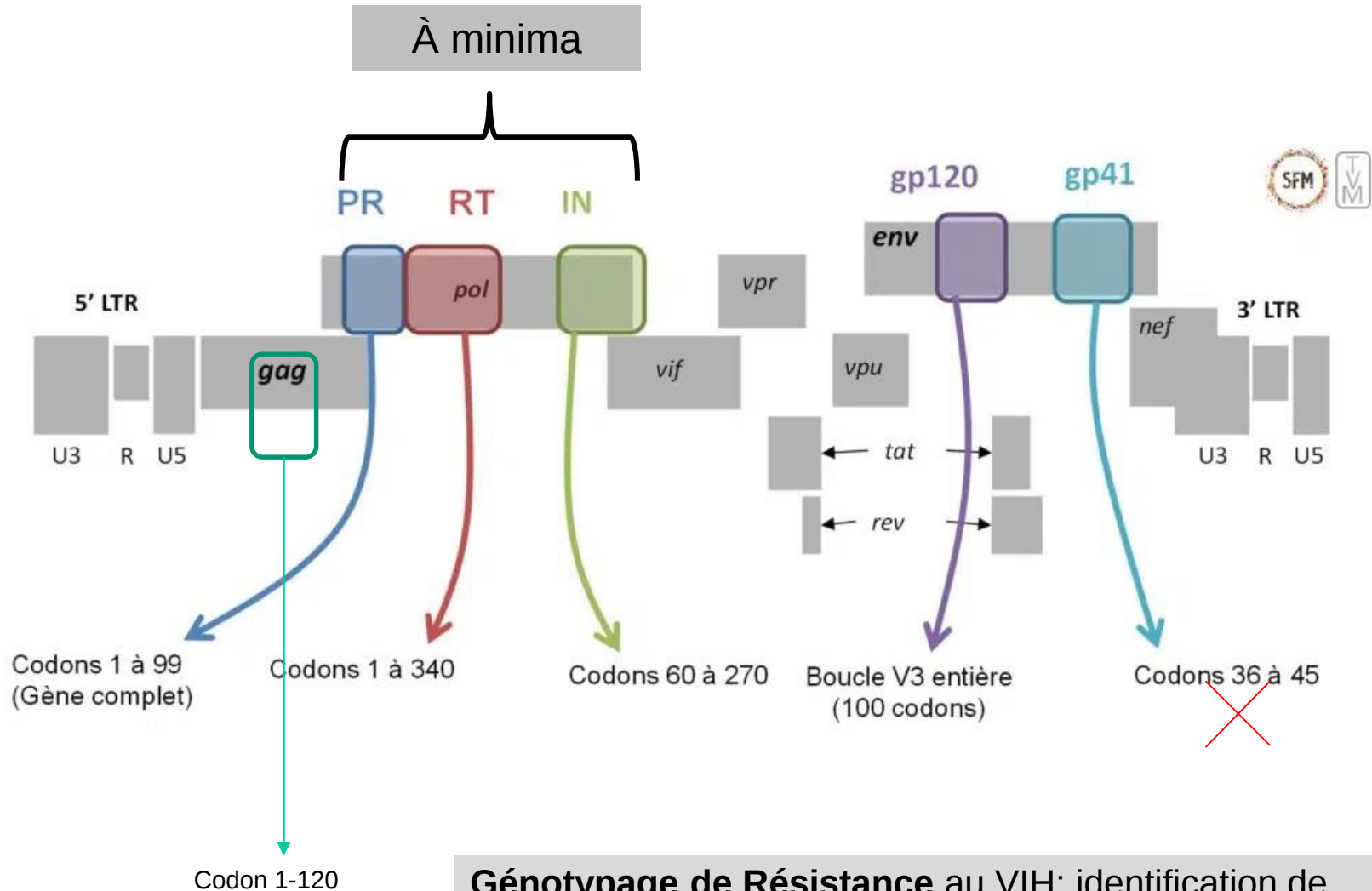


La Méthode de référence en pratique quotidienne d'évaluation de la résistance est GENOTYPE

Indications du test génotypique de recherche de résistance

- À la découverte de la séropositivité
 - Infection par une souche présentant des mutations (12% des cas)
 - Détermination du sous type
- Echechs thérapeutiques
 - Mise en évidence des mutations de résistance (sur la 2ème CV >50cp/ml)
 - Choix d'un nouveau traitement en fonction des molécules efficaces
- Méthode de routine : méthode de sanger
 - Détection des populations virales mutées représentant au moins 20% de la population virale

Régions du génotypage VIH1



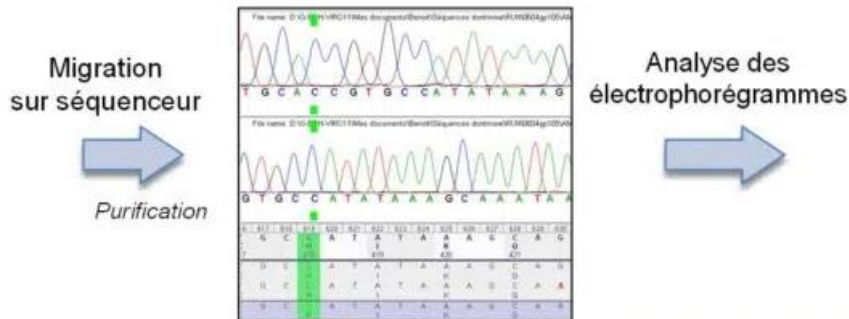
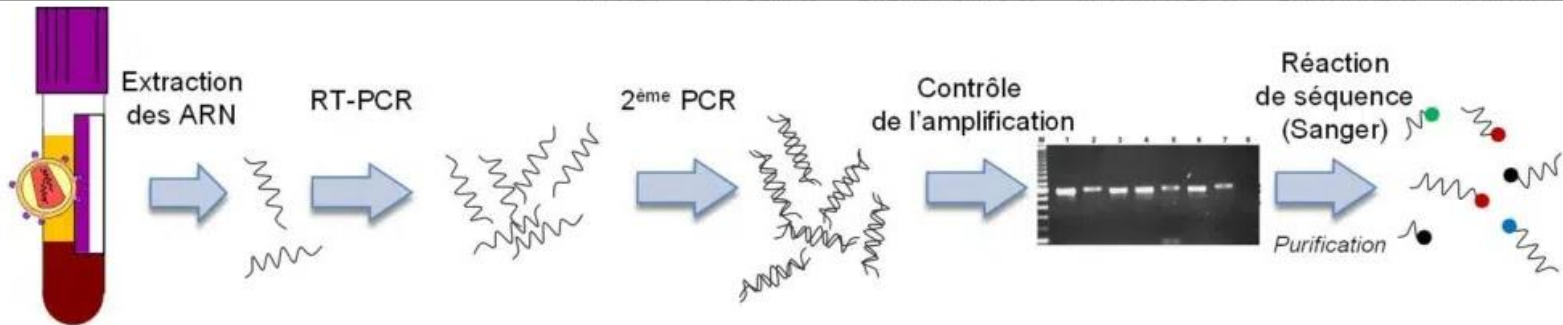
Génotypage de Résistance au VIH: identification de **mutations** dans l'un des 4 gènes codant pour les protéines cibles (RT,Prot., intégrase , gp120, gène de la capsid) capables de diminuer la sensibilité aux ARVS

La technique de génotypage par la méthode Sanger

Les étapes du génotypage VIH en méthode Sanger

- **Extraction** à partir d'un plasma EDTA :
 - extracteur automatisé (Qiasymphony) 1000 µl = 50 µl d'extrait réalisation de l'amplification sur 5µl
- **Amplification** des gènes cibles : RT, PROT, intégrase, Gp120 , capsid (P24)
 - RT : construction d'un cDNA
 - Nested PCR: augmentation de la sensibilité
- **Séquençage** : détermination de la séquence nucléotidique d'un gène
 - Méthode de Sanger
 - Séquenceur capillaire
- **Analyse** informatique
 - Transformation en séquence d'AA
 - Détermination des codons de résistance
- **Interprétation** en fonction de l'algorithme
 - Dernière version n°34 (octobre 2023)
www.hivfrenchresistance.org

Les étapes du génotypage VIH en méthode Sanger



Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTI)				
Drug	Mechanism of action	Target	Class	Resistance
Zalcitabine (ddC)	Reverse transcriptase	1	1	1
Zalcitabine (ddC)	Reverse transcriptase	1	1	1
Zalcitabine (ddC)	Reverse transcriptase	1	1	1
Zalcitabine (ddC)	Reverse transcriptase	1	1	1
Zalcitabine (ddC)	Reverse transcriptase	1	1	1
Zalcitabine (ddC)	Reverse transcriptase	1	1	1
Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTI)				
Drug	Mechanism of action	Target	Class	Resistance
Didanosine (ddI)	Reverse transcriptase	1	1	1
Didanosine (ddI)	Reverse transcriptase	1	1	1
Didanosine (ddI)	Reverse transcriptase	1	1	1
Didanosine (ddI)	Reverse transcriptase	1	1	1
Didanosine (ddI)	Reverse transcriptase	1	1	1
Protease Inhibitors (PI)				
Drug	Mechanism of action	Target	Class	Resistance
Didanosine (ddI)	Reverse transcriptase	1	1	1
Didanosine (ddI)	Reverse transcriptase	1	1	1
Didanosine (ddI)	Reverse transcriptase	1	1	1
Didanosine (ddI)	Reverse transcriptase	1	1	1
Didanosine (ddI)	Reverse transcriptase	1	1	1

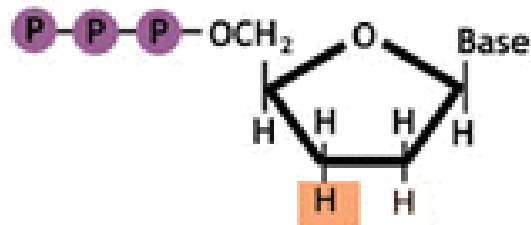


Principe Méthode de Sanger 1977

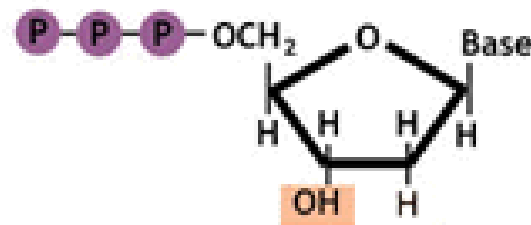
Elle est basée sur la synthèse d'un brin d'ADN en présence de nucléotides particuliers appelés **didésoxynucléotides** (ddNTP)

→ Pas de groupement hydroxyle en C3'

→ Termineur de chaîne



dideoxynucleotide (ddNTP)

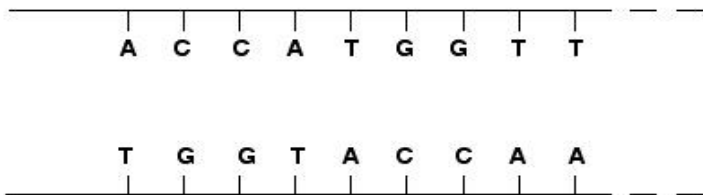


deoxynucleotide (dNTP)

LE SÉQUENÇAGE DE L'ADN (méthode de Sanger)



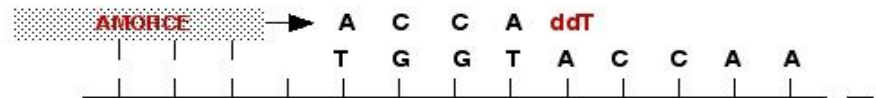
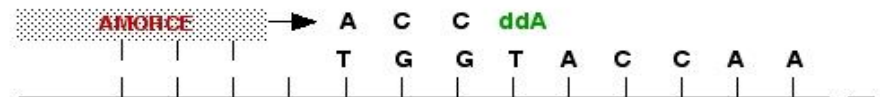
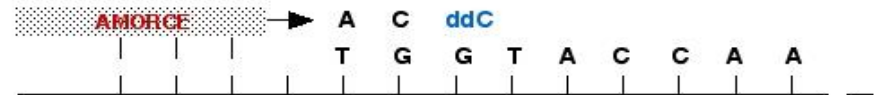
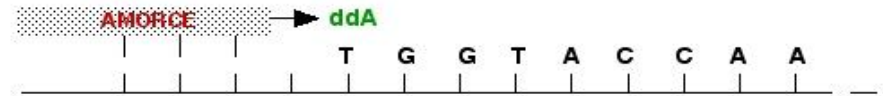
dénaturation



hybridation



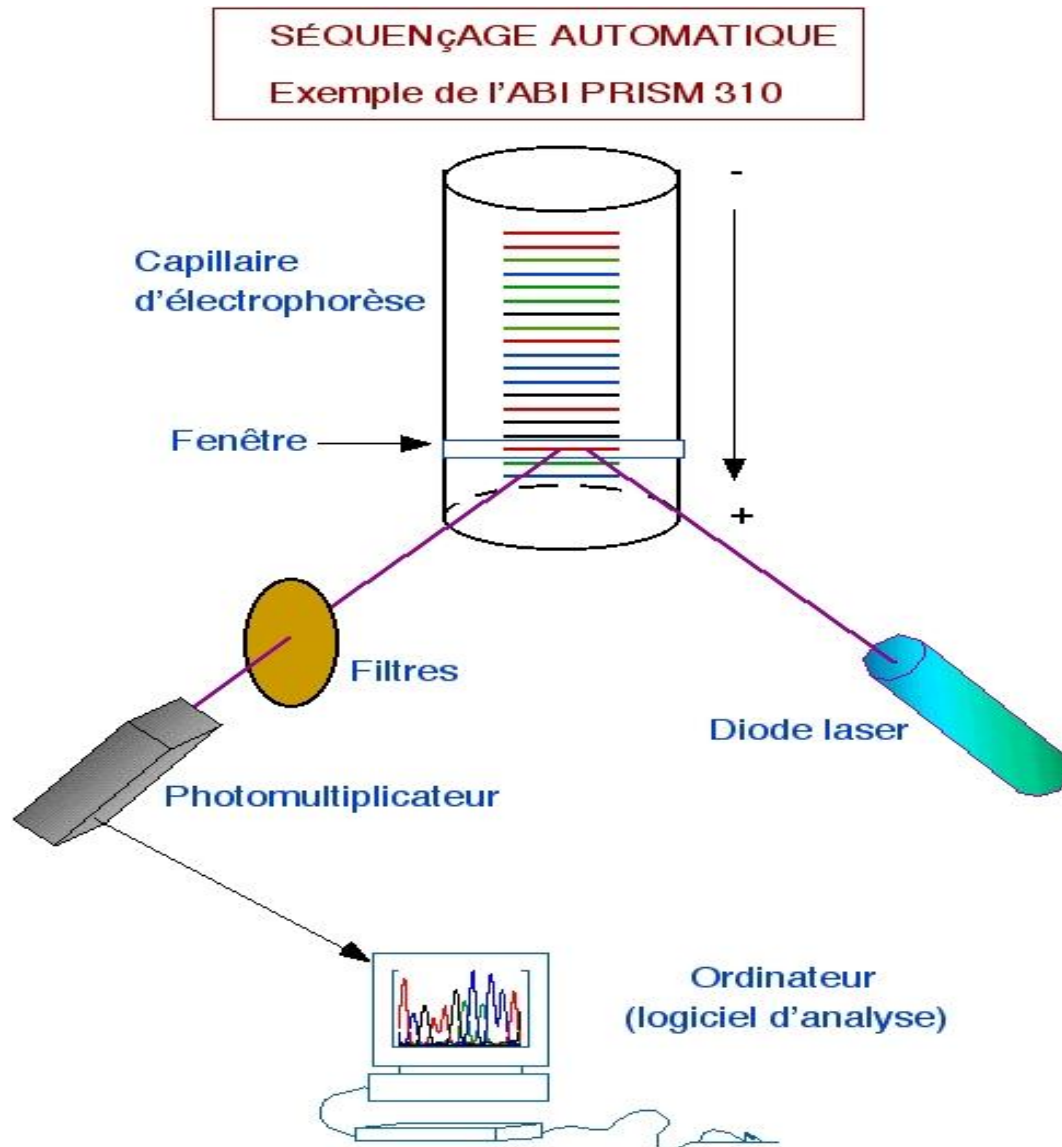
synthèse



Composition du milieu de séquençage

- Réaction de séquence addition dans le milieu contenant le fragment à séquencer
 - d'une amorce
 - d'un mélange nucléotidique contenant
 - dATP, dCTP, dGTP, dTTP et
 - dATP*, dCTP*, dGTP*, dTTP* non hydroxylé en 3'
- Utilisation de réactifs fluorescents pour le marquage (fluorescéine, Rouge Texas, Tetramethylrhodamine ...)
 - TAMRA -> jaune
 - ROX -> rouge
 - FAM -> bleu
 - JOE -> vert
- Les quatre composés fluo peuvent être détectés simultanément
 - réaction de séquence
 - électrophorèse
 - balayage par un faisceau laser au bas du gel
 - tube photomultiplicateur détecte la fluorescence émise et la convertit en un signal électrique vers l'ordinateur.
 - Scan du gel 600 fois /heure

Analyse des produits de séquences



Analyse des séquences obtenues

• Analyse

- AA sauvage suivi de la position sur le gène (RT, PROT, INTEGRASE, ENVELOPPE, CAPSIDE) et AA muté
 - Ex : M184V : en position 184 une Valine remplace une Méthionine
- Lecture des séquences obtenues dans un programme d'analyse qui positionne les points de mutations et les résistances engendrées selon le dernier algorithme de l'ANRS
 - Réponse possible : R pour résistant. Rp pour résistance possible et S pour sensible

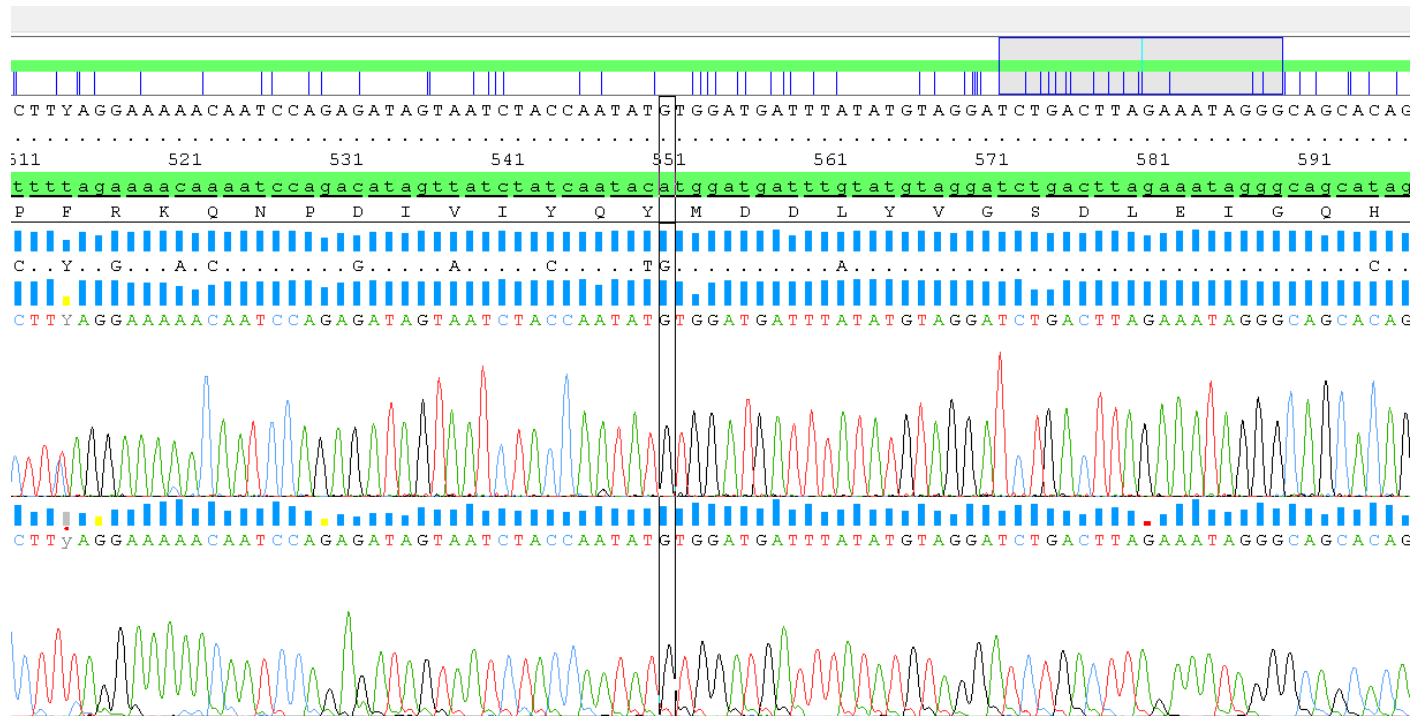
November 2023 - Version n°34

ANRS – MIE VIROLOGY NETWORK : RESISTANCE GROUP
GENOTYPE INTERPRETATION: NUCLEOSIDE AND NUCLEOTIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
ZDV	• T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [1, 2, 3, 4] • At least 3 mutations among: M41L, D67N, K70R, L210W, K219Q/E [1, 2, 3, 4] • Q151M • Insertion at codon 69	
3TC/FTC	• K65R [8, 9, 11] • M184V/I • Insertion at codon 69	• Q151M
ABC	• At least 3 mutations among: M41L, D67N, M184V/I, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [5, 20] • K65R [6, 8, 9, 24] • L74V/I [16, 17, 18, 19, 20, 24] • Y115F [24] • Q151M • Insertion at codon 69	• 2 mutations among: M41L, D67N, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [5, 20] • M184V/I [24]
TDF/TAF	• At least 4 mutations among: M41L, E44D, D67N, T69D/N/S, L74V/I, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [10, 12, 21, 25, 26] • K65R/E/N [6, 7, 8, 9, 22, 23, 25, 26] • Insertion at codon 69 • K70E [13, 14, 15]	• 3 mutations among: M41L, E44D, D67N, T69D/N/S, L74V/I, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [10, 21, 25, 26]
ISL	• M184V/I [27, 28, 29]	• A114S [29]

ZDV: zidovudine, 3TC: lamivudine, FTC: emtricitabine, ABC: abacavir, TDF: tenofovir disoproxil fumarate, TAF: tenofovir alafenamide, ISL: islatravir

Ex Génotype de la TI à partir d'une CV = 3,27 log cp/ml



Project View AmpliconView	
Reverse transcripts	Reverse transcripts
Summary	TAFTIPSVNNETPGIRYQYNVLPQGWKGSIPAIFQESMTKILEPFRKNNPEIVIYQYVDDLYVGSdleIGQHRAKIKELREHLLKWFgttTPDKKHQKE
AA Var...	 S M T . V L . V W Y Q . Y
Index	131 141 151 161 171 181 191 201 211 221
Refere...	TAFTIPSIINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSIPAIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYMDLYVGSdleIGQHRtkIEELRQHLLRWGLtTPDKKHQKE
▼ 24037256	 V E N E V A K E K F

ATG → GTG en position 184 =
M184V

Technique NGS : évaluations en cours

- Techniques « in house » : Whole Genome Séquençage
- Techniques commerciales
 - Avantages/ sanger détection des populations minoritaires
 - Positionnement du Cut Off 20%
 - En test à Nantes Technique ABL : séquençage du gène POL
 - Technique en 3 jours
 - Logiciel d'interprétation : MicroBiocheck®

Profils de résistance aux ARVs

Résistance aux INTI: mécanismes

- 1- Diminution de l'incorporation de l'ARV lors de la synthèse d'ADN au profit des dNTP naturels par un mécanisme de perte d'affinité :
Discrimination
 - Codons : 65,74,151,184
 - Molécules concernées : ddl, 3TC, ABC, FTC, TDF
 - Diminution importante de la capacité répliquative
- 2-Excision du dernier INTI incorporé dans la chaîne d'ADN en cours de synthèse ce qui permet une reprise de l'élongation:
Pyrophosphorolyse
 - Mutations sélectionnées par les analogues de la thymidine : AZT>d4T (TAMs)
 - Codons : 41,67,70,210,215, 219
 - Accumulation progressive
 - 2 profils différents

Résistance aux INTI

- Résistance croisée
 - mutations spécifiques, pas ou peu de résistance croisée
 - M184V pour le 3TC, FTC
 - Mutations diminuant la sensibilité à plusieurs INTI
 - K65R : impact sur sensibilité au TDF, ABC
 - TAMs : impact sur sensibilité à tous les INTI sauf 3TC et FTC
 - 2 mécanismes de haute résistance MDR (*multi drug resistance*)
 - Q151M associée à diverses substitutions aux positions 62.75.77.116
 - Ins 69 généralement de type SS
- Profil d'apparition des résistances variable en fonction des associations de molécules

Résistance aux INNTI

- Mécanisme et structure différente :interaction avec le **site hydrophobe** de la Rt **non compétitive**
- Trois groupes de mutations :
 - Mutations de part et d'autre du site actif :position 100-103 ,106-108 et 181,188,190
 - Mutations moins fréquentes sur la seconde sous unité de la RT (p51)
- Perte d'affinité de l'INNTI pour le site
- Avantage sélectif des souches mutées
 - Acquisition très rapide de la résistance
- Résistance croisée +++ entre Névirapine et Efavirenz
- ARVs à faible barrière génétique
- Nouvelle génération
 - Rilpivirine : nouvelle molécule mais barrière génétique faible
 - Etravirine et Doravirine : actifs sur des souches résistantes aux autres INNTI

Résistance aux IP

Mutations de résistance localisées principalement dans la **région de fixation du substrat** de la protéase

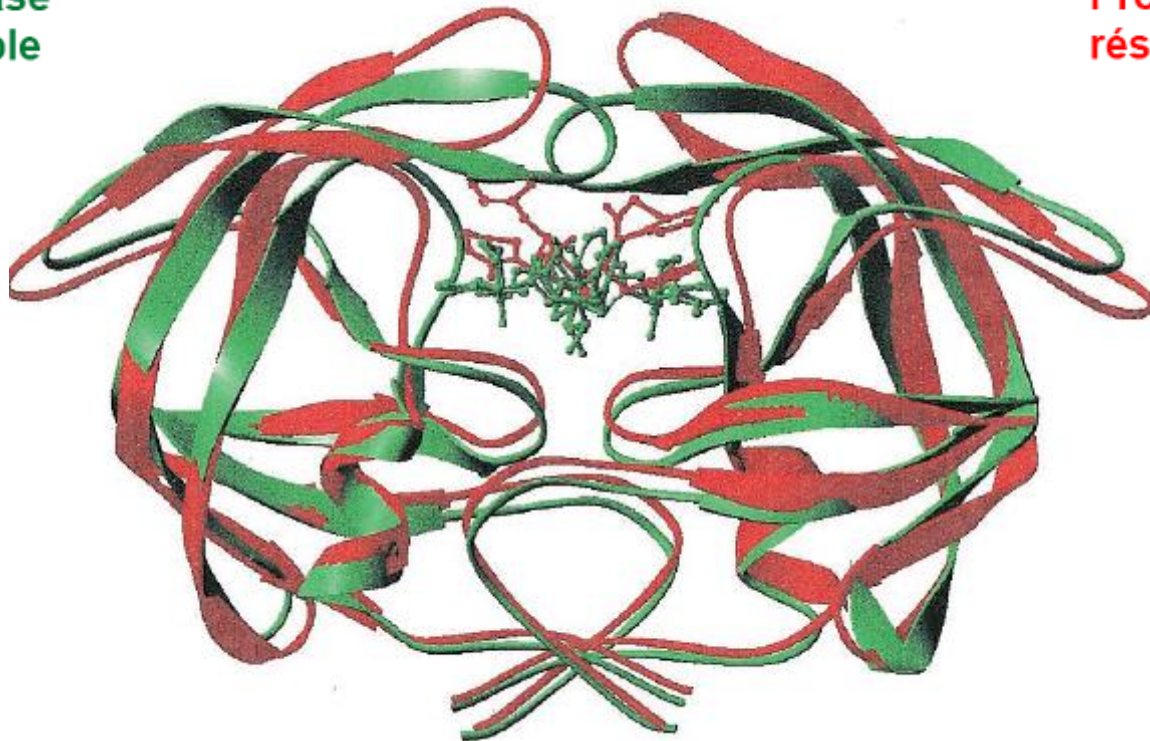
Changements conformationnels : diminution de l'affinité du substrat pour l'enzyme

Développement progressif par accumulation de mutations (majeures, « signatures », mineures), rôle et importance différents (nature, nombre)

Effet mutations = agrandissement du site de fixation des IP (perte d'affinité)

Protéase
sensible

Protéase
résistante



Résistance aux inhibiteurs d'intégrase

- Raltégravir Isentress®
 - Polymorphisme important du gène de l'intégrase
 - Différents profils d'échappement
 - profil N155H le plus fréquent
 - Q148H(R,K) +G140S
 - E92Q
 - Sélection rapide des mutations en cas de réplication virale
 - Barrière génétique faible
 - Résistance croisée entre les 2 molécules
- 2ème génération Dolutégravir Tivicay ® ou en association avec ABC+3TC+DTG Triumeq ® et FTC+ TAF + Bictégravir Biktarvy ®
 - Barrière génétique plus élevée et profil différent (mutations plus rares)
 - ex R263K qui impactent sur la capacité répliquative du virus

Algorithme de résistance du VIH aux ARVs

- Outil (développer par des groupes d'expert) permettant de **déduire les ARVs probablement actifs** sur la souche virale à partir des associations des mutations retrouvées sur le génotype
- Construction :
 - Résultats des **essais *in vitro*** de passages des souches sauvages en présence de l'ARV à tester à des concentrations croissantes (étude phénotypique) permettant d'établir un profil supposé de résistance à un ARV
 - **Corrélation** entre l'existence de différents **profils** de mutations et la résistance **phénotypique**
 - Défaut de corrélation pour certain ARV entre le phénotype et le génotype
 - Ajustement nécessaire du profil de résistance au cours des études cliniques: établissement d'une corrélation entre le **profil génotypique** (nature et nombre de mutations) et la **réponse virologique**
 - Définition d'un seuil de mutations prédictifs d'une moins bonne réponse
 - **Validation** des profils par rééchantillonnage de patient qui avait été sélectionné pour réaliser le profil *in vivo* : vérification de la concordance
 - **Réévaluation** régulière : nouvelles molécules, nouvelles associations, résultats des essais thérapeutiques

Version n°34 de l'algorithme ANRS ex de la RT

November 2023 - Version n°34

ANRS – MIE VIROLOGY NETWORK : RESISTANCE GROUP GENOTYPE INTERPRETATION: NUCLEOSIDE AND NUCLEOTIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS

	Mutations associated with resistance	Mutations associated with « possible resistance »
ZDV	• T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [1, 2, 3, 4] • At least 3 mutations among: M41L, D67N, K70R, L210W, K219Q/E [1, 2, 3, 4] • Q151M • Insertion at codon 69	
3TC/FTC	• K65R [8, 9, 11] • M184V/I • Insertion at codon 69	• Q151M
ABC	• At least 3 mutations among: M41L, D67N, M184V/I, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [5, 20] • K65R [6, 8, 9, 24] • L74V/I [16, 17, 18, 19, 20, 24] • Y115F [24] • Q151M • Insertion at codon 69	• 2 mutations among: M41L, D67N, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [5, 20] • M184V/I [24]
TDF/TAF	• At least 4 mutations among: M41L, E44D, D67N, T69D/N/S, L74V/I, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [10, 12, 21, 25, 26] • K65R/E/N [6, 7, 8, 9, 22, 23, 25, 26] • Insertion at codon 69 • K70E [13, 14, 15]	• 3 mutations among: M41L, E44D, D67N, T69D/N/S, L74V/I, L210W, T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V/Y/F [10, 21, 25, 26]
ISL	• M184V/I [27, 28, 29]	• A114S [29]

ZDV: zidovudine, 3TC: lamivudine, FTC: emtricitabine, ABC: abacavir, TDF: tenofovir disoproxil fumarate, TAF: tenofovir alafenamide, ISL: islatravir

Compte rendu des génotypes aux cliniciens

3TC => Résistance	M184V/M
ABC => Résistance	M41L, D67D/N, L74I/L, M184V/M, L210W/L, T215C/Y
FTC => Résistance	M184V/M
TDF => Résistance	M41L, E44E/D, D67D/N, L74I/L, L210W/L, T215C/Y
ZDV => Résistance	M41L, D67D/N, L210W/L, T215C/Y
DOR => Résistance possible	Y181C/Y, G190G/A
EFV => Résistance	Y181C/Y, G190G/A
ETR => Résistance	Y181C/Y, G190G/A
NVP => Résistance	Y181C/Y, G190G/A
RPV => Résistance	Y181C/Y

➔ En fonction des mutations identifiées
réponse de la sensibilité à
chaque molécule

Decembre 2020 - Version n°31, Protéase (PR), HIV - 1, sous type B

ATV => Résistance	L10I/L, L33F, M46M/I, A71V, L90M
DRV BID => Résistance possible	L33F, I50V/I, T74P
DRV QD => Résistance	L33F, I50V/I, T74P
LPV => Résistance	L10I/L, K20R/K, L33F, M46M/I, I50V/I, L63P, A71V, V82A, L90M
TPV => Pas d'évidence de résistance	M36I

Decembre 2020 - Version n°31, Intégrase, HIV - 1, sous type B

BIC => Pas d'évidence de résistance	
CAB => Pas d'évidence de résistance	
DTG BID => Pas d'évidence de résistance	
DTG QD => Pas d'évidence de résistance	
EVG => Pas d'évidence de résistance	
RAL => Pas d'évidence de résistance	