



# Nouvelles technologies d'exploration des mutations de résistance du VIH

Pr Charlotte CHARPENTIER

Laboratoire de Virologie  
AP-HP. Nord

Hôpital Bichat-Claude Bernard  
Université de Paris  
INSERM UMR 1137 IAME



# PLAN

## 1. Définition d'un variant minoritaire

## 2. Description des nouvelles technologies : séquençage haut débit

## 3. Variants minoritaires résistants

- à l'initiation du traitement ARV
- à l'échec virologique
- dans l'ADN proviral



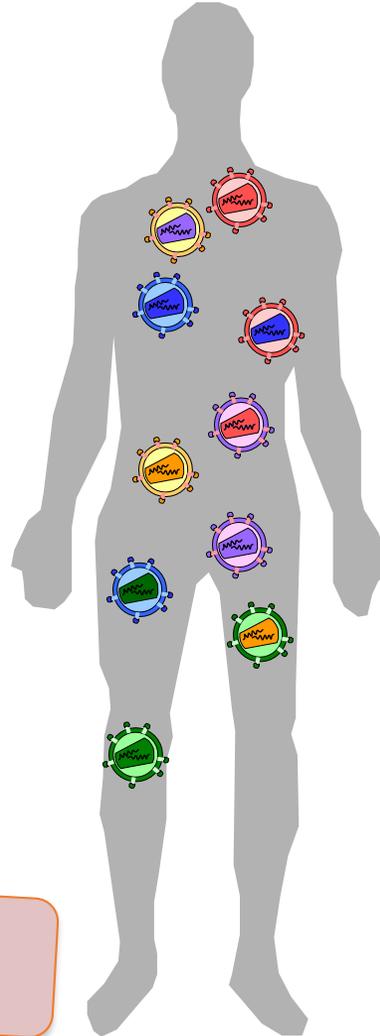
# VIH : QUASI-ESPECES VIRALES

- **Erreurs de rétro-transcriptions**

- **Génome du VIH** :  $\approx 10\ 000$  pb
  - **Transcriptase inverse** :  
1 erreur toutes les 10 000 pb...  
Soit une mutation à chaque fois
  - **Production virale quotidienne** :  
 $10^{11}$  virions produits  
 $10^9$  nouvelles cellules infectées
- ...En une seule journée, production de mutations sur toutes les bases du génome viral !

- **Mutations introduites par la cellule infectée (APOBEC)**

- **Protéine cellulaire APOBEC** : introduction d'erreurs dans le génome viral (pour le rendre inopérant)
- **Protéine virale vif** : contrôle du niveau d'expression de la protéine APOBEC (régule le nombre d'erreurs introduites)



- **Les recombinaisons**

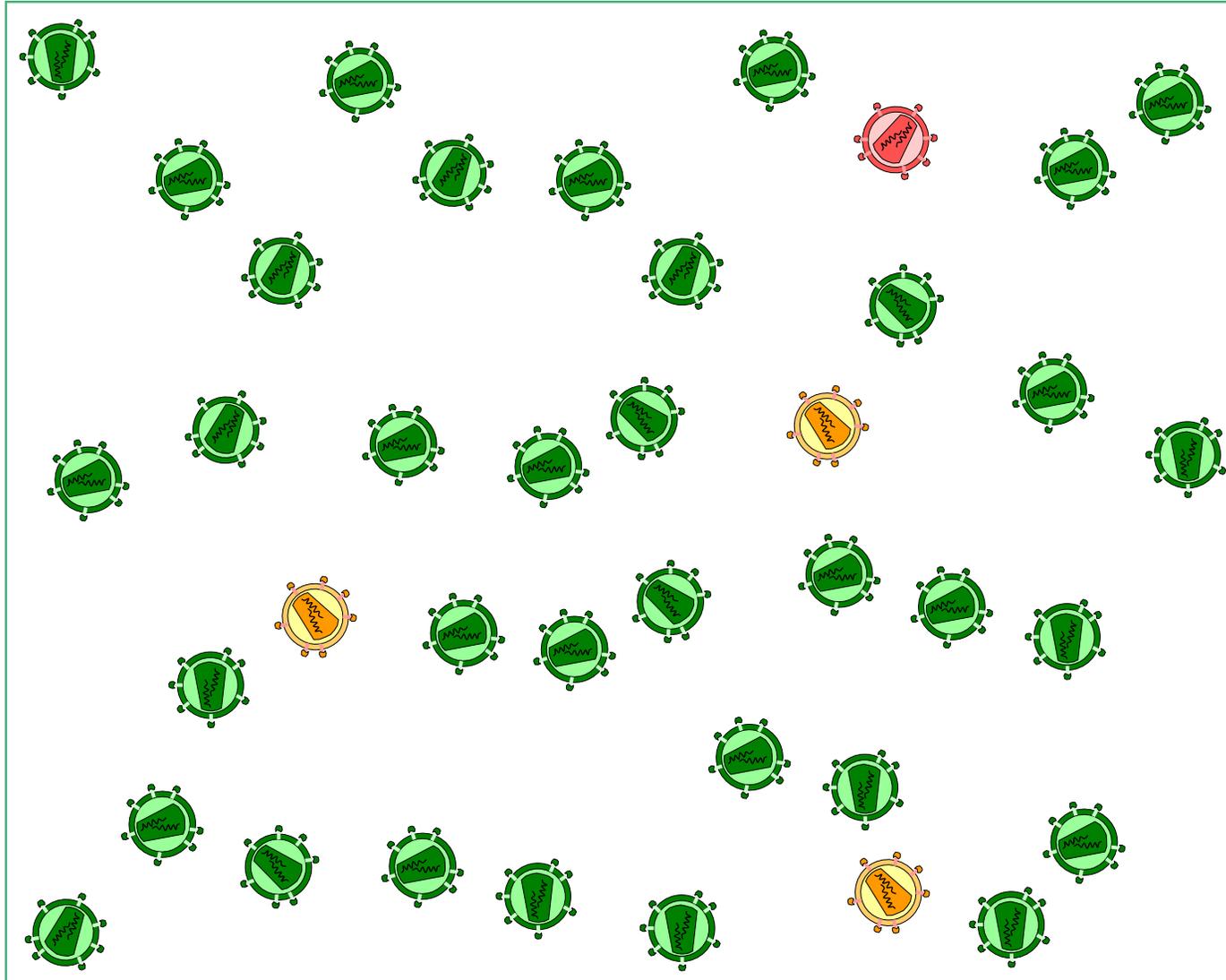
- A partir d'une cellule infectée par deux virus différents : mélange des deux génomes viraux



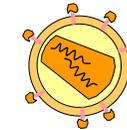
Quasi-espèces

Toutes les mutations  
pré-existent

# Toutes les mutations de résistance pré-existent avant l'initiation des ARV



Virus sans mutation de résistance

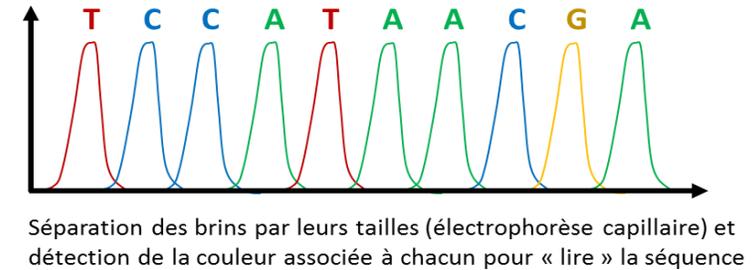
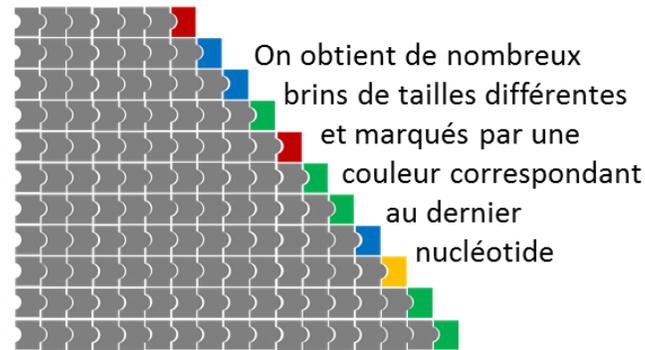
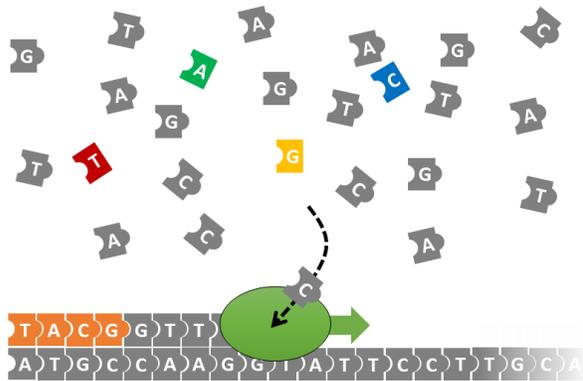


Virus avec 1 mutation de résistance



Virus avec 2 mutations de résistance

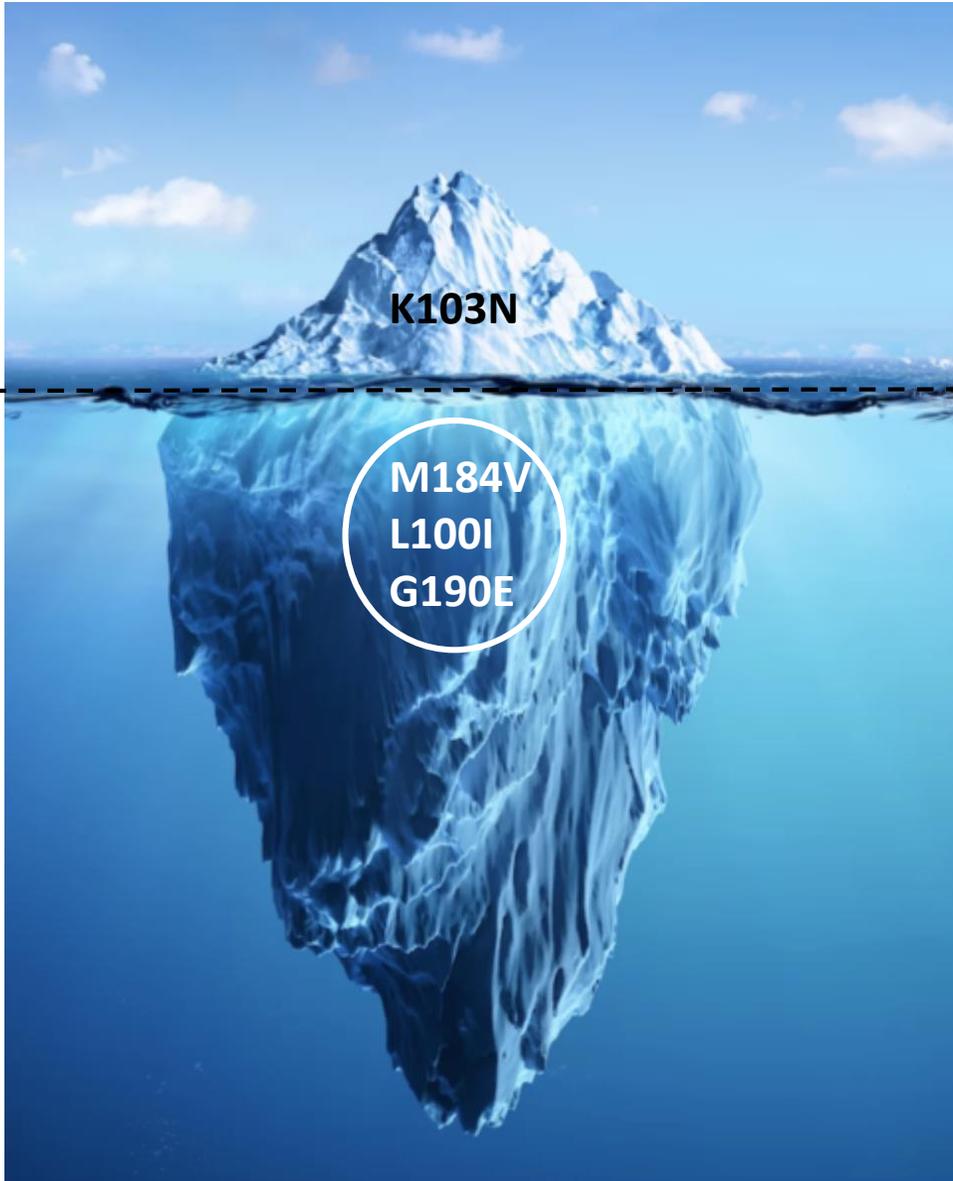
# Technologie de séquençage classique : technologie Sanger



Séquençage  
par électrophorèse  
capillaire

Ne détecte que les **populations  
virales majoritaires,**  
représentant **plus de 20 %**  
de l'ensemble des quasi-espèces  
virales présentes

# Détection des quasi-espèces virales VIH

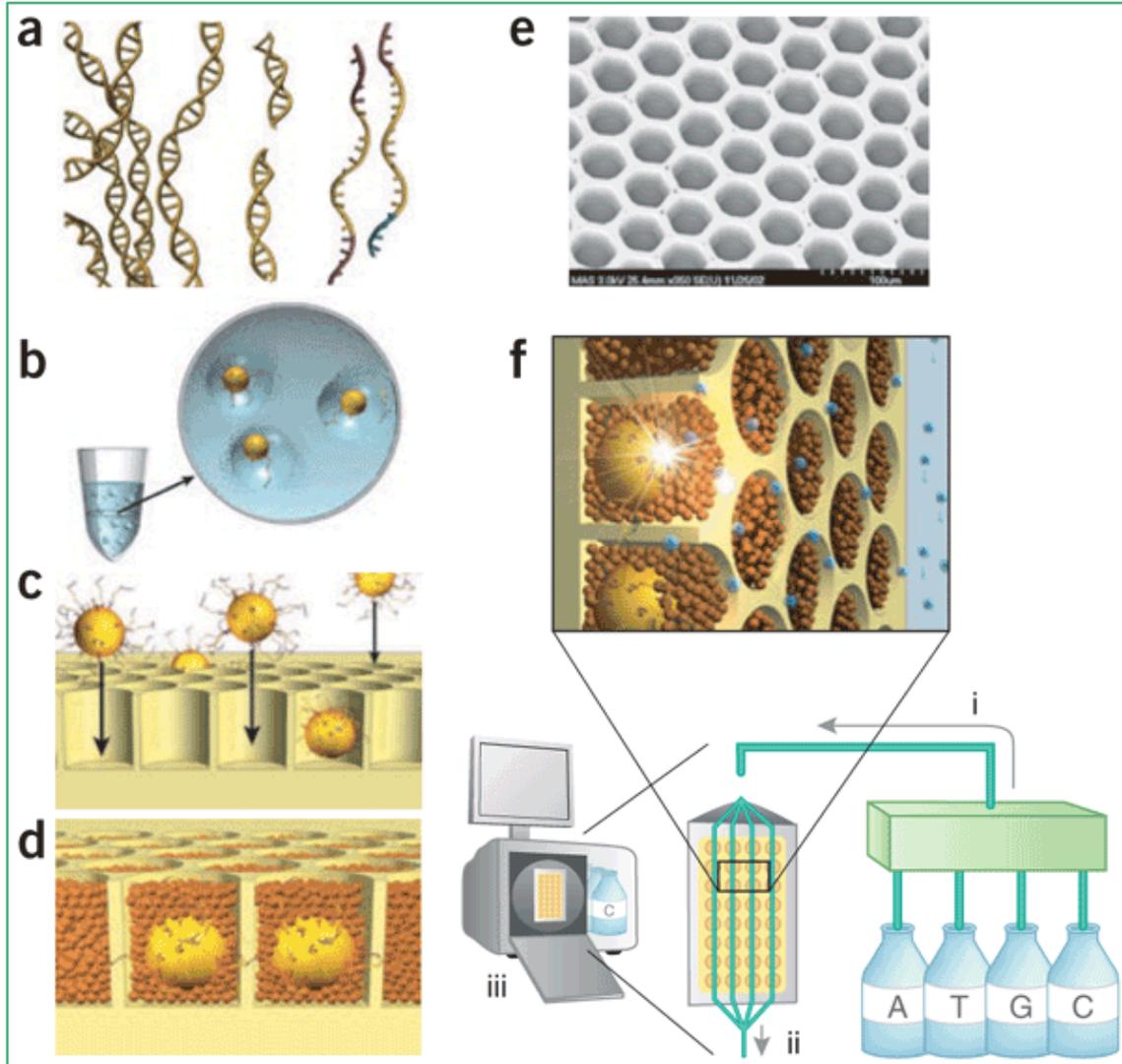


- **Variant viral majoritaire > 20 %**  
Technologie Sanger

- **Variant viral minoritaire < 20 %**  
Nouvelles technologies
  - Séquençage haut débit
  - Séquençage nouvelle génération
  - NGS (Next-Generation Sequencing)
  - Ultra-deep sequencing (UDS)

➔ 1 %

# Techniques de séquençage haut débit



- **Séquençage individuel de chaque amplicon**  
 → clonage automatisé
- **Limites :**
  - Taux d'erreur (PCR et séquençage)
  - Complexité de la préparation des « librairies »
  - Analyses bio-informatiques
  - Coût +++ (nécessité d'un grand volume d'échantillons pour faire baisser le tarif)
- **Impact des variants minoritaires sur la réponse au traitement ?**

# Analyses bio-informatiques (1)



1 chromatogramme

1 prélèvement



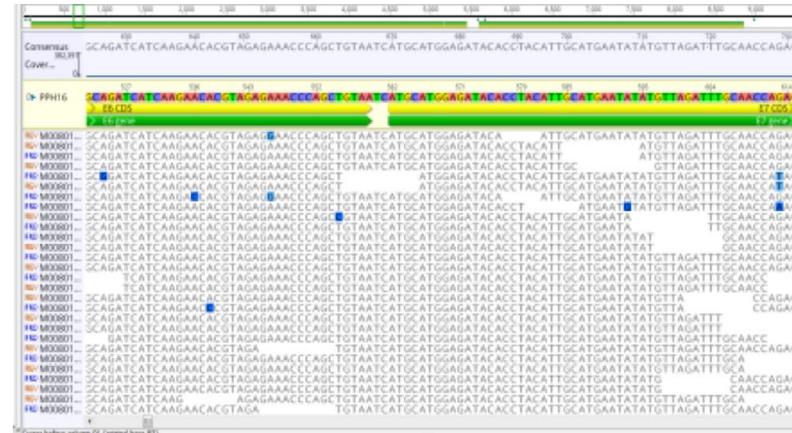
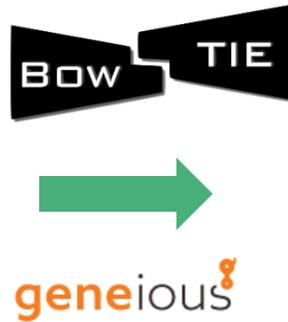
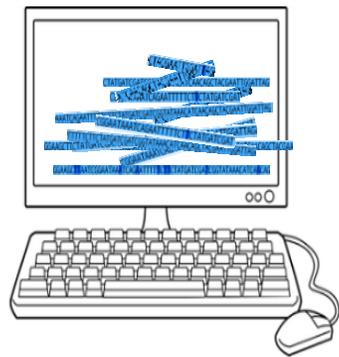
← Sanger

→ NGS



> 100 000 séquences

# Analyses bio-informatiques (2)



- Contrôle qualité et **nettoyage des données de séquençage**
  - FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)
- **Alignements de multiples séquences** contre une référence
  - BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net>)
  - Bowtie 2 ([http://bowtie-bio.sourceforge.net/Bowtie 2/index.shtml](http://bowtie-bio.sourceforge.net/Bowtie%202/index.shtml))
  - Novoalign (<http://www.novocraft.com/products/novoalign/>)
- **Détection de variants**
  - Samtools mpileup / bcftools call : convertir les reads alignés en comptages par position génomique ([http://www.htslib.org/workflow/#mapping\\_to\\_variant](http://www.htslib.org/workflow/#mapping_to_variant))



- **Technologie Illumina**



MiSeq



HiSeq

- Fragment court 150 ou 300 pb
- Pas d'association de mutations possible

- **Technologie PacBio**

Sequel



- Fragment long, taux d'erreur plus élevé
- Génome complet, détection de recombinant

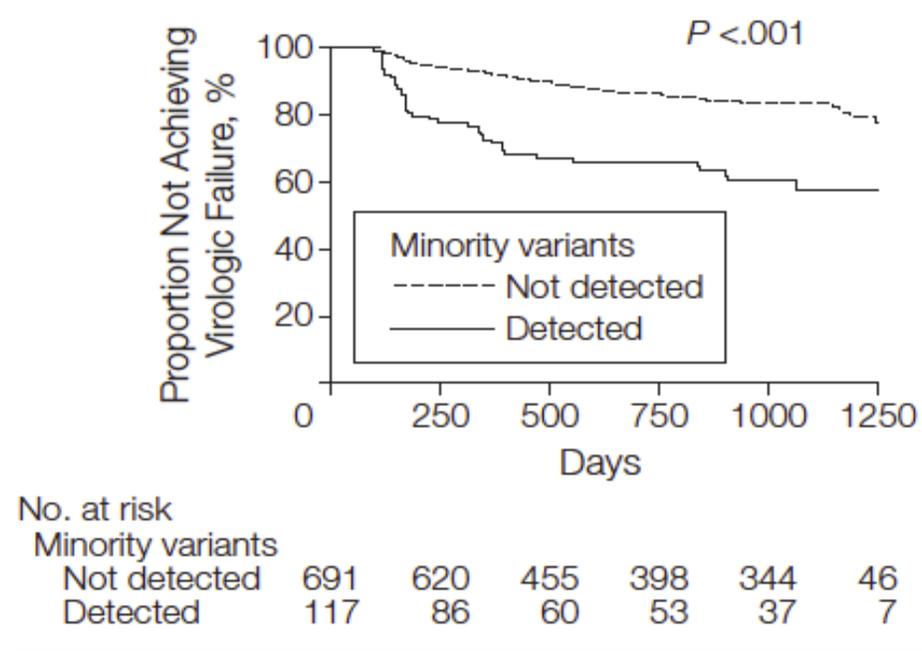


# Impact des variants résistants minoritaires sur la réponse à un traitement à base d'INNTI de 1<sup>ère</sup> génération (EFV, NVP) (1)

- Méta-analyse
- **10 études avec 985 patients**
- Toutes les études ont évalué la présence de VRM :
  - Mutations INNTI : K103N, Y181C (n = 435)
  - Mutations INTI : M184V (n = 228) et K65R (n = 163)
- **Variants résistants minoritaires (VRM) chez 117/808 (14 %) des patients**

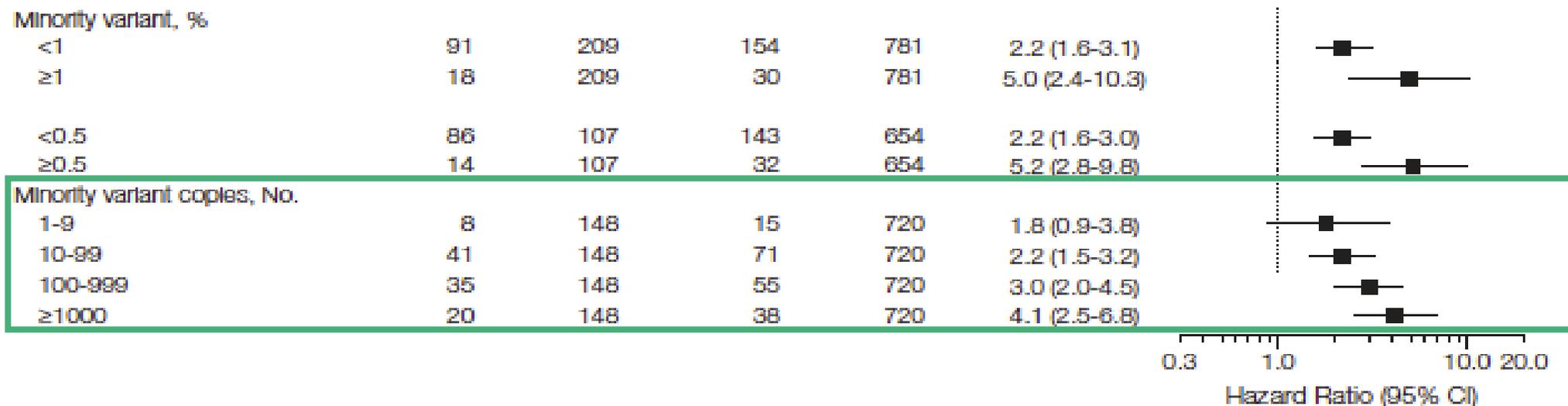
**La présence de VRM aux INNTI à l'initiation du traitement est associée à un risque augmenté d'un facteur 3 d'échec virologique**

**Figure 2.** Kaplan-Meier Curves for Proportion of Patients Without Virologic Failure by Presence of Drug-Resistant HIV-1 Minority Variants



# Impact des variants résistants minoritaires sur la réponse à un traitement à base d'INNTI de 1<sup>ère</sup> génération (EFV, NVP) (2)

- Notion de **charge virale résistante** : % du variant x charge virale plasmatique



*Li et al., JAMA, 2011*

- Association entre le niveau de charge virale résistante et le risque d'échec virologique
- K103N >2000 copies K103N/mL** → risque 40 fois plus élevé d'échec sous INNTI (EFV)
- 1<sup>ère</sup> notion de seuil clinique décrite

*Goodman et al., AIDS, 2011*



# Impact des variants résistants minoritaires sur la réponse à un traitement à base d'INNTI de 2<sup>ème</sup> génération (RPV)

- n = 541 patients initiant une 1<sup>ère</sup> ligne de traitement ARV avec RPV en 3<sup>ème</sup> agent ARV
- Présence de variants minoritaires résistants à RPV (seuil : 1 %)
  - 43 (8,8 %) selon algorithme ANRS
  - 36 (7,4 %) selon algorithme Stanford
- Taux de réponse virologique : 96,9 % à M12
- **VRM à RPV à J0 du traitement non associés à l'échec virologique**
- **Impact de la charge mutationnelle résistante**
  - > 1 700 c/mL : 83,4 % de réponse
  - > 9000 c/mL : 50 % de réponse

Clinical Infectious Diseases

MAJOR ARTICLE



## Impact of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Minority Variants on the Virus Response to a Rilpivirine-Based First-line Regimen

Stéphanie Raymond,<sup>1</sup> Florence Nicot,<sup>2</sup> Coralie Pallier,<sup>3</sup> Pantxika Bellecave,<sup>4</sup> Anne Maillard,<sup>5</sup> Mary Anne Traubaud,<sup>6</sup> Laurence Morand-Joubert,<sup>7</sup> Audrey Rodallec,<sup>8</sup> Corinne Amiel,<sup>9</sup> Thomas Mourez,<sup>10</sup> Laurence Bocket,<sup>11</sup> Agnès Beby-Defaux,<sup>12</sup> Magali Bouvier-Alias,<sup>13</sup> Sidonie Lambert-Niclot,<sup>14</sup> Charlotte Charpentier,<sup>15</sup> Brice Malve,<sup>16</sup> Audrey Mirand,<sup>17</sup> Julia Dina,<sup>18</sup> Héléne Le Guillou-Guillemette,<sup>19</sup> Stéphanie Marque-Juillet,<sup>20</sup> Anne Signorini-Schmuck,<sup>21</sup> Francis Barin,<sup>22</sup> Ali Si-Mohamed,<sup>23</sup> Véronique Avettand Fenoel,<sup>24</sup> Catherine Roussel,<sup>25</sup> Vincent Calvez,<sup>14</sup> Karine Saune,<sup>1</sup> Anne Geneviève Marcelin,<sup>14</sup> Christophe Rodriguez,<sup>13</sup> Diane Descamps,<sup>15</sup> and Jacques Izopet<sup>1</sup>; for the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS) AC11 Resistance Study Group<sup>a</sup>

J Antimicrob Chemother 2019; 74: 718-721

doi:10.1093/jac/dky495 Advance Access publication 6 December 2018

Journal of  
Antimicrobial  
Chemotherapy

## Impact of the mutational load on the virological response to a first-line rilpivirine-based regimen

Chloé Dimeglio<sup>1,2</sup>, Stéphanie Raymond <sup>1,2\*</sup>, Florence Nicot<sup>2</sup>, Nicolas Jeanne<sup>2</sup>, Romain Carcenac<sup>2</sup>, Caroline Lefebvre<sup>2</sup> and Jacques Izopet<sup>1,2</sup> on behalf of the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS) AC11 Resistance Study Group†



# Impact des variants résistants minoritaires sur la réponse à un traitement à base d'inhibiteur de protéase

- n = 110 patients initiant une 1<sup>ère</sup> ligne de traitement ARV avec un IP en 3<sup>ème</sup> agent ARV (DRV/r, n = 94 ; ATV/r, n = 16)
- Présence de variants minoritaires résistants à RPV (seuil : 1 %)
  - 43 (8,8 %) selon algorithme ANRS
  - 36 (7,4 %) selon algorithme Stanford
- 13,8 % en échec virologique
- La présence de variants minoritaires résistants aux IP n'était pas associée à l'échec virologique (10,6 % dans le groupe succès vs 18,8 % dans le groupe échec)

*J Antimicrob Chemother* 2018; **73**: 173–176  
doi:10.1093/jac/dkx366 Advance Access publication 25 October 2017

**Journal of  
Antimicrobial  
Chemotherapy**

**No impact of HIV-1 protease minority resistant variants on the virological response to a first-line PI-based regimen containing darunavir or atazanavir**

Marine Perrier<sup>1</sup>, Benoit Visseaux<sup>1</sup>, Roland Landman<sup>2</sup>, Véronique Joly<sup>2</sup>, Eve Todesco<sup>3,4</sup>, Yazdan Yazdanpanah<sup>2</sup>, Vincent Calvez<sup>3,4</sup>, Anne-Geneviève Marcelin<sup>3,4</sup>, Diane Descamps<sup>1</sup> and Charlotte Charpentier<sup>1\*</sup>

# Impact des variants résistants minoritaires sur la réponse à un traitement à base d'inhibiteur d'intégrase

- **Patients et méthode** : séquençage haut débit intégrase à J0 chez 65 patients
  - 31 en succès virologique (RAL, n = 3 ; EVG, n = 15 ; DTG, n = 13)
  - 34 en échec (RAL, n = 11 ; EVG, n = 10 ; DTG, n = 13)
- **Résultats**
  - Pas de différence dans la prévalence des VRM aux INI à J0 entre les patients en échec (14,7 %) et ceux en succès (12,9 %)
  - Mutations INI à l'échec (n = 17) : aucune détectée à J0 comme VRM
  - Aucun des VRM à J0 n'a émergé comme virus majoritaire à l'échec

## Exemples de réponse virologique chez 2 patients avec des VRM INI à J0

Patients	ARV à l'échec	CV à J0 (c/ml)	CV à l'échec (c/ml)	VRM à J0	Mutations INI à l'échec (Sanger)	C <sub>24</sub> INI à l'échec (ng/ml)
Echec	ETR/RAL bid	775	1 000	S147G (1,8 %)	N155H (100 %)	91 (efficace)
Succès	EVG/c/FTC/TDF	1 515	-	Q148H (13,1 %)	-	-

- **Conclusions**
  - Pas d'impact de la présence de VRM à J0 sur la réponse virologique
  - Pas d'émergence des VRM INI détectés à J0 en cas d'échec



# Variants résistants minoritaires à l'échec ? INNTI

- Patients en échec de TDF/FTC/Rilpivirine *Todesco E et al., J. AIDS, 2016*

**TABLE 1.** Resistance Mutations Detected at Baseline (Sanger Sequencing) and at Virological Failure (Sanger Sequencing, UDS)

	Before the Switch		At Failure	
	Sanger Sequencing	Sanger Sequencing	Sanger Sequencing	Mutations Detected by UDS Only (% , Mutational Load)
Patient 1				
NRTI	D67N L74I V75L M184I	No sample at failure	No sample at failure	
NNRTI	V90I K103N			
Patient 2				
NRTI	—	—	—	
NNRTI	G190A	G190A	—	
Patient 3				
NRTI	D67N K70R M184V T215I K219Q	D67N K70R M184V T215I K219Q	—	
NNRTI	K103N	K103N <b>V179I</b>	<b>Y181C (9.8%, 247 cp/mL)</b>	
Patient 4*				
NRTI	T215I	T215N/S/Y†	<b>M184I (1.2%)†</b>	
NNRTI	K103N	K103N	<b>M230I (2.0%)†</b>	

- Patient en échec de RAL + Etravirine

*Soulié C et al., EACS 2017, Abs. PS6/4*

Génotype TI J0 RAL + ETR		Génotype TI à l'échec	
Sanger	NGS	Sanger	NGS
K103N	<b>Y181C (4,9 %)</b>	K101E/H/I/P/R Y181C/I G190A/S	K103N (12,5 %) K103S (2,2 %)
Génotype IN J0 RAL + ETR		Génotype IN à l'échec	
Sanger	UDS	Sanger	UDS
WT	WT	T66I	<b>Y143C (2,4 %)</b> <b>Q148R (6,2 %)</b> <b>N155H (18,8 %)</b>

- **Patients et méthode**

- 134 patients en échec d'un traitement à base d'INI (RAL, n = 65 ; EVG, n = 20 ; DTG, n = 49)
- CV médiane à l'échec = 459 c/ml (IQR = 130 - 4 687)
- Durée du traitement INI = 6 mois (IQR = 3 - 15)

- **Résultats**

- Mutation de résistance aux INI détectée dans 40 % des échecs (Sanger)
- Présence de VRM aux INI à l'échec non détectés en Sanger :
  - 9 % des patients pour un seuil de détection de VRM à 5 %
  - 18 % des patients pour un seuil de détection de VRM à 1 %
- Changement d'interprétation du niveau de sensibilité génotypique avec NGS :
  - Sensible → Résistance possible : +7 %
  - Résistance possible → Résistance : +13 %

# Variants résistants minoritaires à l'échec ? INI (2)

## Mutations intégrées à l'échec par séquençage Sanger et haut débit

Séquençage	Proportion du virus	Mutations détectées (chez n patients)													
		T66A/I	L74I/M	E92Q	T97A	E138 A/K	G140 A/C/S	Y143 C/H/R	S147G	Q148H/R	S153F	N155H	E157Q	S230G/R	R263K
<b>Sanger</b>	-	3	9	4	6	4	7	6	4	12	0	24	3	0	0
	> 20 %	4	9	5	6	4	7	6	4	12	0	25	3	1	0
<b>Haut débit</b>	5 - 20 %	1	0	2	2	2	0	1	0	1	1	0	0	0	1
	1 - 5 %	5	0	1	1	2	1	2	2	1	0	2	0	1	1
<b>Total</b>		<b>10</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>14</b>	<b>1</b>	<b>27</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

Pour le séquençage haut débit > 20 % comparaison avec le séquençage Sanger

Pour le séquençage haut débit 1 - 5 % ou 5 - 20 % n mutations non détectées en Sanger

- Un plus grand nombre de mutations de résistance aux INI est détecté par séquençage haut débit comparé au séquençage par la technologie Sanger
- Impact de la présence de ces VRM sur le traitement ultérieur ?



# Variants résistants minoritaires dans les PBMC ?

- **Génotype Sanger PBMC**

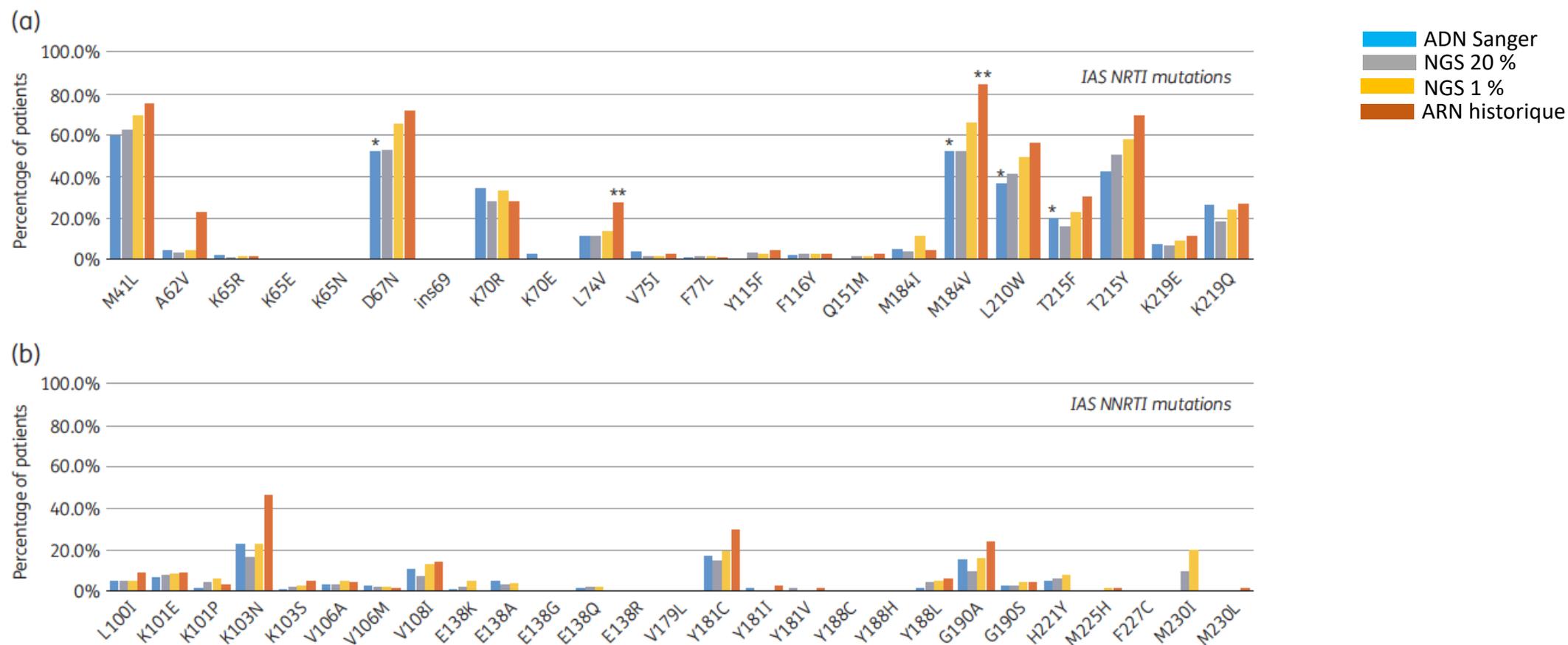
- Patient avec CV indétectable pour lequel pas de génotype et/ou histoire thérapeutique inconnue (échec antérieur ?)
- Bonne valeur prédictive positive mais mauvaise valeur prédictive : si résultat virus sauvage, ça n'exclut pas la présence de virus résistants archivés (proportion minoritaire, autres réservoirs que les PBMC, ...)

- **Apport du séquençage haut débit pour l'ADN proviral**

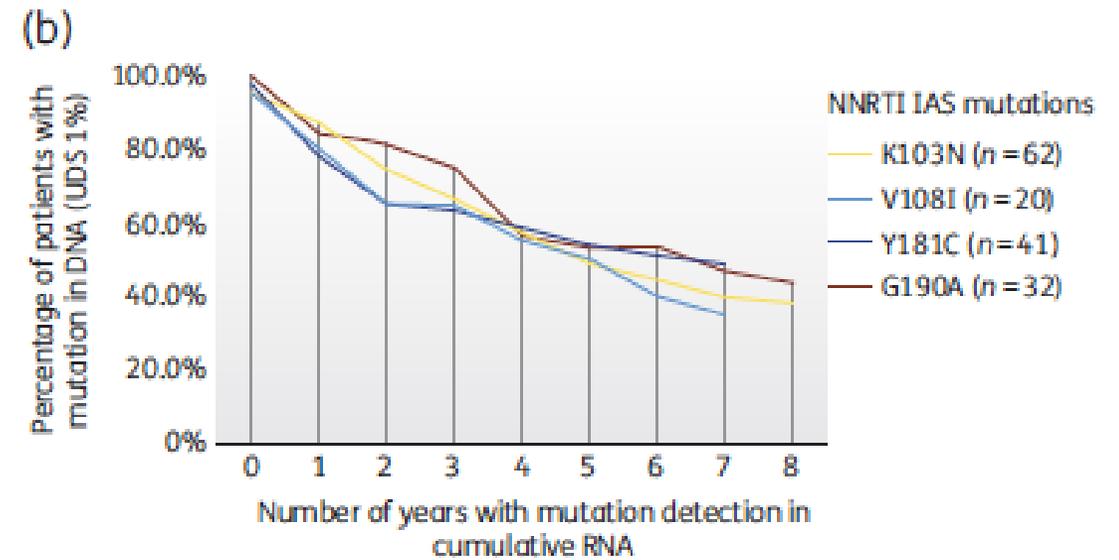
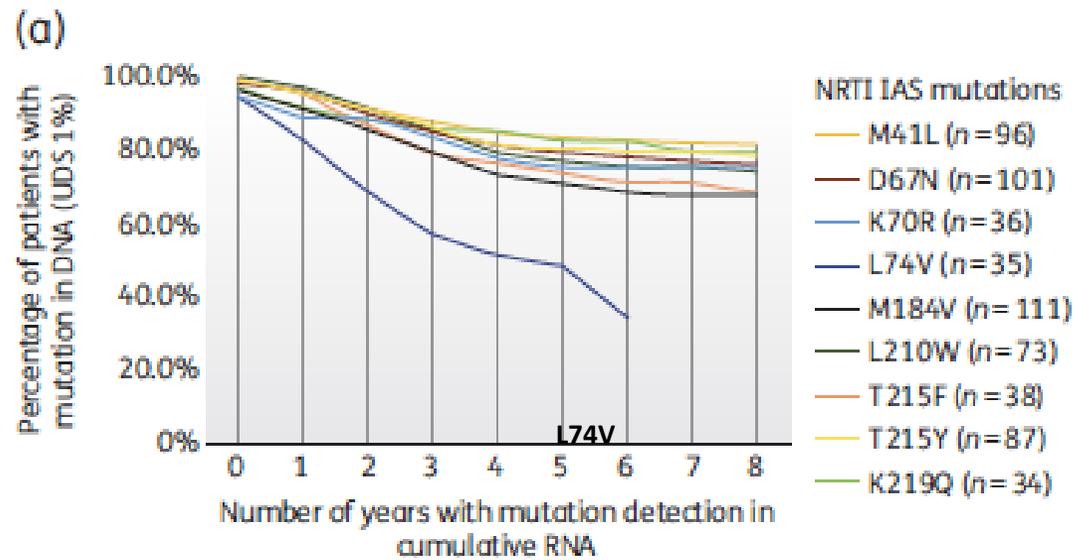
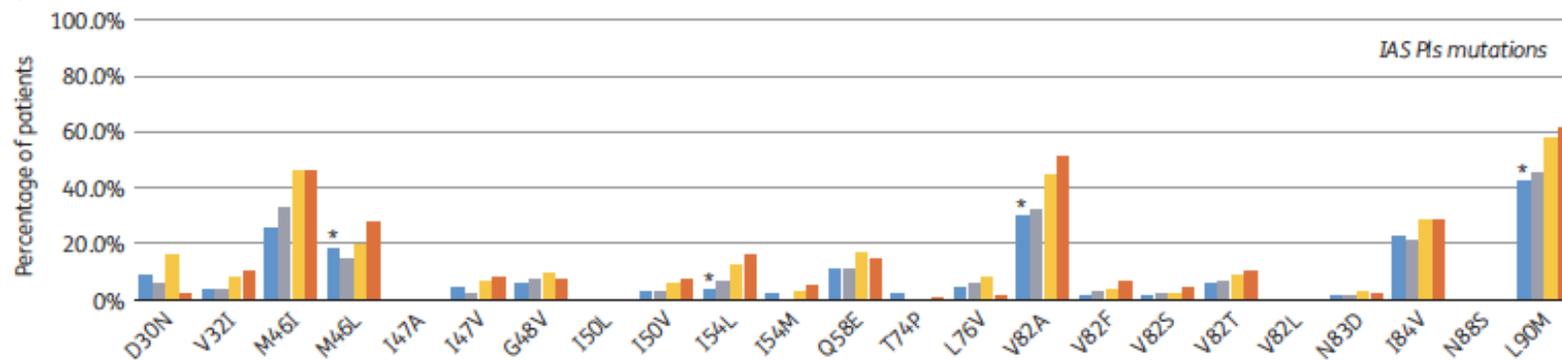
- Détecter les provirus présents en proportion de 1 % à 20 % : meilleur reflet de l'archivage des mutations de résistance en cas d'échec antérieur ?

# Variants résistants minoritaires dans les PBMC ?

- 169 patients avec des échecs antérieurs (mutations génotypes ARN historiques) désormais CV < 50 c/mL
- Intervalle médian depuis le dernier génotype ARN plasma : 2,6 ans (IQR = 1,7 - 3,6)
- NGS obtenu pour 133 échantillons pour la RT (79 %)



# Variants résistants minoritaires dans les PBMC ?



**Figure 3.** Percentage of patients with major IAS RAMs detected in DNA by UDS 1% according to the timing of their last detection in plasma RNA genotypes: NRTIs (a), NNRTIs (b) and PIs (c). The mutations shown are those detected in at least 20 patients. The number of patients is indicated in the legend.

- **Technologies NGS** : lourdes, couteuses, et nécessité analyses bio-informatiques, en constante évolution
- **Impact des variants minoritaires résistants**

<b>Initiation</b>	Pas d'impact sur la réponse virologique (sauf INNTI 1 <sup>ère</sup> génération et CV élevée)
<b>Echec</b>	↗ du nombre de mutations à l'échec chez certains patients si NGS mais impact sur traitement ultérieur non évaluée
<b>ADN proviral</b>	- Meilleure détection de l'archivage des mutations en cas d'échec antérieur - Difficulté d'interprétation de la présence de virus défectifs présents dans les PBMC



- Taux d'erreur élevé
- Génome complet, recombinant

