



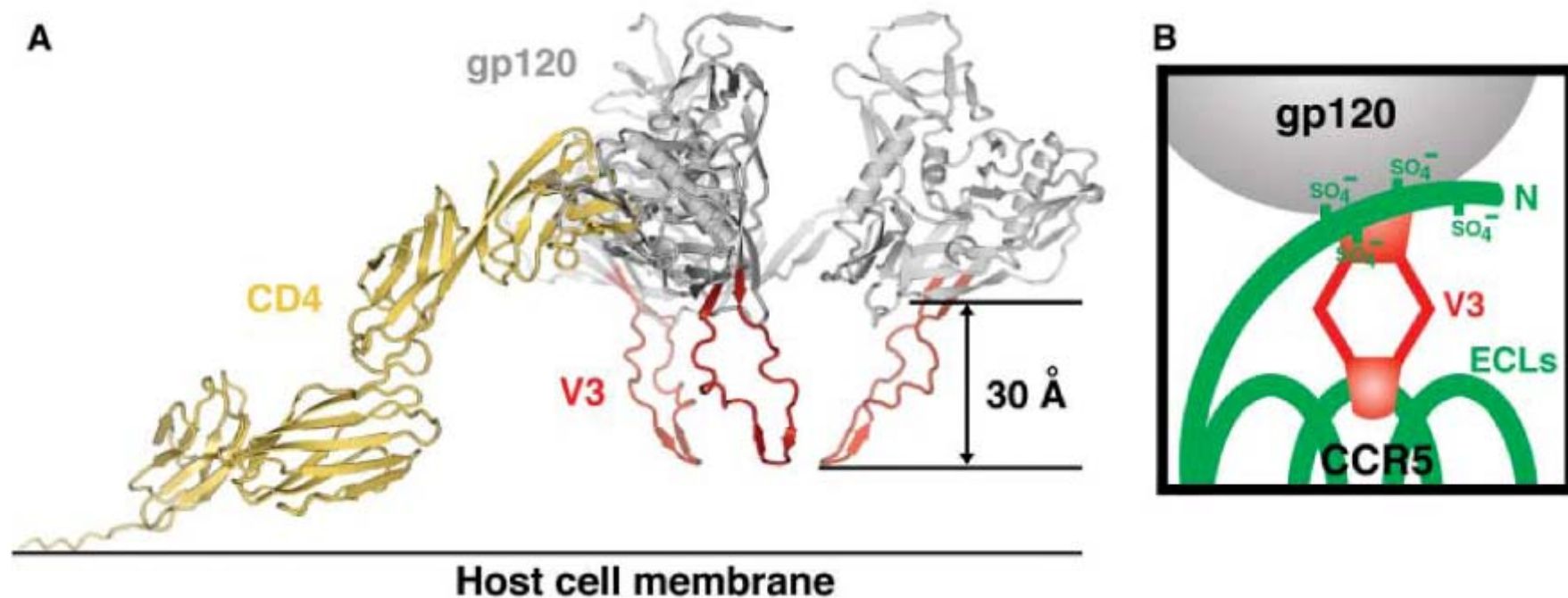
Performances du génotypage de V3 env pour la détermination en routine du tropisme du HIV-1

DELOBEL P.*, RAYMOND S., SANDRES-SAUNE K., CUZIN L., MARCHOU B.,
MASSIP P., IZOPET J.

Service des Maladies Infectieuses et Tropicales - CHU de Toulouse
& Laboratoire de Virologie INSERM U563

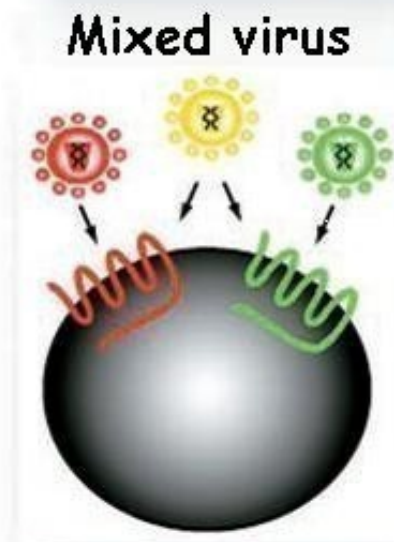
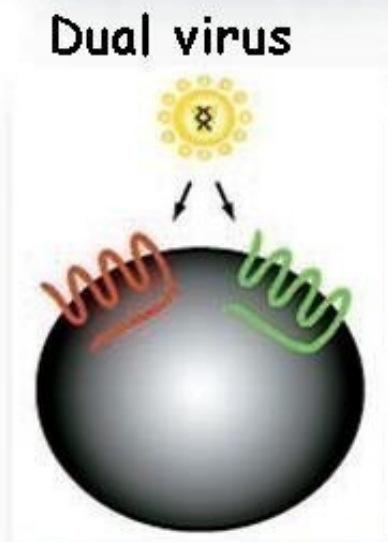
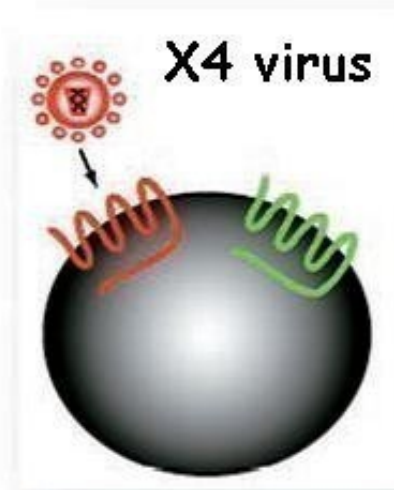
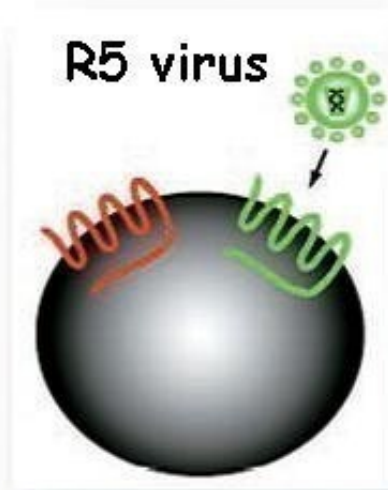


Entrée du HIV-1: interactions gp120 / CD4 / corécepteur



Huang *Science* 2005

Tropisme du HIV-1: définitions



CCR5



CXCR4

Prévalence des virus D/M et X4 purs chez les patients naïfs d'antirétroviraux

	Virus (%)		
	R5	D/M	X4
HIV seroconverters:			
Madrid cohort (n=67)	87	13	-
Spanish hospitals (n=296)	83	17	-
Chronic HIV infection:			
Chelsea & Westminster cohort (n=402)	81	19	<1
HOMER cohort (n=979)	82	18	<1
MERIT study (n=1428)	85	15	<1

Prévalence des virus D/M et X4 purs chez les patients sous traitement antirétroviral

	Virus (%)		
	R5	D/M	X4
Experienced:			
Chelsea & Westminster cohort (n=161)	78	22	<1
Heavily experienced:			
TORO 1/2 (n=724)	50	48	2
ACTG A5211 (n=391)	49	47	4
MOTIVATE 1/2 (n=2560)	56	41	3

Détermination du tropisme en pratique clinique

⇒ Rationnel:

- Association entre tropisme et progression clinique
- Développement d'anti-CCR5: Maraviroc/Vicriviroc

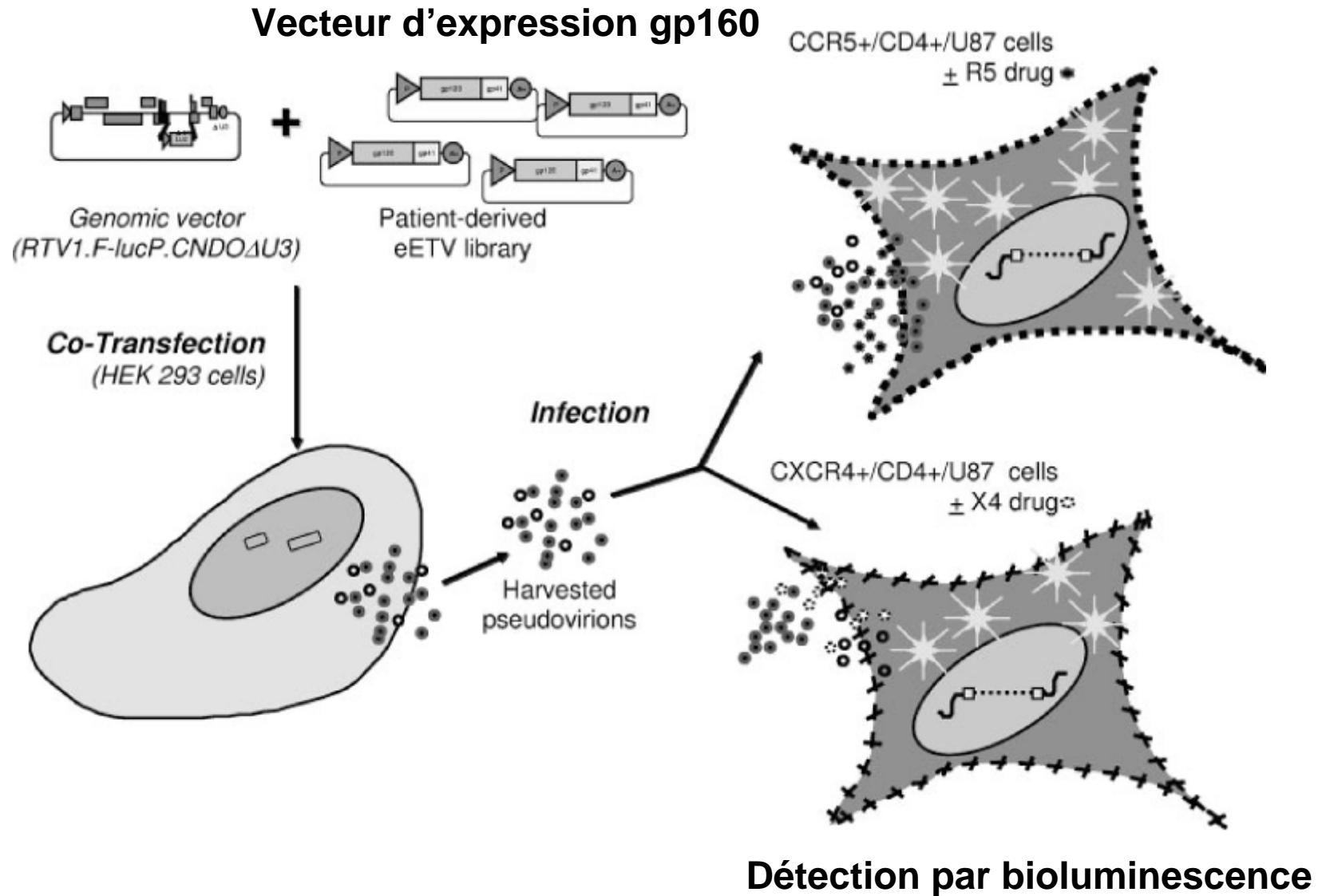
⇒ Intérêt clinique:

- Détermination du tropisme viral avant l'utilisation des anti-CCR5
- Monitoring du tropisme viral pour documenter un échec virologique sous anti-CCR5
- Détermination du tropisme comme facteur prédictif d'évolution clinique

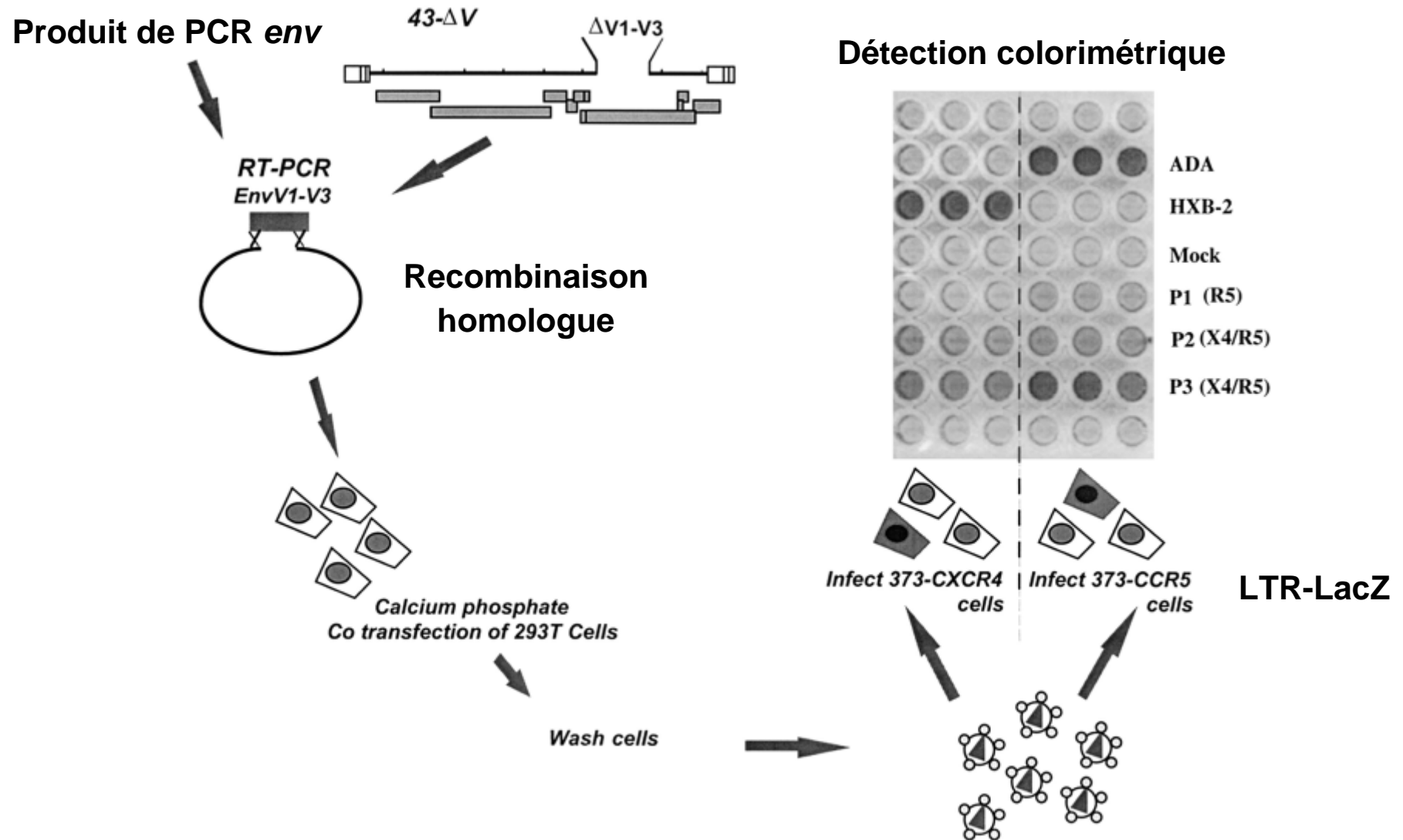
Tests phénotypiques: Recombinant Virus Assays

- Amplification par PCR du gène *env* à partir de l'ARN HIV-1 plasmatique (ou ADN cellulaire)
- Production de virus recombinants
- Infection de cellules indicatrices:
 - CD4⁺ CCR5⁺
 - CD4⁺ CXCR4⁺

Trofile™ – Monogram Biosciences

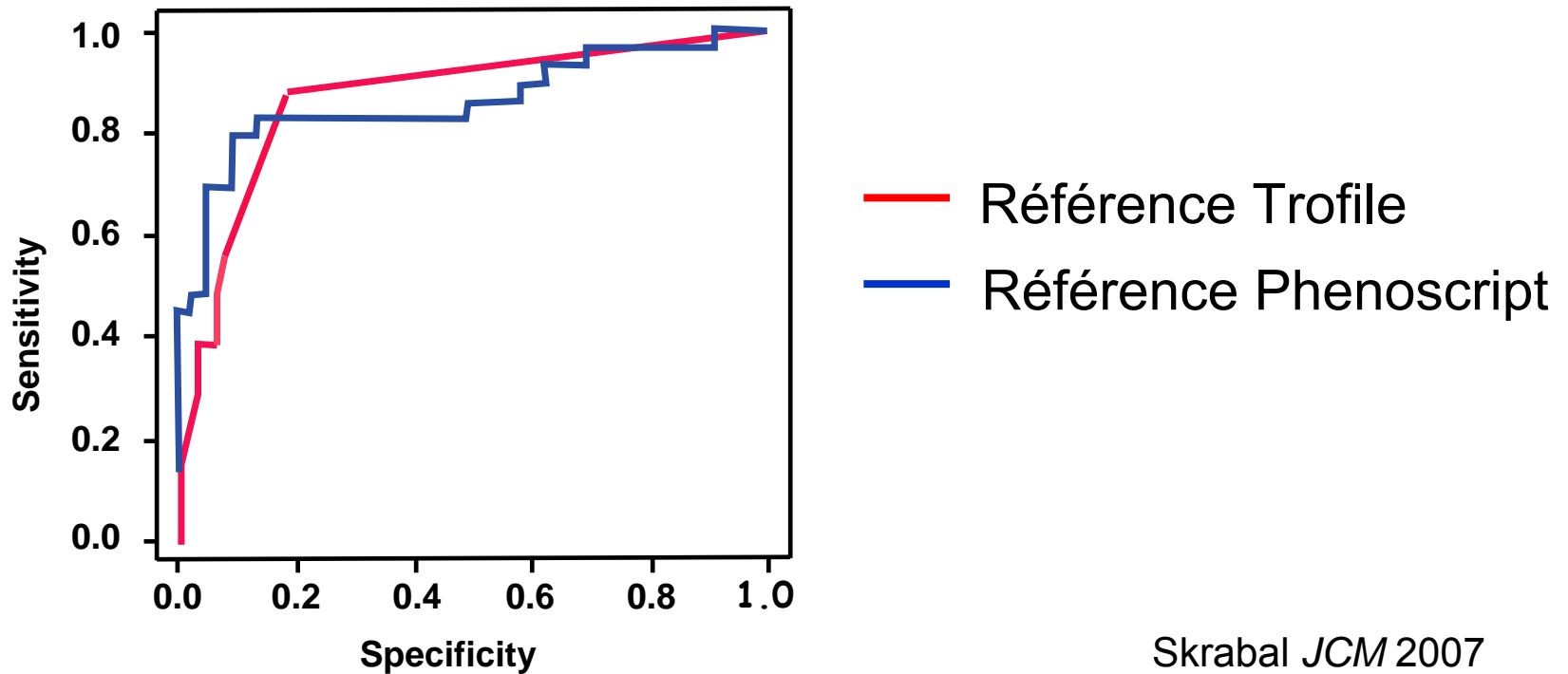


Phenoscript™ – Eurofins Viralliance



Trofile™ vs Phenoscript™

- **Concordance : 85.1 %**
- **Performances similaires :**



Performances des tests phénotypiques par RVA

⇒ Validation:

Phenoscript™ Trouplin *J Virol* 2001

Trofile™ Whitcomb *AAC* 2007

⇒ Limites:

- Détection des virus X4 minoritaires (5-10%)
- Absence de distinction entre Dual et Mixed
- Echecs techniques 3–15 %
- Techniques complexes, longues, et coûteuses

Tests génotypiques

⇒ Basés sur le séquençage du gène *env*

Prédiction du tropisme viral à partir de la séquence de V3:

➤ **Acides aminés 11/25 et charge électrostatique nette**

➔ Acides aminés basiques aux positions 11 et/ou 25

➔ charge nette $[K + R] - [D + E] \geq 5$

➤ **autres acides aminés de V3 associés au tropisme**

↳ **Algorithmes de prédiction du tropisme viral basés sur les corrélations génotype-phénotype**

Tests génotypiques

⇒ Avantages :

+ facile
+ rapide vs tests phénotypiques
- cher

⇒ Limites:

- **Détection des virus X4 minoritaires (10-20%)**
- **Absence de distinction entre Dual et Mixed**
- **Echecs techniques (polymorphisme longueur)**
- **Faible sensibilité de détection des virus X4?**

Prédiction génotypique des virus de phénotype R5X4/X4

Méthode	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
11/25	30	93
Charge nette	44	88
PSSM _{SI/NSI}	34	95
PSSM _{X4/R5}	25	97
SVM _{genomic}	22	90
SVM _{geno2pheno}	50	89

920 échantillons testés avec Trofile™ (769 R5 / 151 X4)

⇒ **Sous-estimation virus X4 par techniques génotypiques?**

Validation prospective de la prédiction génotypique du tropisme viral

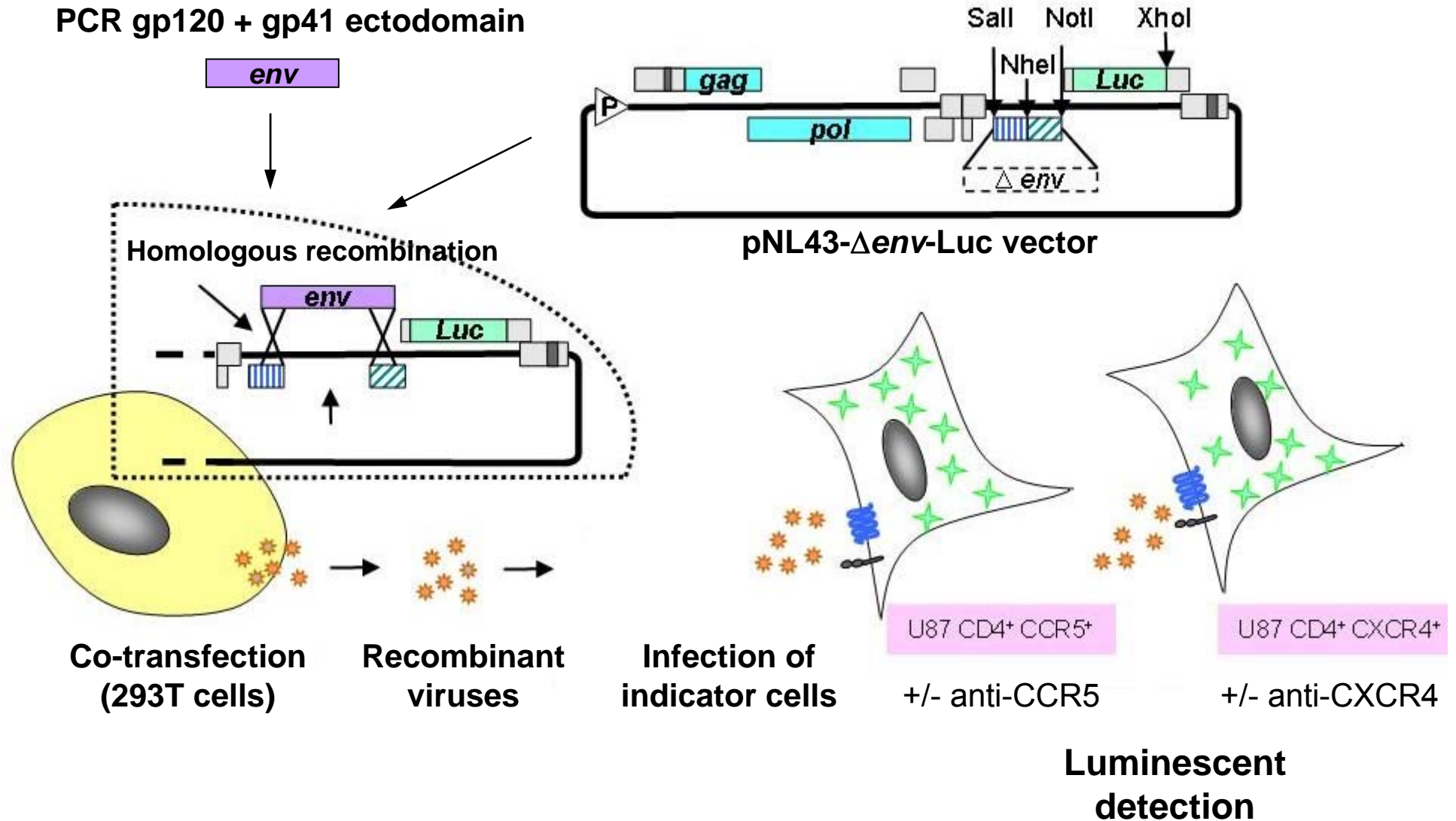
⇒ 103 patients consécutifs en échec virologique sous HAART:

HIV-1 RNA \geq 400 copies/ml

Mutations de résistance pour NRTI, NNRTI & PI

⇒ **Détermination en parallèle du tropisme viral par
approches génotypique et phénotypique**

RVA – Laboratoire de Virologie du CHU de Toulouse

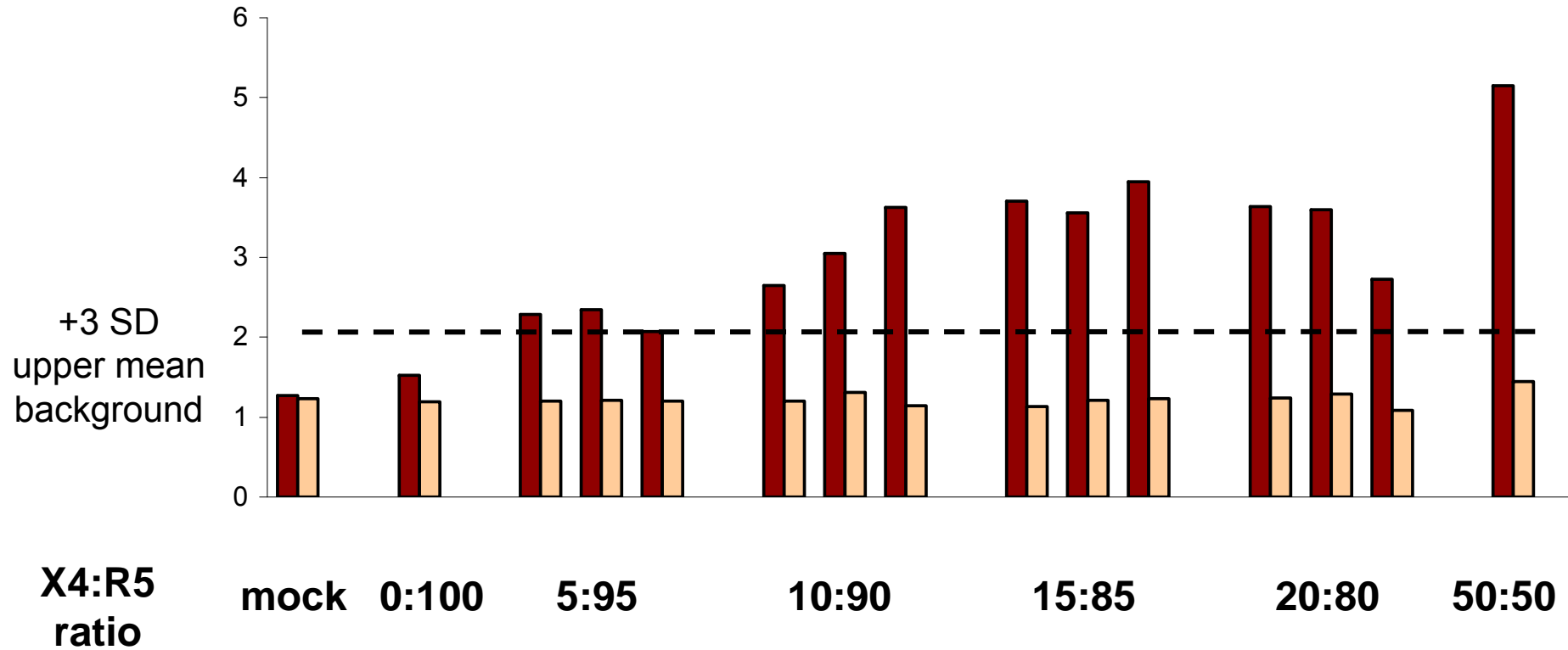


Détection de virus X4 minoritaires

U87 CD4⁺ CXCR4⁺ cells

Mean luciferase activity
(log₁₀ RLU)

■ No drug
■ AMD 3100 (0.3μM)



Sensibilité : 5 - 10 %

Prédiction génotypique du tropisme viral

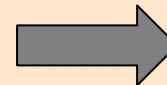
⇒ Critères combinés des règles 11/25 et charge nette :

1 critère parmi:

(i) 11 R/K et/ou 25K

(ii) 25R et charge nette $\geq +5$

(iii) charge nette $\geq +6$



Virus R5X4/X4

⇒ Comparaison avec la règle 11/25 seule et les algorithmes:

Geno2pheno

PSSM_{X4/R5}

PSSM_{SI/NSI}

Prédiction génotypique du tropisme et phénotype observé

Genotype		Phenotype	
		R5	R5X4/X4
Combined 11/25 and net charge rules	R5	69	6
	X4	3	20
11/25 rule	R5	68	9
	X4	4	17
Geno2pheno	R5	63	3
	X4	9	23
PSSM _{X4/R5}	R5	70	8
	X4	2	18
PSSM _{SI/NSI}	R5	68	6
	X4	4	20

Performances du génotype pour la prédiction du phénotype R5X4/X4

Genotypic algorithm	Sensitivity % [CI 95]	Specificity % [CI 95]	PPV % [CI 95]	NPV % [CI 95]
Combined 11/25 and net charge rules	77 [56-91]	96 [88-99]	87 [66-97]	92 [83-97]
11/25 rule	65 [44-83]	94 [86-98]	81 [58-95]	88 [79-94]
Geno2pheno	88 [70-98]	87 [78-94]	72 [53-86]	95 [87-99]
PSSM_{X4/R5}	69 [48-86]	97 [90-100]	90 [68-99]	90 [81-95]
PSSM_{SI/NSI}	77 [56-91]	94 [86-98]	83 [63-95]	92 [83-97]

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

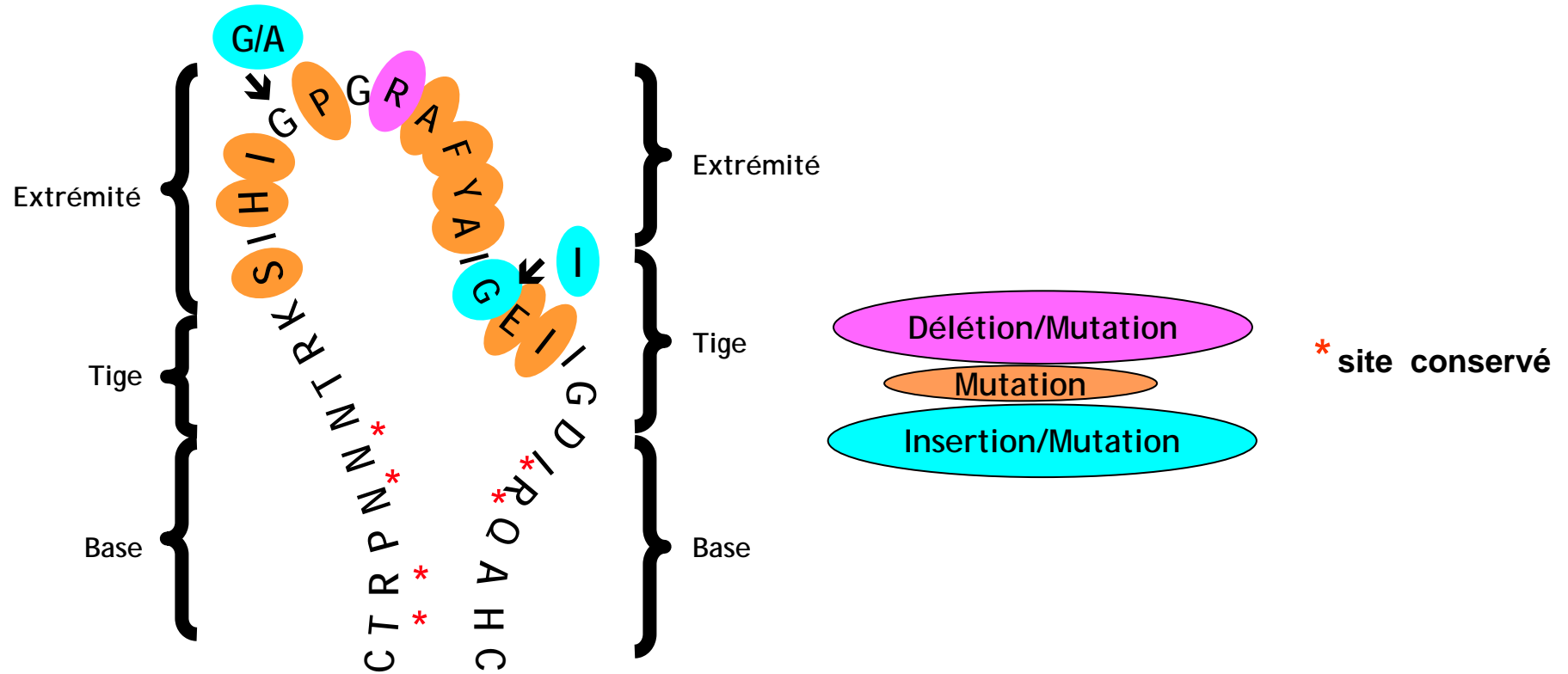
Génotypage V3 des sous-types non-B

Méthode	Sensibilité (%)		Spécificité (%)	
	B	Non-B	B	Non-B
Charge nette	70	30	92	92
Wetcat	100	46	80	85
C4.5	50	23	96	88
C4.5 avec p8-p12	30	23	100	94
PART	90	30	80	92
PSSM _{X4/R5}	90	53	92	88
PSSM _{SI/NSI}	100	38	84	93
Geno2pheno	90	61	88	73

Non-B (n = 115) & B (n = 35)

Garrido JCM 2008

Génotypage de V3 et analyse de la résistance aux antagonistes de CCR5



⇒ Mutations de résistance aux antagonistes de CCR5 sans switch du tropisme vers X4

Conclusions

⇒ La détermination génotypique du tropisme du HIV-1, basée sur le séquençage direct de V3 pourrait être une alternative simple et efficace aux tests phénotypiques en pratique clinique.

⇒ Nécessité de valider les algorithmes génotypiques pour les sous-types non-B: CRF02_AG, C, D...

⇒ Détection des mutations de V3 associées à la résistance aux antagonistes de CCR5.

Remerciements

**INSERM U563 & Laboratoire de
Virologie CHU de Toulouse**

Jacques Izopet

**Michelle Cazabat
Martine Dubois
Maud Mavigner
Stéphanie Raymond
Karine Sauné
Corinne Souyris**

**Service des Maladies Infectieuses
et Tropicales, CHU de Toulouse**

**Lise Cuzin
Bruno Marchou
Patrice Massip**

