



Édition 2019
du 4 au 7 avril

COURS

Recherche / Clinique

Grand-Bassam
Côte d'Ivoire





COURS Recherche / Clinique

Édition 2019 du 4 au 7 avril Grand-Bassam - Côte d'Ivoire



Outils virologiques et résistance aux ARV

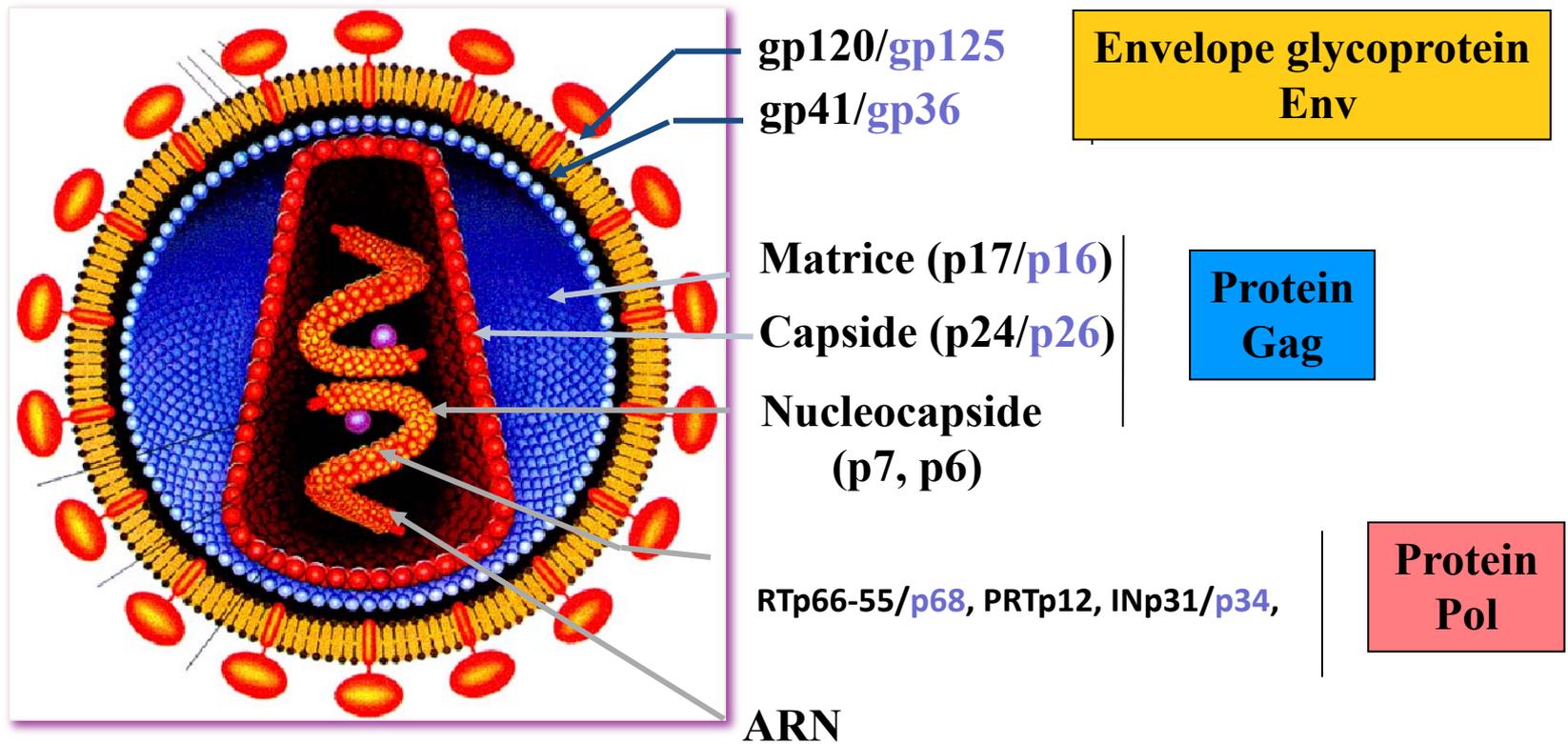
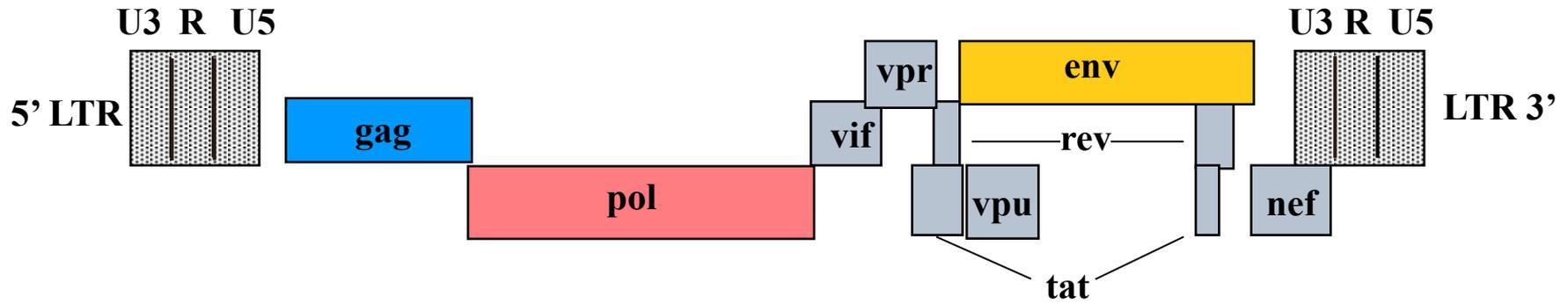
Pr. Constance Delaugerre

Virologie, Hôpital Saint Louis, Université Paris Diderot

constance.delaugerre@aphp.fr

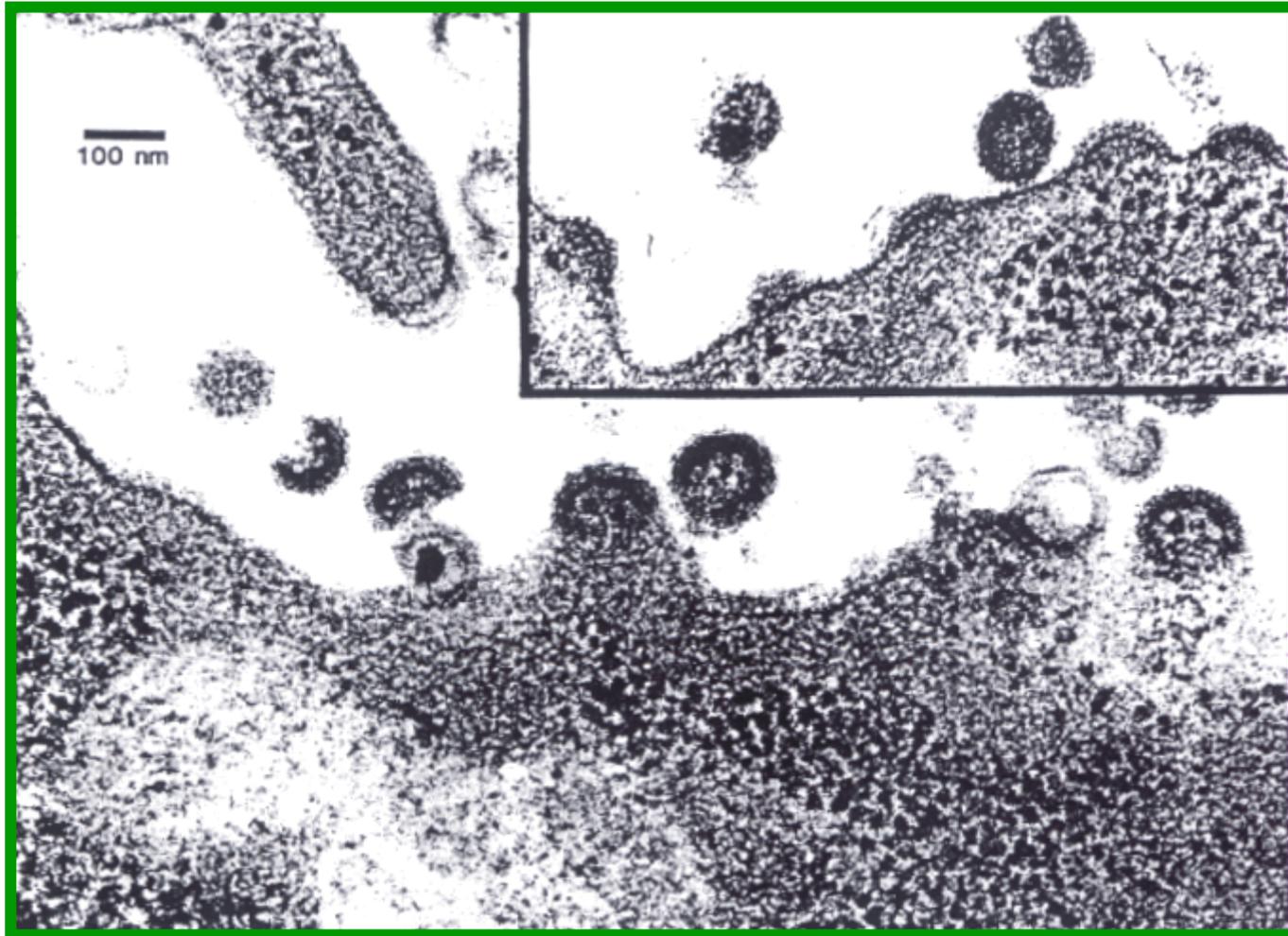


Structure et génome du VIH



HIV1/HIV2

Microscopie électronique d'une coupe de cellule produisant du VIH



Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W and Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* 1983 ; 220 : 868-71

Grande diversité génétique

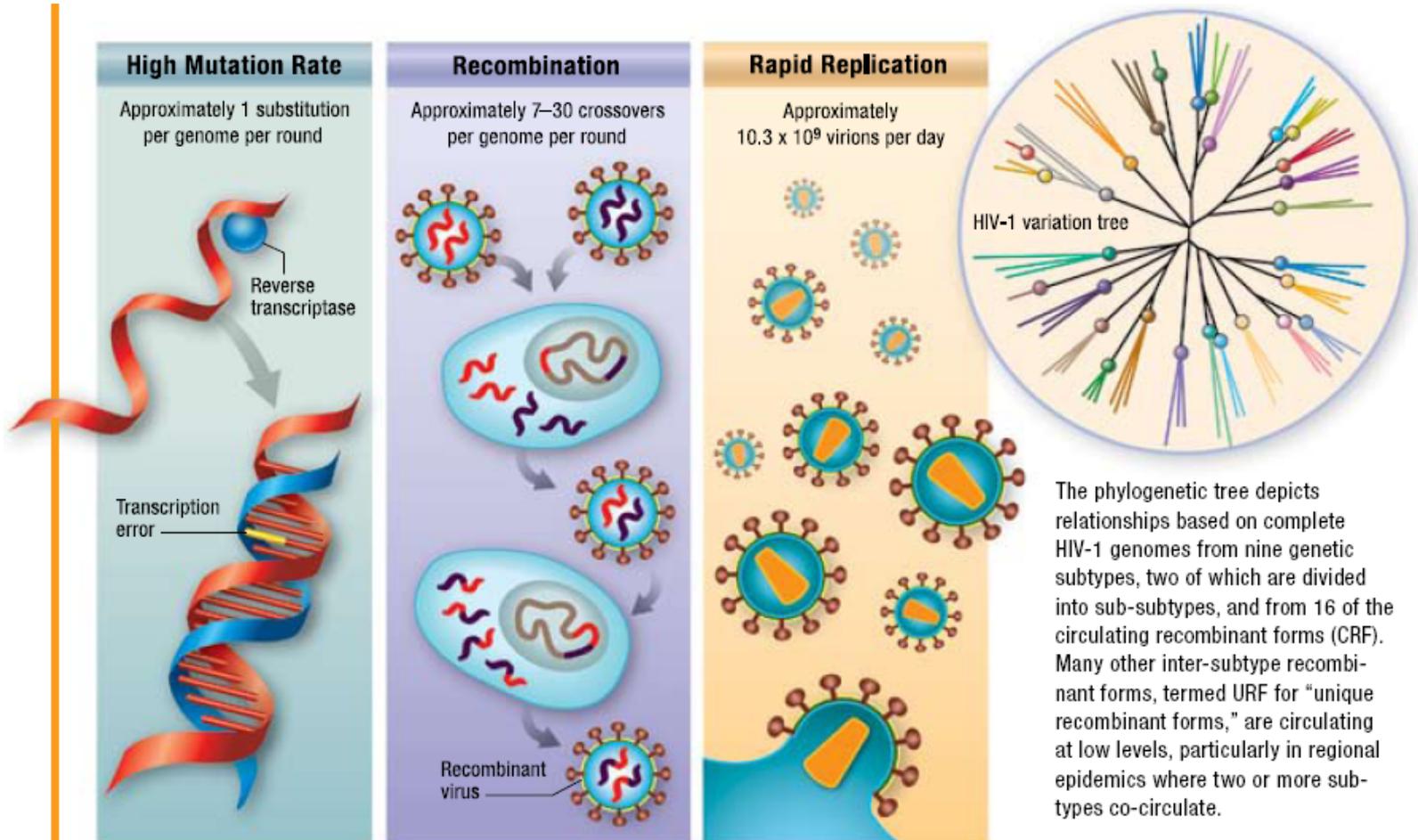


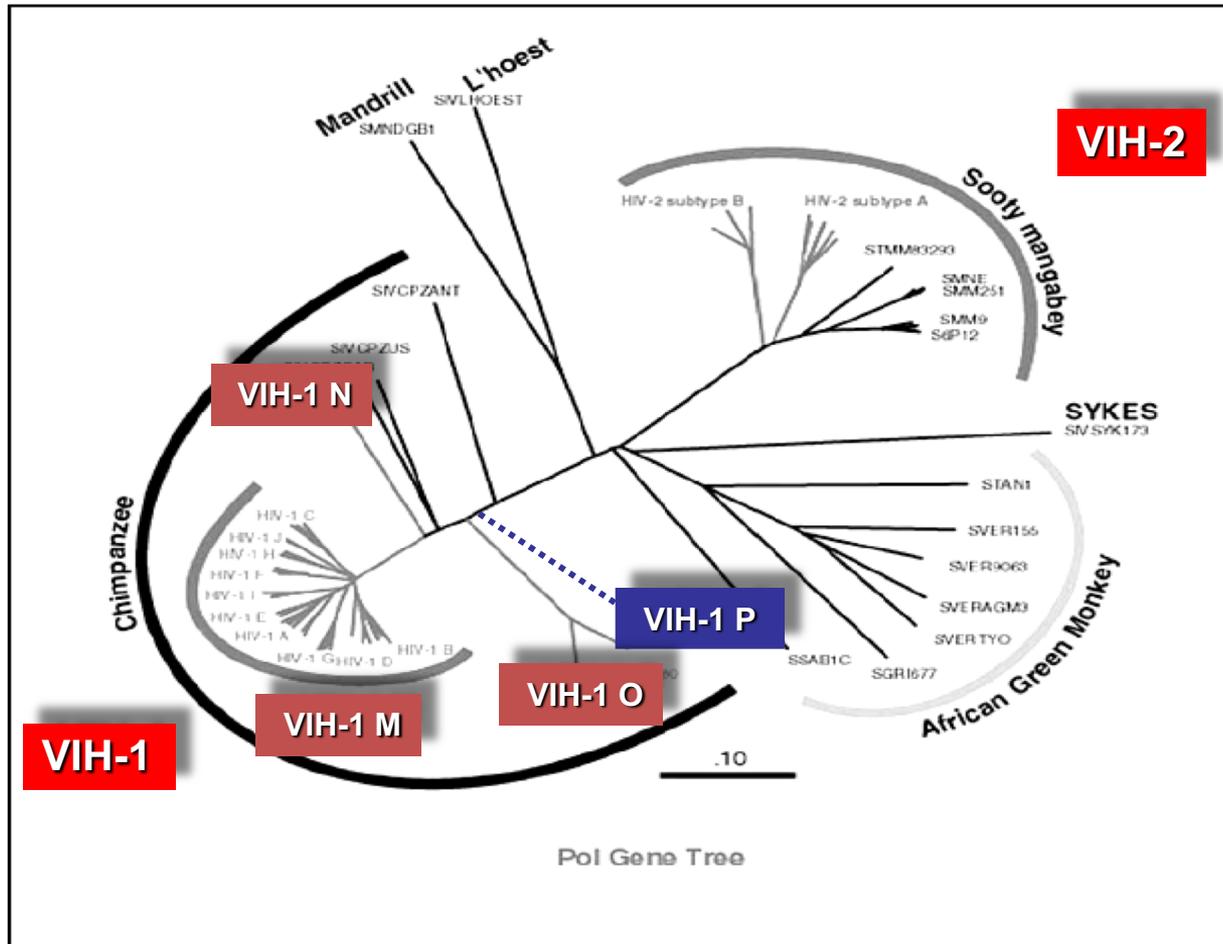
Figure 10 Causes of HIV Variability and Impact on the Circulating Virus

The phylogenetic tree depicts relationships based on complete HIV-1 genomes from nine genetic subtypes, two of which are divided into sub-subtypes, and from 16 of the circulating recombinant forms (CRF). Many other inter-subtype recombinant forms, termed URF for “unique recombinant forms,” are circulating at low levels, particularly in regional epidemics where two or more subtypes co-circulate.

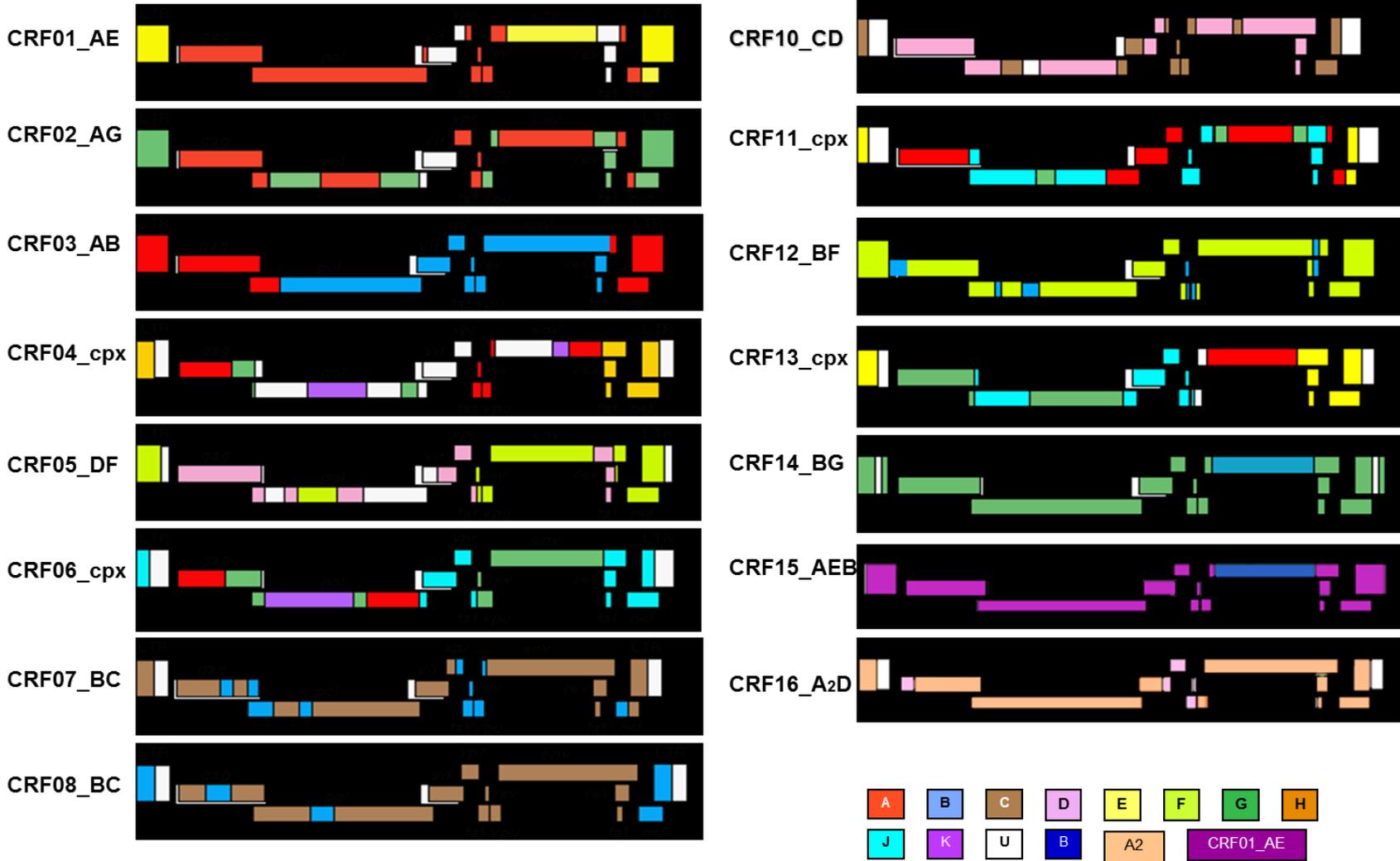
Tree source: From the laboratory of Francine McCutchan, Henry M. Jackson Foundation.

Conséquences directes : mise en défaut des outils de diagnostic et de suivi, l'élaboration d'un vaccin, l'émergence de la résistance aux antirétroviraux

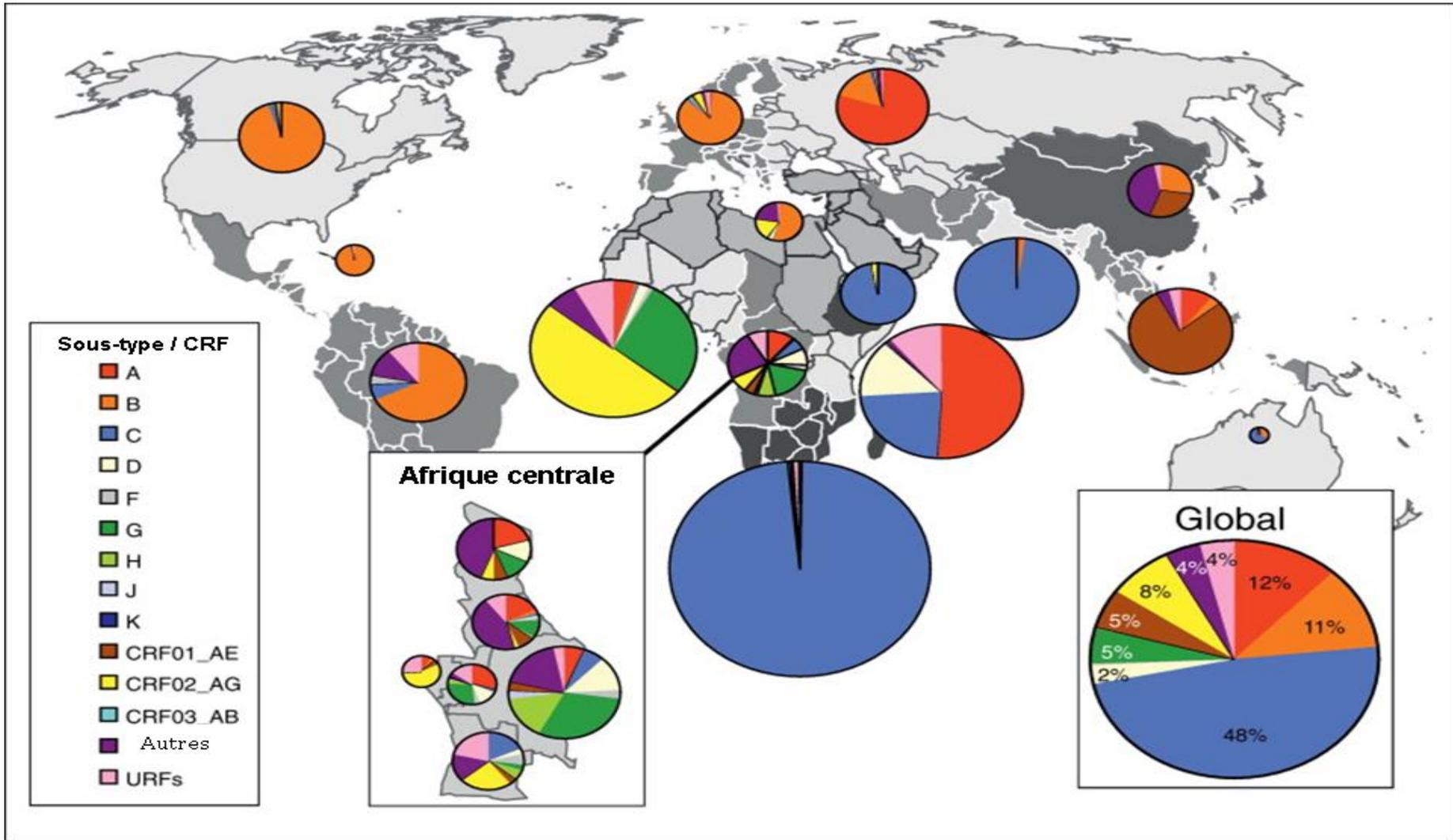
Diversité & origine des VIH



HIV-1 groupe M : Formes recombinantes (CRF)

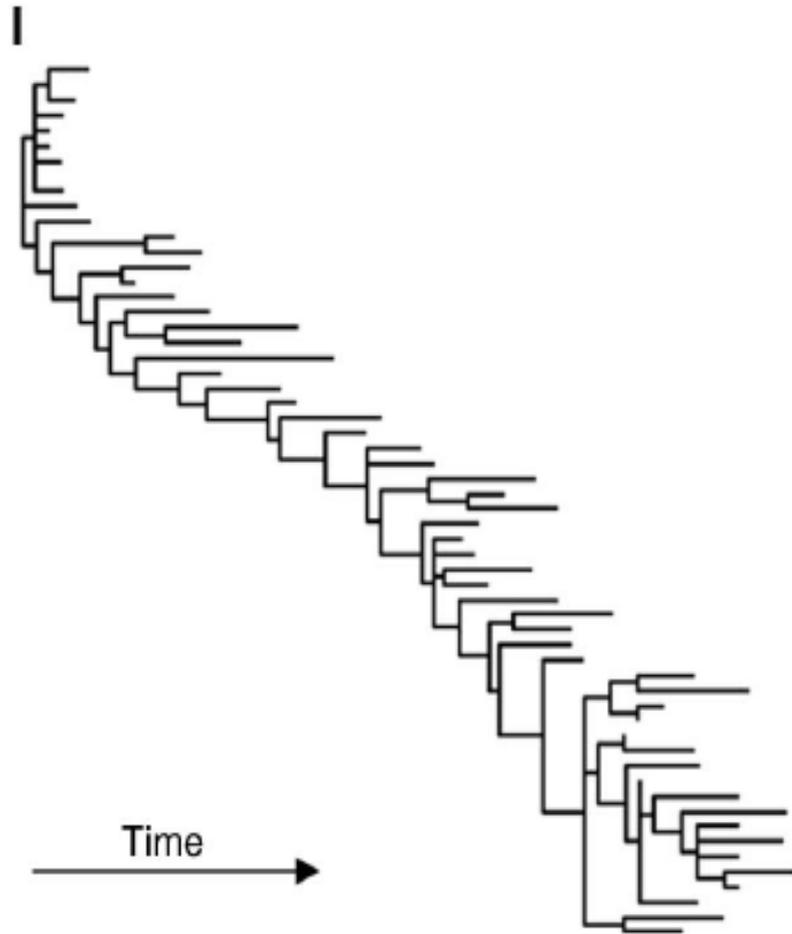


HIV-1 groupe M



Sous type C: > 50% des infections
sous-type B : 10% des infections

Intra- and Inter- Individuals Variations

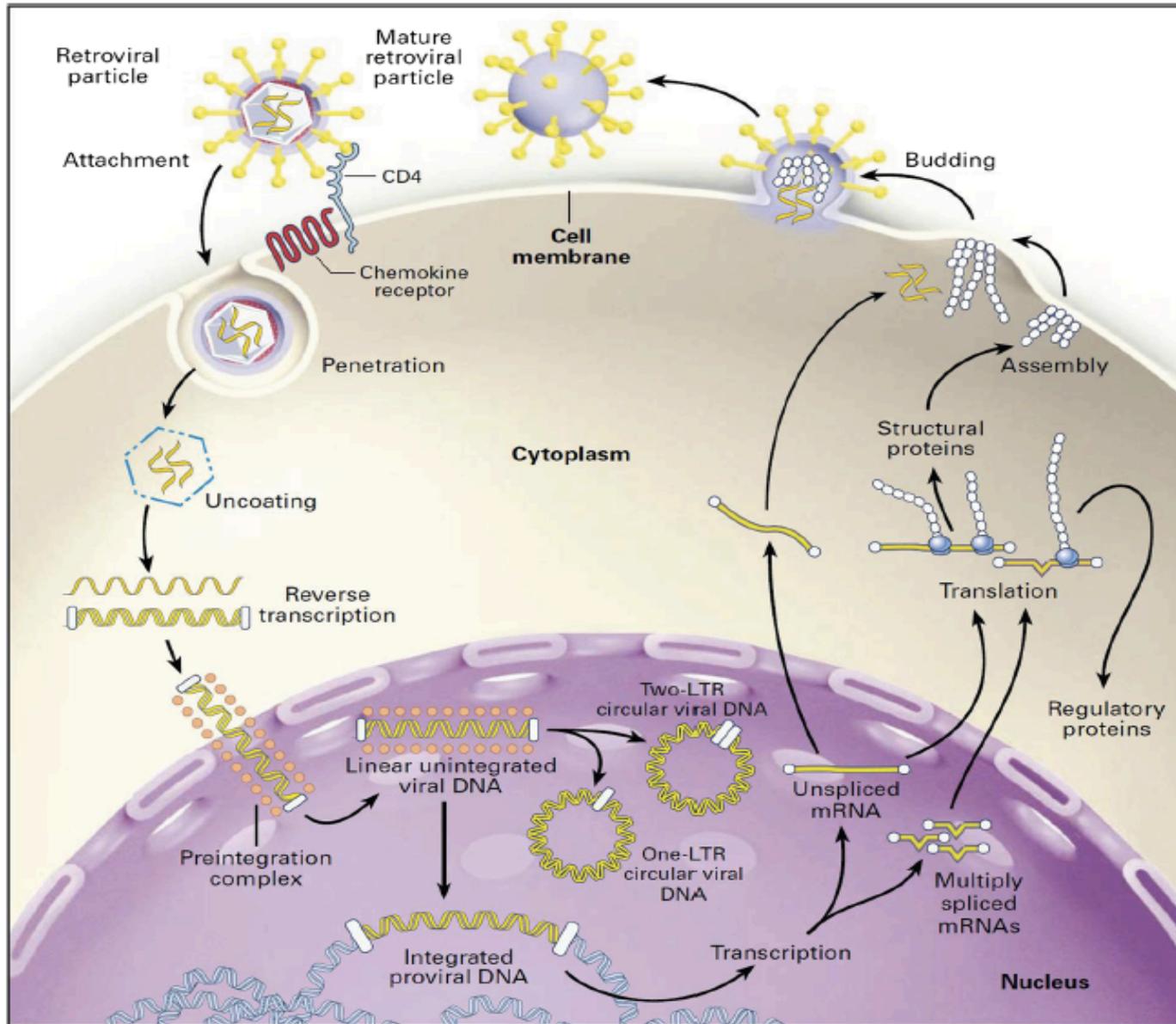


HIV within host phylogeny



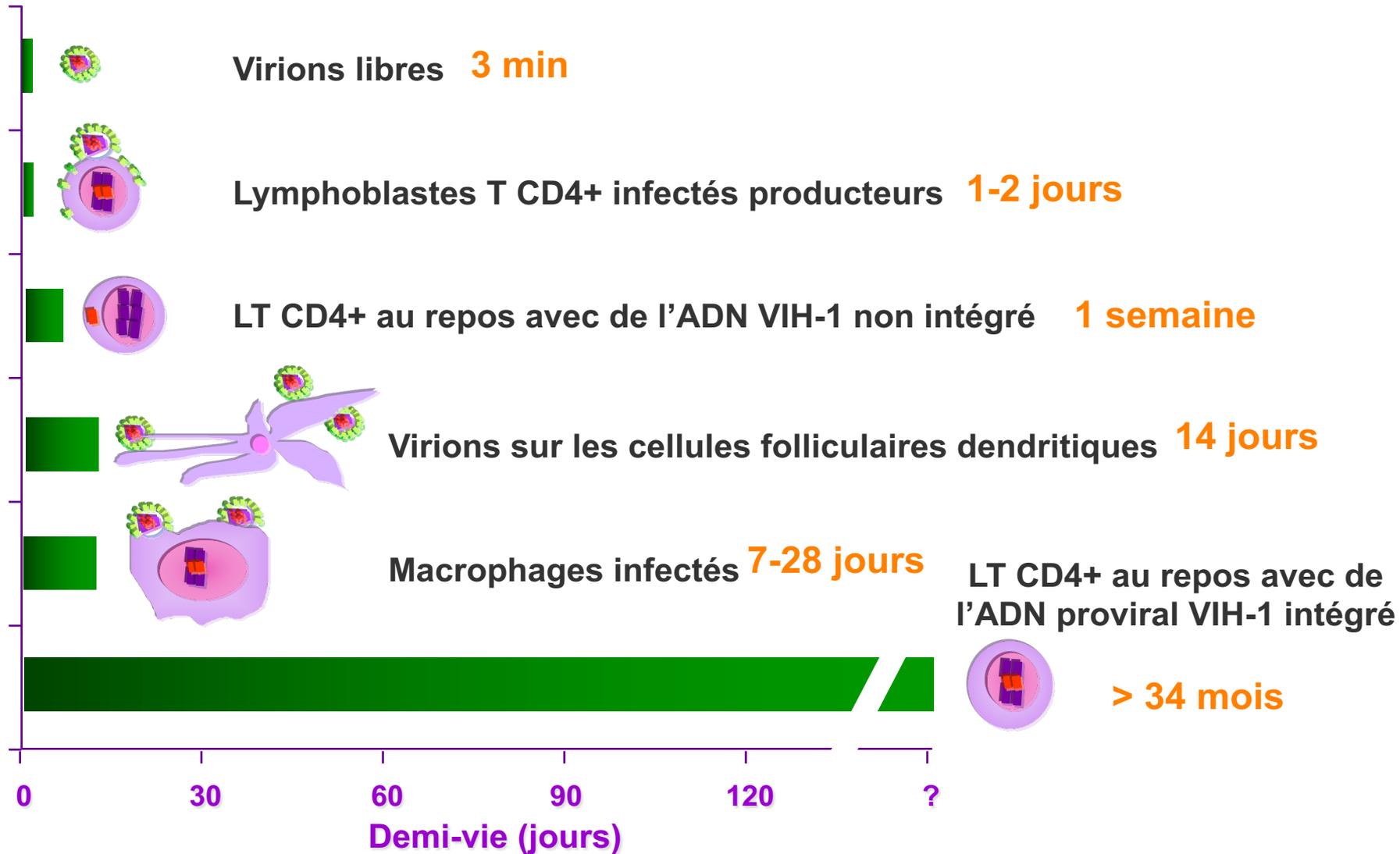
HIV population phylogeny

Cycle de réplication



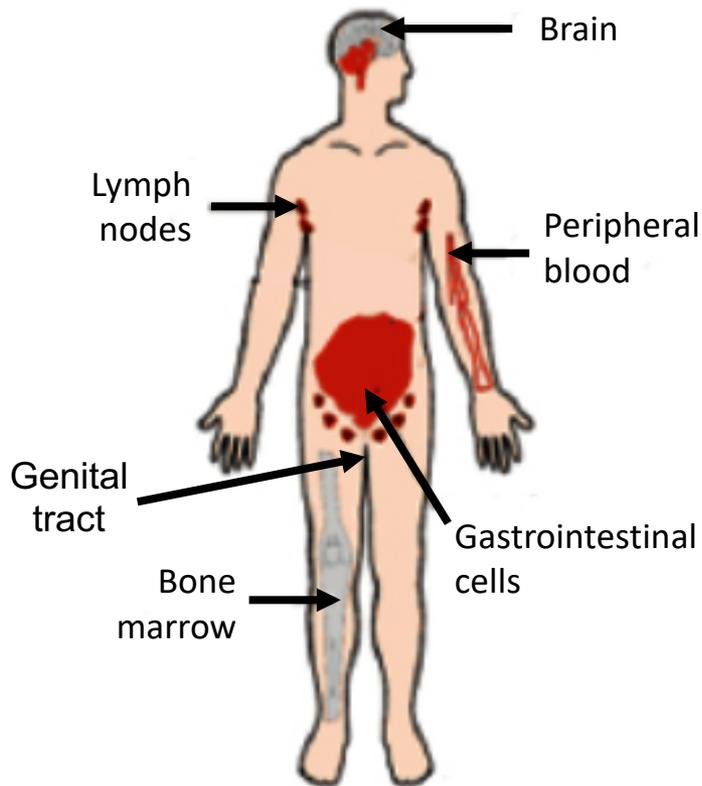
Les cellules cibles

Récepteur CD4-Corécepteur CCR5/CXCR4



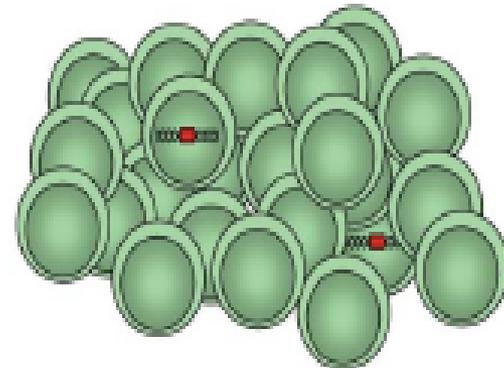
Réservoir viral

Tissus lymphoïdes/compartiments



Réservoirs cellulaires

- ADN du VIH intégré dans le génome cellulaire
- Latence virale dans les cellules quiescentes



Conséquence : pas d'éradication avec les traitements antirétroviraux actuels



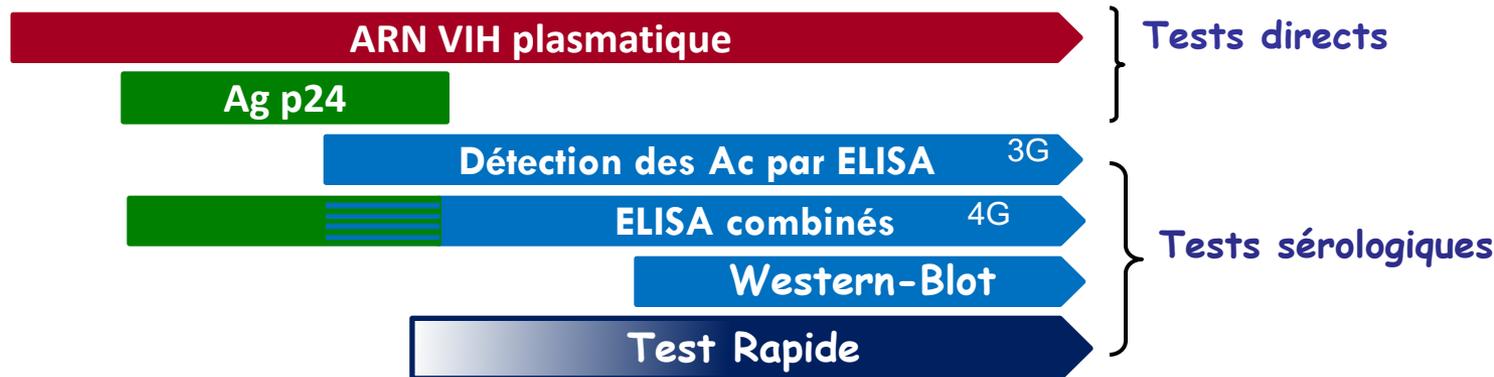
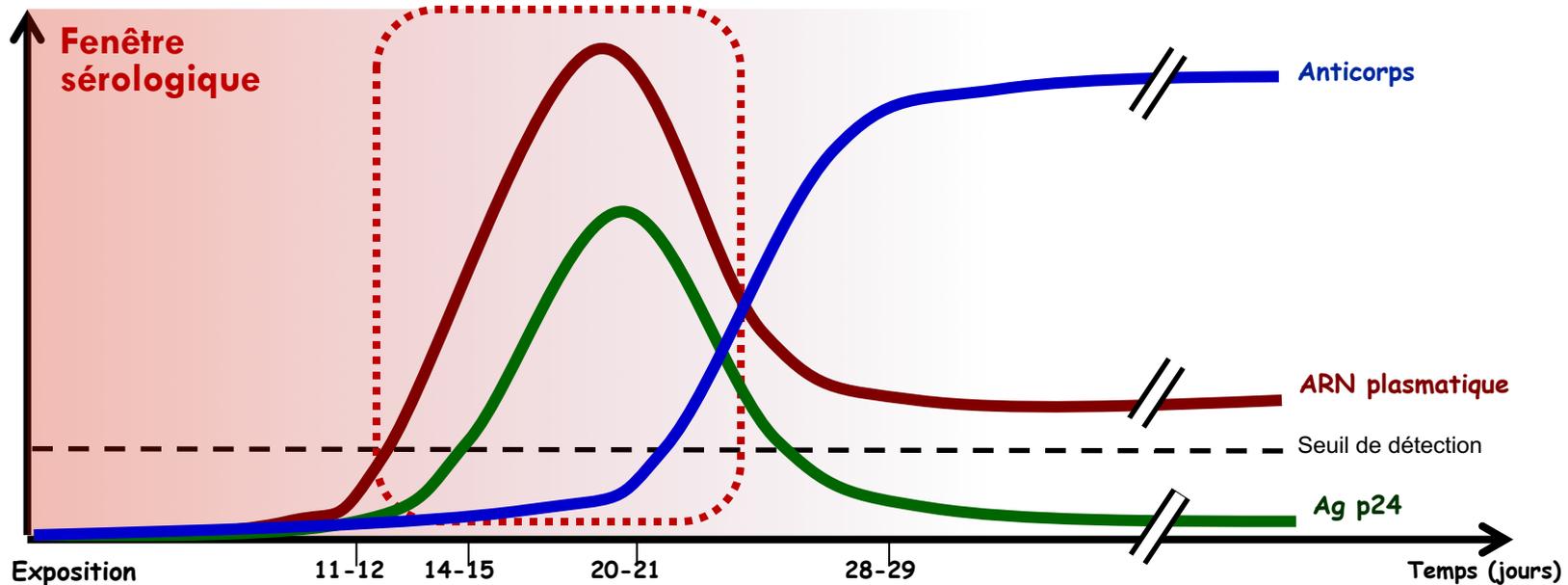
COURS Recherche / Clinique

Édition 2019 du 4 au 7 avril Grand-Bassam - Côte d'Ivoire



Outils de diagnostic

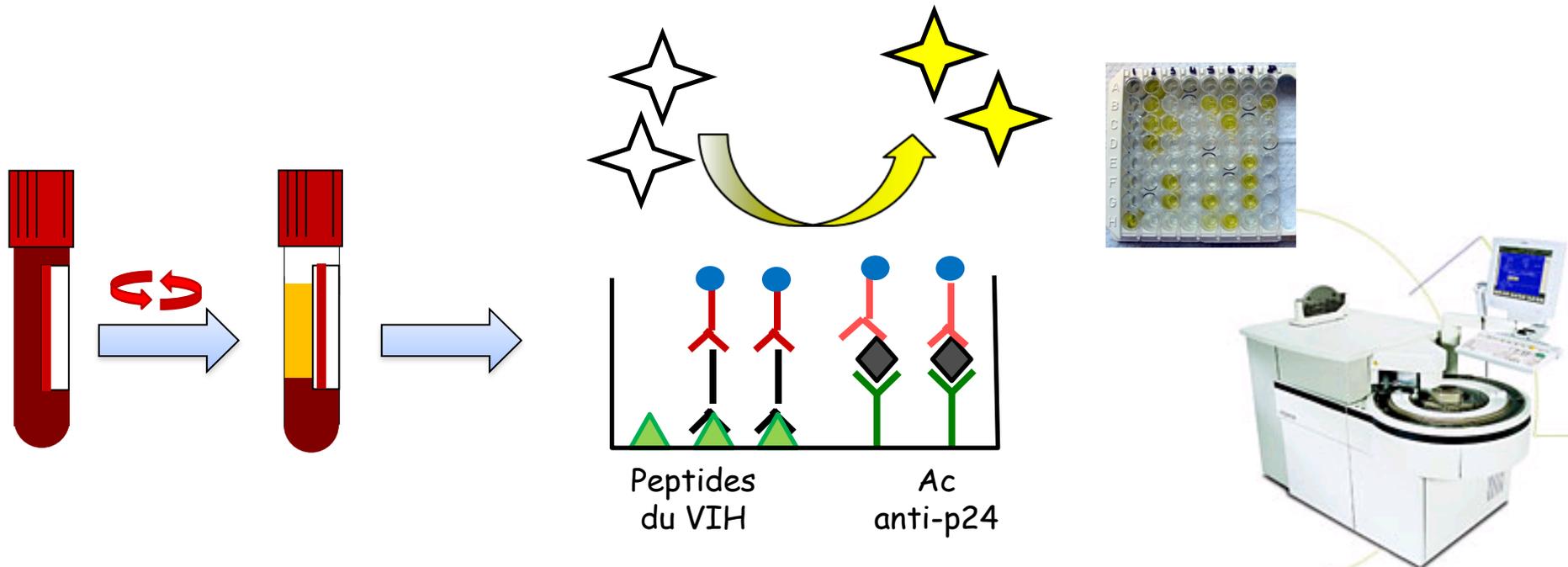
Diagnostic de l'infection par le VIH : les marqueurs



Diagnostic de l'infection par le VIH :

la sérologie ELISA 4G

- **E.L.I.S.A.** (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay), **combiné de 4^e génération** : détecte anticorps anti VIH-1 (groupes M, O), anti VIH-2 et l'Ag p24 (**seuil < 2 UI/mL**)

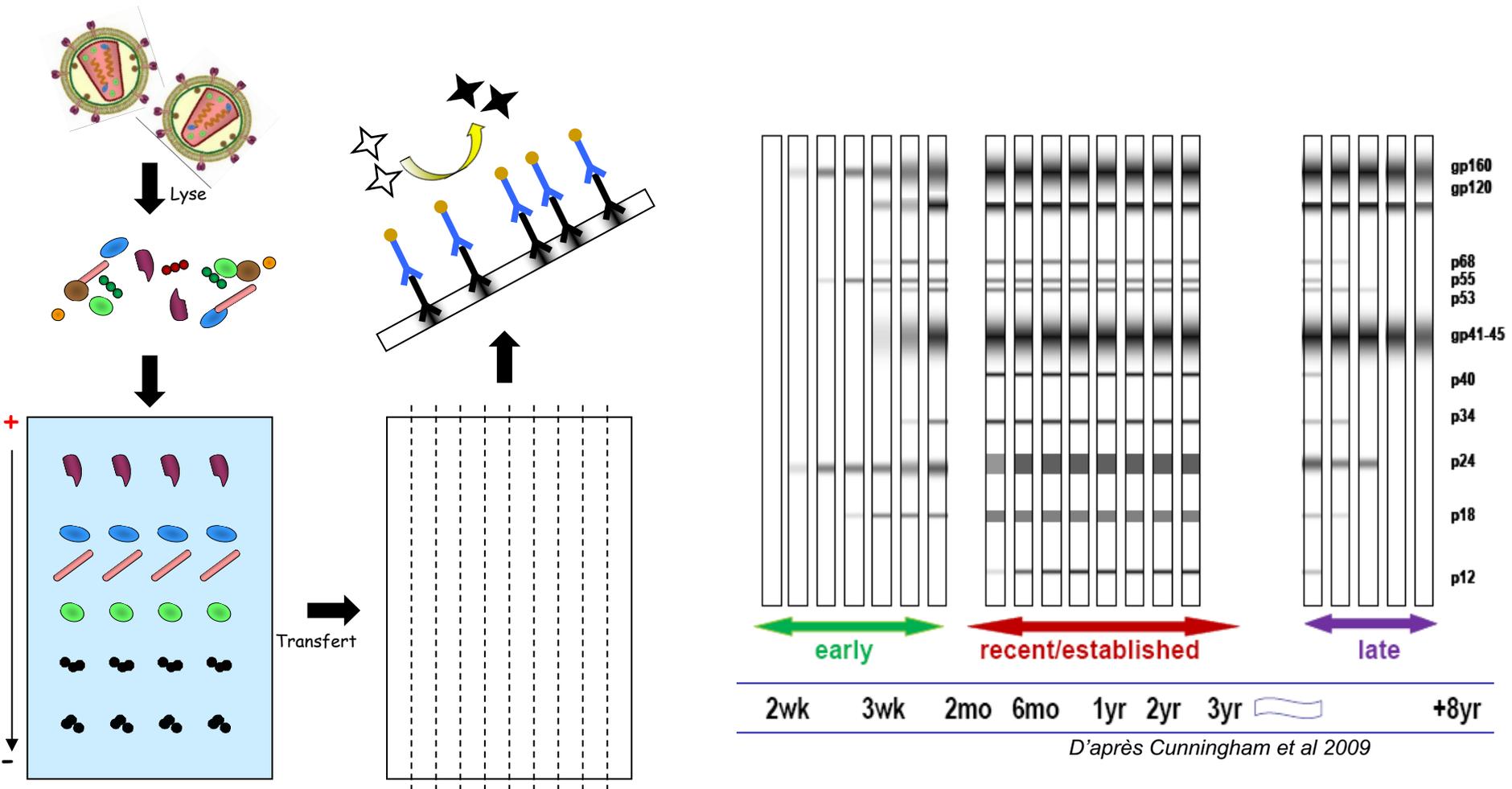


- Très sensible, automatisé, rapide (0,5 - 2h), économique
- Réponse POS/NEG : pour AG+AC, certains tests AG et AC

Diagnostic de l'infection par le VIH :

Confirmation par Western-blot

- **Séropositivité certaine** : 2 anticorps « env » + 1 anticorps « gag » ou « pol »
- **Très spécifique**, informe sur l'évolution de l'infection



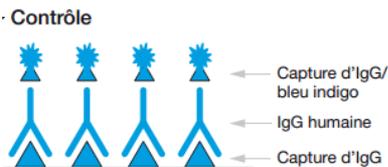
D'après Cunningham et al 2009

Diagnostic de l'infection par le VIH : **le Test Rapide Anticorps**

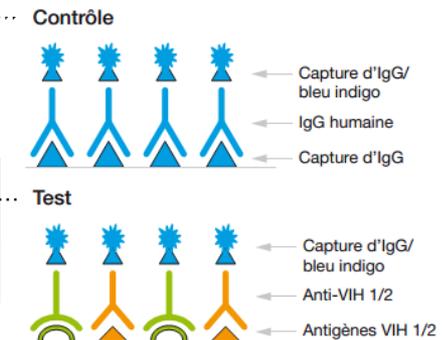
- **T.R.O.D.** (Test Rapide d'Orientation Diagnostique)



Négatif



Positif



Résultat entre
5 et 30
minutes

Réalisable en
dehors d'un
laboratoire

Risque de faux négatifs
dans les infections
récentes (<3 mois)

Doit toujours être
confirmé par une
sérologie ELISA

De nombreux tests...pas tous validés

- 
- A** = Prix attractif (*Affordable*)
- S** = Sensible (*Sensitive*)
- S** = Spécifique (*Specific*)
- U** = Facilité d'utilisation en un minimum d'étapes (*User-friendly*)
- R** = Robuste et rapide (*Robust and rapid*)
- E** = Sans équipement spécifique (*Equipment-free*)
- D** = À disposition de tous ceux qui en ont besoin (*Deliverable*)

**EVALUATION SUR SANG CAPILLAIRE/SALIVE
DIFFICILE A METTRE EN PLACE**

L'autotest : le TROD à domicile



Matrice : SALIVE



Matrice : SANG CAPILLAIRE



Matrice : SANG CAPILLAIRE



Avantages des POC Tests (points de service)

- Réalisés au “lit de la personne”
 - Cabinet du médecin
 - Urgences, unités de soins intensifs
 - Centre de dépistage, association habilitée
 - Autotests (France autorisation 2015)
 - Implémenté en 1^{ère} intention dans de nombreux pays
- Utilisation de nombreuses matrices biologiques
 - Sérum/Sang total capillaire prélevé au bout du doigt
 - Liquide cravculaire
- Autres Infections +++
 - VHC
 - AgHBs, Ac antiHBs
 - Syphilis
 - Couplé HIV/syphilis

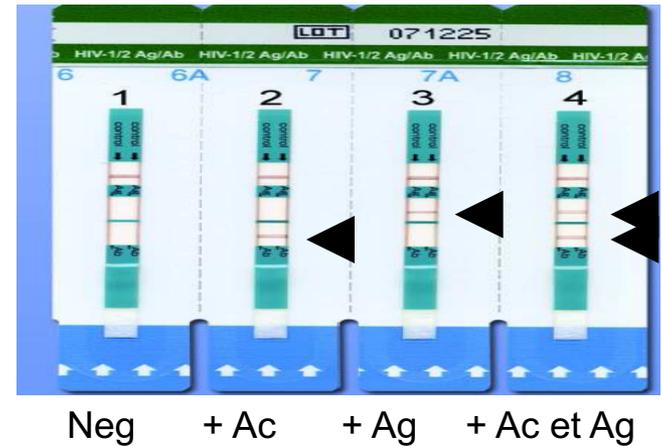


Limites des TROD anticorps

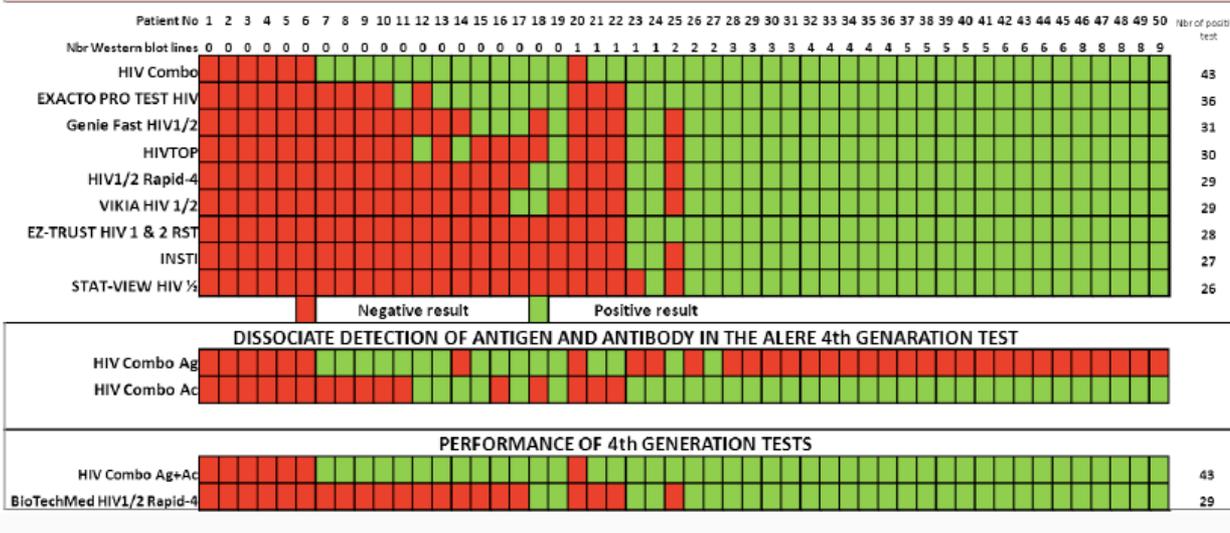
- Sensibilité dépend de la matrice :
Salive < sang total < sérum
 - Risque de faux négatifs dans les infections récentes
 - Faux positifs TROD : 1 à 5 %
 - Aucune traçabilité
 - Attention bande « contrôle » non immunologique (réactif avec de l'eau)
 - Peuvent être négatifs sous traitement efficace
- ➔ **Toujours à confirmer par ELISA 4G**

TROD Ac/Ag

- Première génération :
 - Uniquement sérum et sang total
 - Mauvaise performance pour les infections précoces
 - Faible migration du sang total « fenêtre témoin » → invalide
- Seconde génération : validé récemment (Delaugerre 2017, Mourez 2018)



PERFORMANCE DURING THE PHI



Quantification/détection de l'ARN VIH-1 plasmatique

- Plasma (1ml) ou « pool » de 10-15 plasma (reco CDC – Thai)
- Extraction des acides nucléiques et amplification spécifique d'une région 'conservée' du génome VIH-1
- Très spécifique
- Marqueur le plus précoce
- Seuil : 20 c/ml plus élevé si « pool » (400-2400c/ml)
- Limites majeures :
 - **variabilité des virus** (sous quantification ou pas de détection), pas de trousse pour VIH-2, VIH-1 gr O
 - coût

**COBAS® AmpliPrep/COBAS®
TaqMan® HIV-1 (ROCHE)**
ARN VIH-1 : 20 – 10⁷ copies/ml



Xpert® HIV-1 Qual test (GenExpert)
LOD 200 cp/ml (PTME)



Précocité des tests de diagnostic (Nbre de jours estimé après l'ARN VIH positif)

HIV Test	Median (Standard Deviation)	95% Confidence Limit	
Ag/Ab combo laboratory test			5 - 6 jours
ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo	6.0 (1.14)	3.8, 8.2	
BioPlex 2200 HIV Ag-Ab	5.3 (1.81)	1.7, 8.8	
GS Combo Ag/Ab EIA	5.3 (2.40)	.6, 10.0	
Siemens Combo HIV Ag-Ab			
Ag/Ab combo rapid test			7 jours
Determine HIV-1/2 Ag/Ab Combo	7.4 (1.35)	4.8, 10.1	
Conjugated synthetic peptide laboratory test (IgG/IgM sensitive)			10 - 20 jours
ADVIA HIV 1/O/2 Enhanced	10.4 (2.67)	5.1, 15.6	
GS HIV-1/HIV-2 PLUS O EIA	13.3 (1.58)	10.2, 16.4	
VITROS Anti-HIV-1 + 2 Assay	12.0 (0.94)	10.1, 13.8	
IgG/IgM-sensitive rapid test^a			
INSTI HIV-1/HIV-2 Antibody Test	14.9 (1.66)	11.7, 18.2	
Uni-Gold Recombigen HIV	20.3 (3.53)	13.4, 27.3	
Synthetic or recombinant peptide rapid screening test (IgG sensitive)			15 - 23 jours
Clearview COMPLETE HIV-1/2	20.2 (2.75)	14.8, 25.6	
Clearview HIV 1/2 STAT-PAK	19.5 (2.41)	14.8, 24.2	
DPP HIV-1/2	18.9 (1.89)	15.2, 22.6	
Multispot HIV-1/HIV-2 Rapid Test ^b	16.8 (1.53)	13.8, 19.8	
Oraquick ADVANCE Rapid HIV-1/2 Antibody Assay	22.9 (4.22)	14.6, 31.2	

Diagnostic de l'infection par le VIH:

Quelles analyses prescrire?

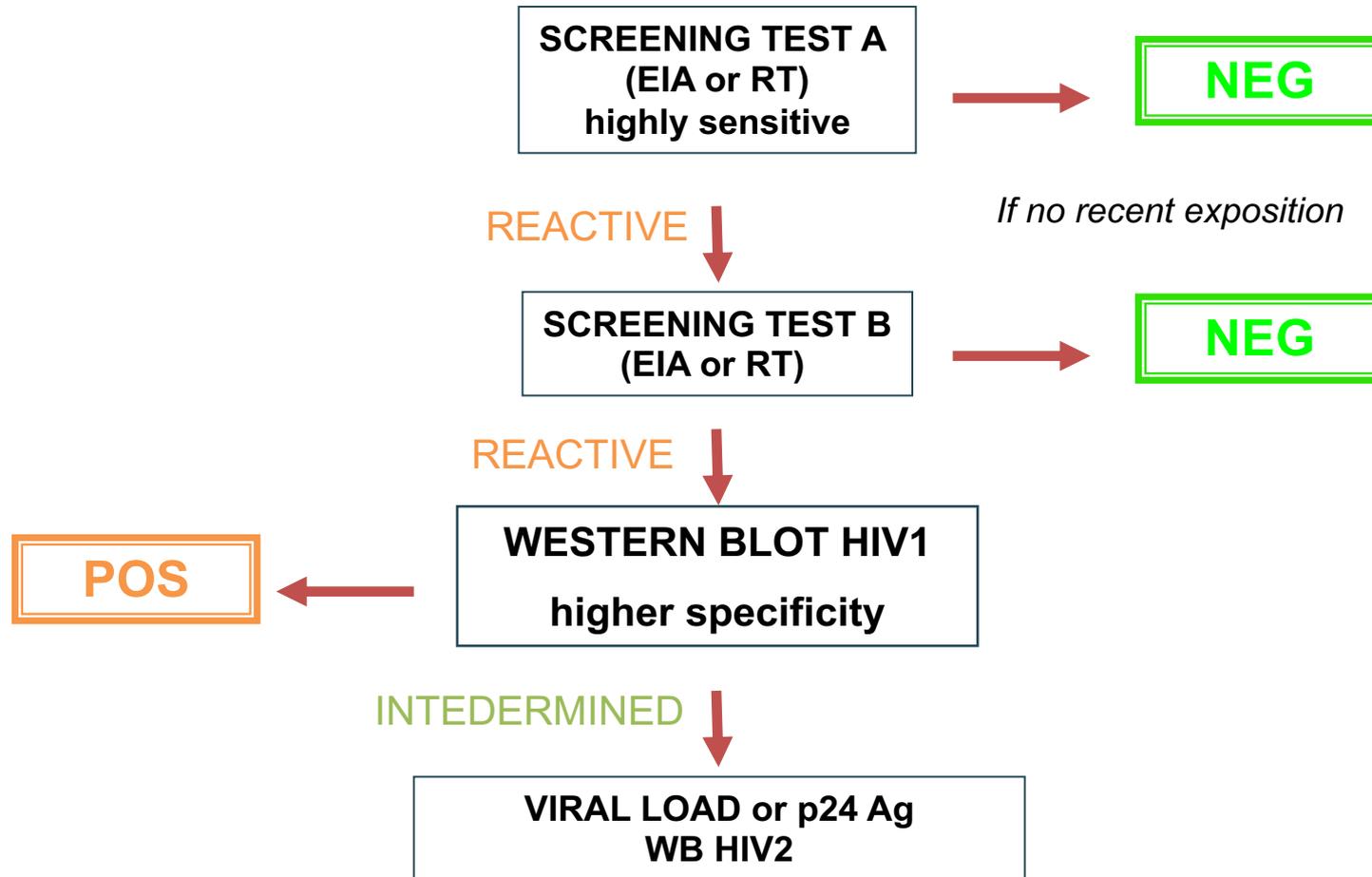
- Diagnostic « standard » (dépistage dans la population générale) :
 - **Sérologie ELISA 4G, si + confirmation par :**
 - Un **Western-Blot VIH-1** sur le même tube éventuellement compléter avec une **technique de différenciation** entre VIH-1 et VIH-2
 - Un **second prélèvement** (Eliminer une erreur de tube, dans le service ou le laboratoire)
 - **Sérologie ELISA 4G négatif si pas de contact récent (moins de 6 semaines ELISA, 3 mois avec TROD)**
- Forte suspicion de primo-infection :
 - **Ag p24** (maintenant compris dans les tests ELISA de sérologie)
 - **Charge virale (ARN VIH-1 plasmatique)**



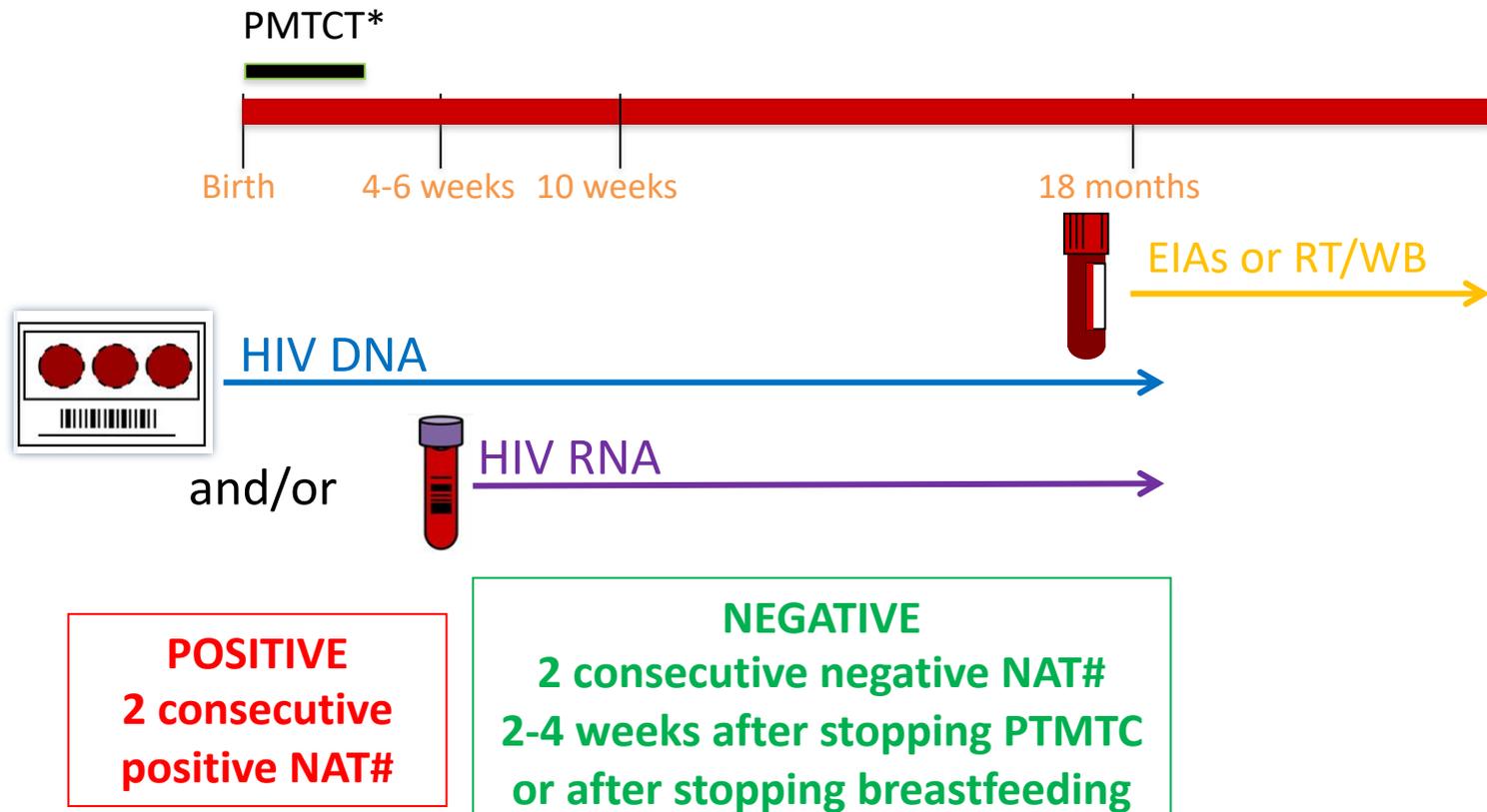
Marqueur le plus précoce (J8 à 10)
Obstacles : coût, diversité génétique VIH

**MALADIE A DECLARATION
OBLIGATOIRE**

Stratégie de dépistage (OMS)



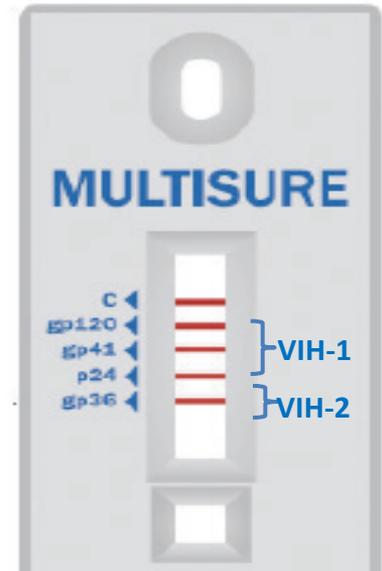
Diagnostic nouveau-né



* Prevention of mother-to-child transmission, # Nucleic Acid Testing

DIAGNOSTIC DE L'INFECTION VIH-2

- ELISA et Test rapide dépistent l'infection VIH1 et VIH-2 (tests mixtes)
- **Test de différenciation** : peptides synthétiques spécifiques de chacun des 2 virus
- Western blot 2
 - Forte réactivité croisée avec les protéines du VIH-1 groupe M
 - absence d'anticorps anti Env (HIV2 sstype A)



- **Double séropositif ≠ co-infection**

- En raison de la forte réactivité croisée, les deux virus devront être mis en évidence par biologie moléculaire (PCR ADN VIH-1 et PCR ADN VIH-2) pour prouver une double infection

SUIVI VIROLOGIQUE DE L'INFECTION VIH-2

Charge virale et de génotype de résistance : nécessité de tests spécifiques

- Les techniques commerciales de charge virale VIH-1 ne permettent pas de quantifier l'ARN VIH-2



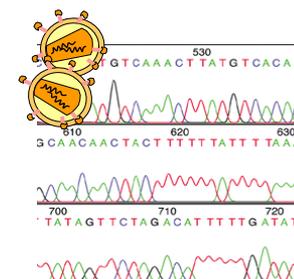
- Développement d'une technique commerciale spécifique *Damond F et al., J. Clin. Microb., 2017*
 - PCR duplex (amorces régions LTR et gag → amplifications groupes A et B)
 - Limite de quantification : 40 c/mL



- **Indications de la réalisation d'une charge virale**
 - Patients asymptomatiques non traités : tous les 6 mois
 - Patients traités : 1 et 3 mois après l'initiation (ou le changement) d'un traitement antirétroviral, puis tous les 3 mois

- **Indications d'un test génotypique de résistance (technique non commerciale)**

- Au diagnostic si CV plasmatique > 50 c/mL
- En cas de CV détectable sous traitement



Conclusion

- **Outils de dépistage dépendent de la disponibilité des tests (TROD vs ELISA; accès à l'ARN individuel ou poolé)**
- **Adapté la stratégie de dépistage en fonction de la population à tester (prévalence/incidence)**
- **Le dépistage répété augmente le risque de dépister l'infection à un stade très aiguë**
- **Le dépistage du VIH doit être inclus dans une stratégie globale du dépistage des IST et de prise en charge de santé sexuelle**



COURS Recherche / Clinique

Édition 2019 du 4 au 7 avril

Grand-Bassam - Côte d'Ivoire



Echec virologique et résistance

Echec Virologique

- Définition : réplication virale sous ARV (charge virale!!)
- En France (Rapport Morlat 2016)
 - Échec initial : persistance CV > 50 copies/ml au-delà de 6 mois ou 12 mois (selon le niveau initial)
 - Rebond virologique : CV > 50 copies/ml confirmée (différent du « blip »)
- OMS (Juillet 2017)
 - CV > 1000 copies/ml déterminée par deux mesures à 3 mois d'intervalle, avec un soutien à l'observance du traitement à l'issue du premier test virologique, six mois après l'initiation du nouveau ART

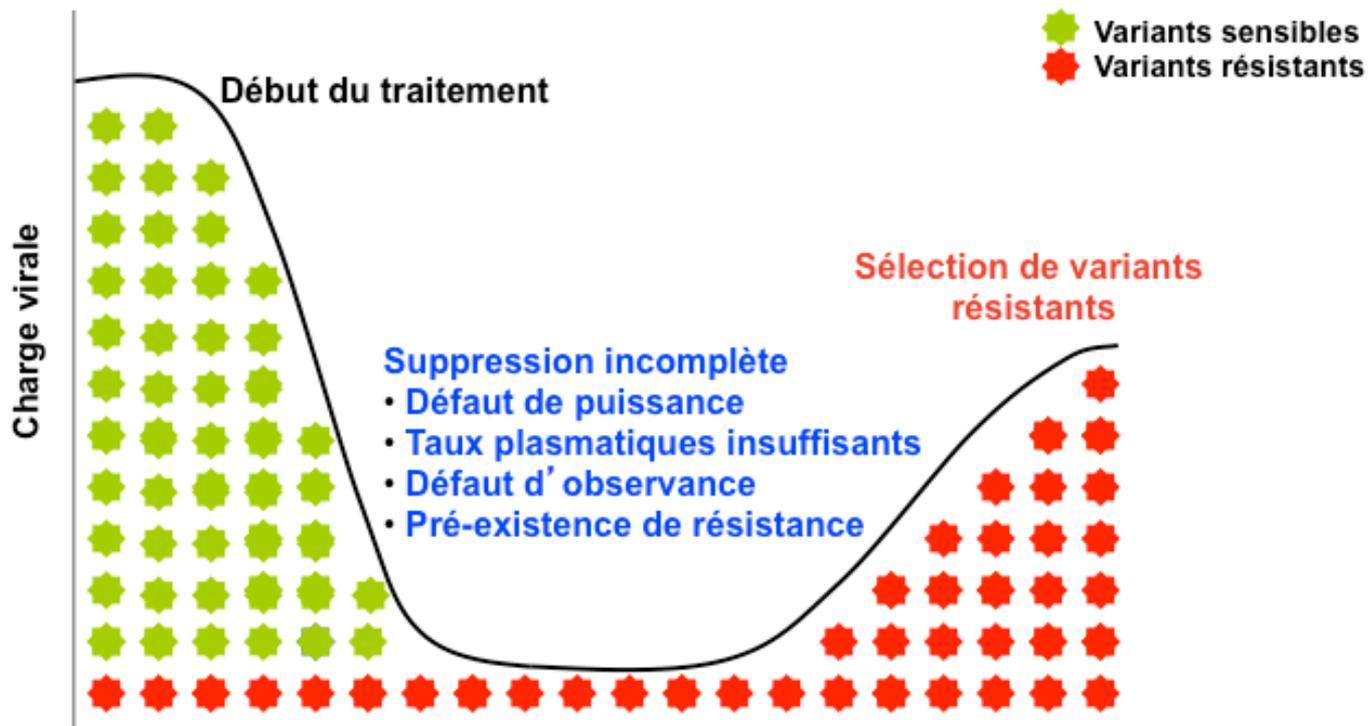
Sélection de variants résistants

- Sous pression de sélection antirétrovirale

Les variants résistants émergent en raison de leur avantage répliatif (fitness) dans ces conditions

- En l'absence d'antirétroviral

Le virus sauvage est le plus adapté, et donc détecté à l'arrêt des ARV

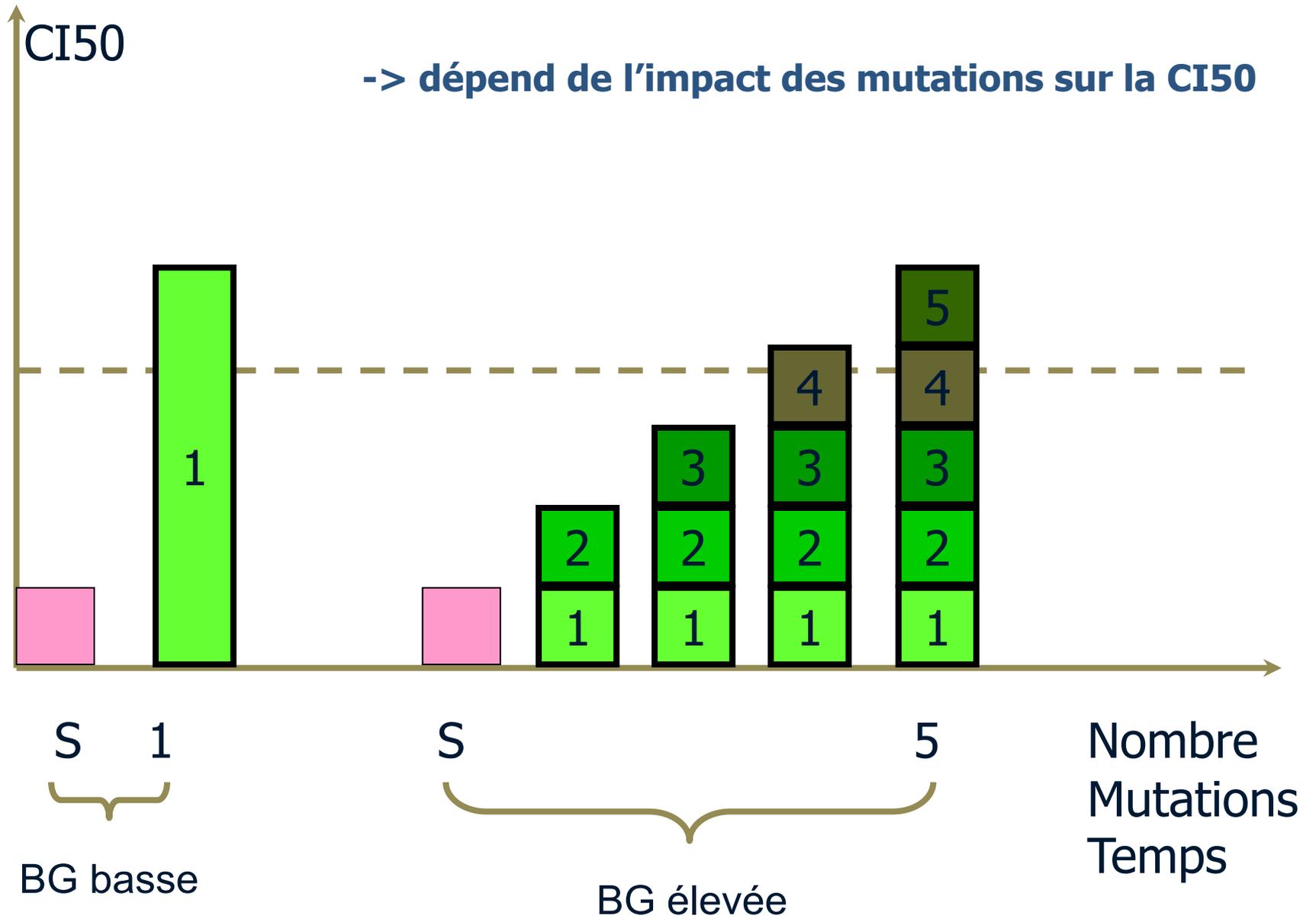


Les mutations de résistance

- Présentes dans les gènes cibles des antirétroviraux :
 - ➔ TI, protéase, gp41, intégrase
- Elles confèrent un avantage répliatif aux virus en présence de drogues :
 - ➔ sélection de variants mutés
- Certaines ont un effet négatif sur la fonction de l'enzyme
- Résistance croisée (intra classes)

M 184 V
(sauvage) position (muté)

Barrière Génétique de l'ARV



Barrière génétique faible

1 seule mutation est nécessaire

* Haut niveau de résistance

* Mutation moins pénalisante

Apparition rapide

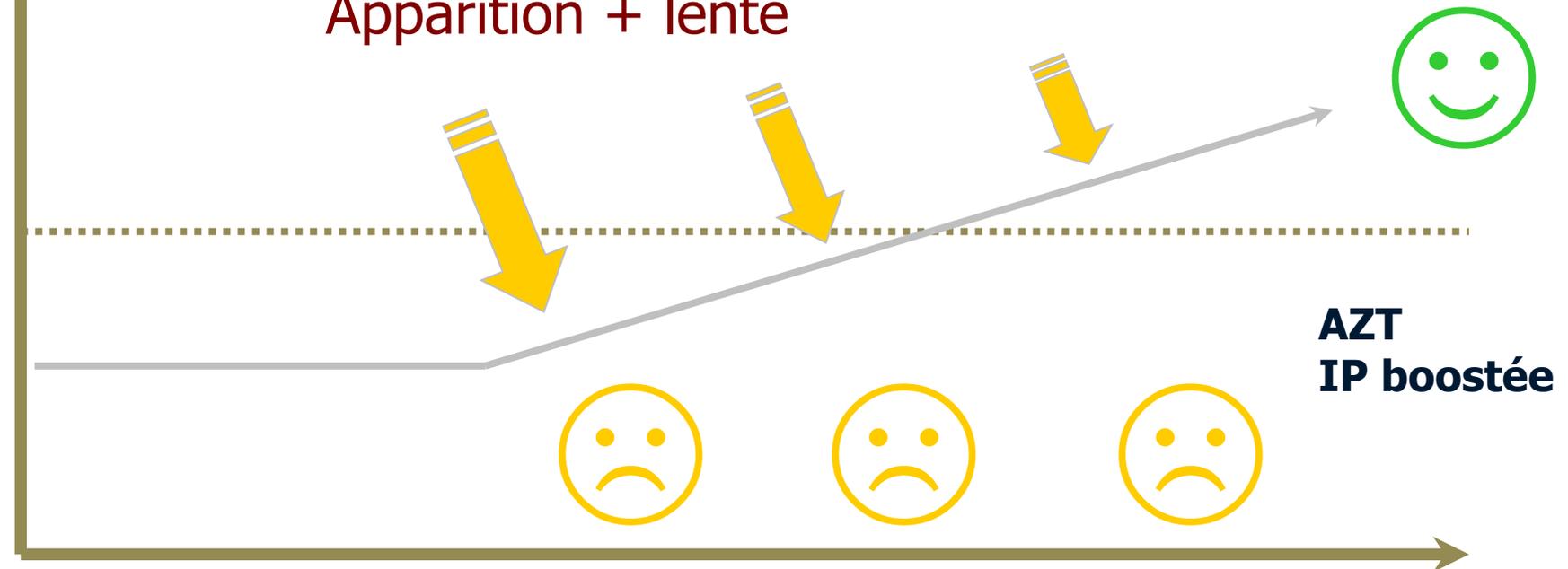


EFV, NVP
3TC/FTC
RAL/ELV

Barrière génétique élevée

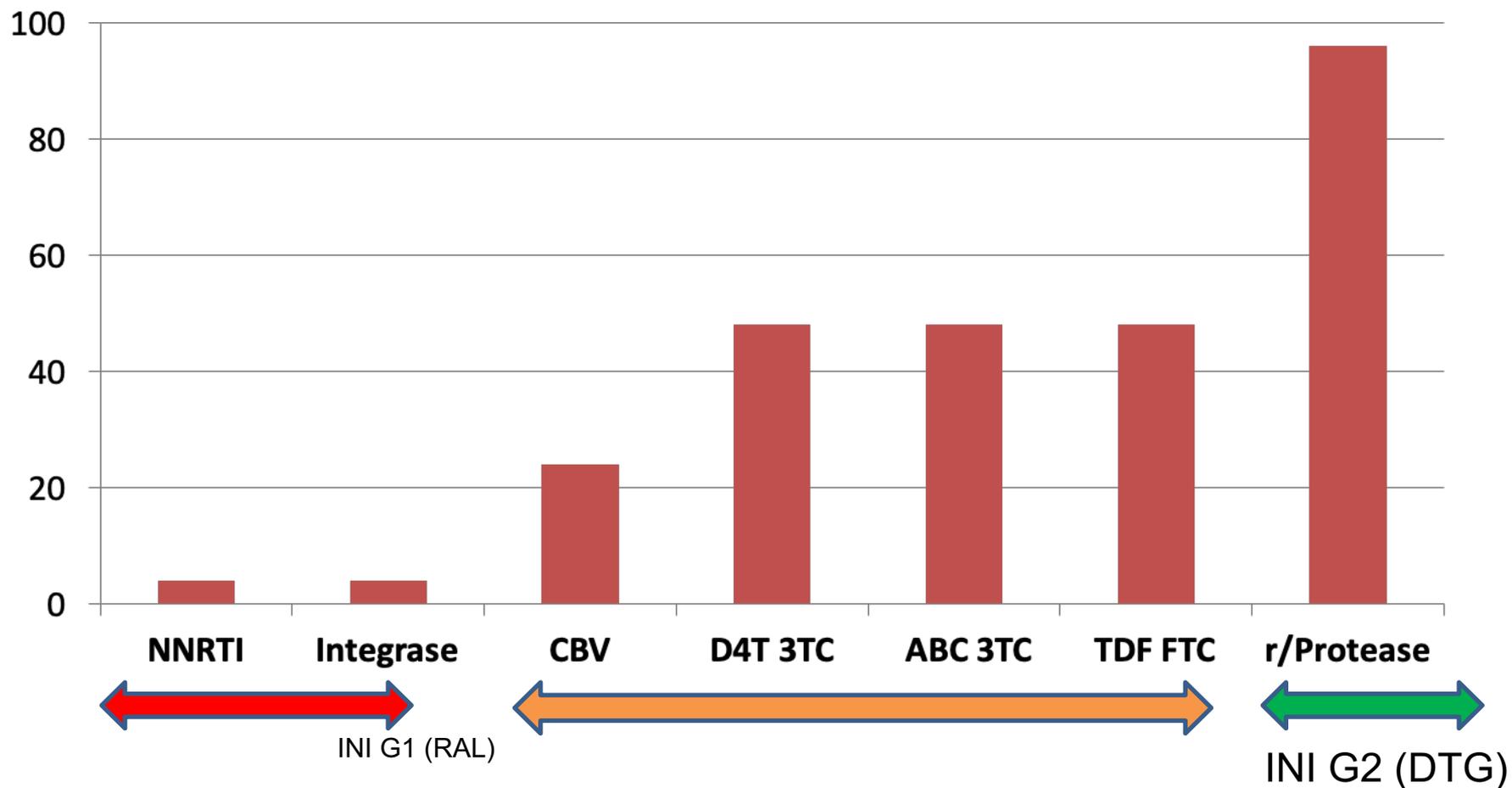
- * Mutations diminuant le « fitness »
- * Accumulation de plusieurs mutations

Apparition + lente



Cinétique d'apparition de resistance au cours de l'échec virologique (différents comportements)

Time (Weeks needed to observe resistance)



Barrière Thérapeutique du cART

INI NNRTI PI

	EVG/COBI/ FTC/TDF (n = 701)	EFV/FTC/TDF (n = 352)	ATV + RTV + FTC/TDF (n = 355)
--	-----------------------------------	--------------------------	-------------------------------------

Resistance Analysis Population* % (n)	6.0% (42)	8.0% (28)	5.4% (19)
--	-----------	-----------	-----------

Developed Any Primary Resistance to Study Drugs % (n)	2.6% (18)	4.0% (14)	0.6% (2)
--	------------------	------------------	-----------------

>Week 96 to Week 144	0.3% (2)	1.1% (4)	0.6% (2)
----------------------	----------	----------	----------

Emergent Primary Resistance Mutations	FTC/TDF 2.4% (17)	FTC/TDF 1.1% (4)	FTC/TDF 0.6% (2)
---------------------------------------	----------------------	---------------------	---------------------

at cART resumption (at time to failure or at week 48)

M184V/I	2.4% (17)	M184V/I	1.1% (4)	M184V/I	0.6% (2)
K65R	0.7% (5)	K65R	0.9% (3)	K65R	0

N155H	0.7% (5)	K101E	1.4% (5)	I84V	0
-------	----------	-------	----------	------	---

EVG (INSTI)	2.1% (15)	EFV (NNRTI)	4.0% (14)	ATV + RTV (PI/r)	0% (0)
--------------------	------------------	--------------------	------------------	-------------------------	---------------

		P225H	0.3% (1)		
Primary PI-R	0.1% (1)*		0.6% (2)*		0% (0)

Emergence de résistance(s) aux INI – 1^{ère} ligne

Etude	INI	INTI	Point	% R INI parmi inclus	% R parmi génotypés
STARTMRK	RAL	TVD	S240	1,42 %	22,2 %
A5257	RAL	TVD	S96	1,82 %	16,9 %
QDMRK	RAL bid	TVD	S48	0,52 %	16,7 %
ONCEMRK	RAL bid	TVD	S96	0,75 %	25 %
ONCEMRK	RAL 1200 qd	TVD	S96	0,75 %	23,5 %
GS-0102	EVG/c	TVD	S144	2,59 %	50 % à S48
GS-0103	EVG/c	TVD	S144	1,13 %	33 %
WAVES	EVG/c	TVD	S48	0	0/7
GS-US 104/111	EVG/c	TVD	S144	0,92 %	15,8 % à S48
GS-US 104/111	EVG/c	TAF/FTC	S144	0,92 %	31,2 % à S48
SINGLE	DTG	ABC/3TC	S144	0*	0/7 à S48
FLAMINGO	DTG	2 INTI	S96	0	0/2
ARIA	DTG	ABC/3TC	S48	0	0/6
SPRING-2	DTG	2 INTI	S96	0	0/10
SPRING-2	RAL	2 INTI	S96	0,24 %	5,3 %
PROGRESS	RAL	(+ LPV/r)	S96	3 %	37,5 %
ANRS 143/NEAT 001	RAL	(+ DRV/r)	S96	3,74 %	27,3 %

* 1 cas de E157Q/P

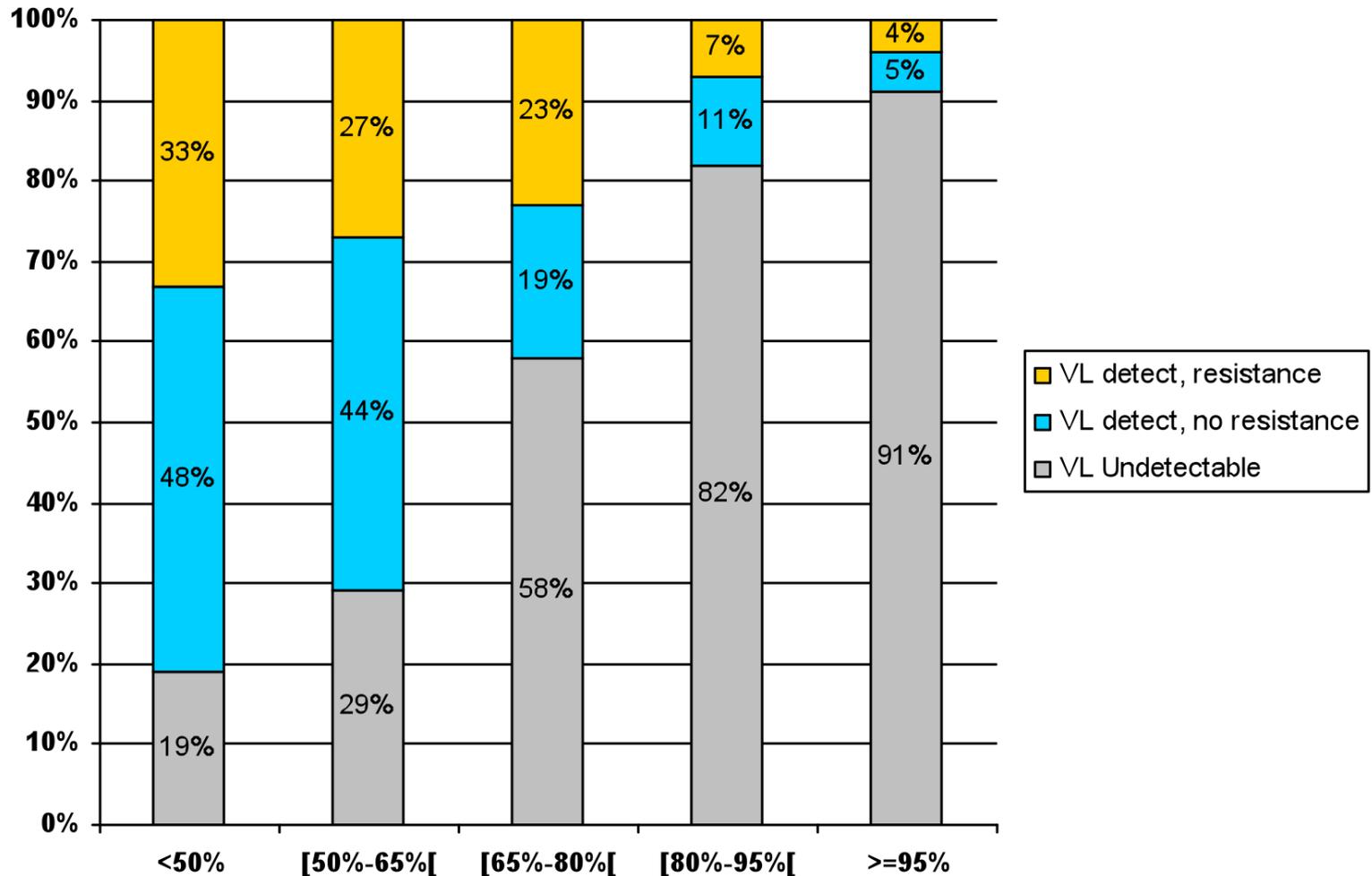
Accumulation de mutations de résistance

	M6 N=996	M12 N=942	M24 N=844
% CV détectable	20%	25%	27%
% Virus sensible	60%	50%	25%

Ne pas switcher trop vite mais ne pas laisser s'accumuler de mutations !!

% R 3TC/FTC	6%	8%	4%
% R INNTI et 3TC/FTC	52%	60%	73%
% TAMs	1%	7.5%	12.6%
% ETR		13.5%	24.5%

Evaluation virologique à M12 post traitement (d4t,3TC, NVP) en fonction de l'observance (n= 541)

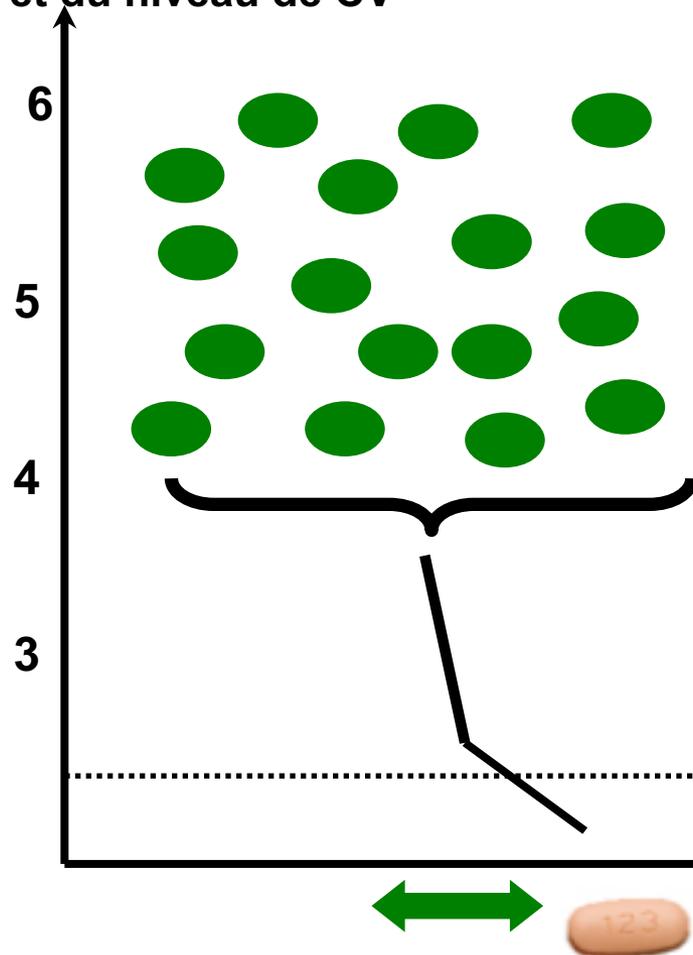


Conséquence de l'accumulation de résistance : diminution des options thérapeutiques

Chez les naïfs

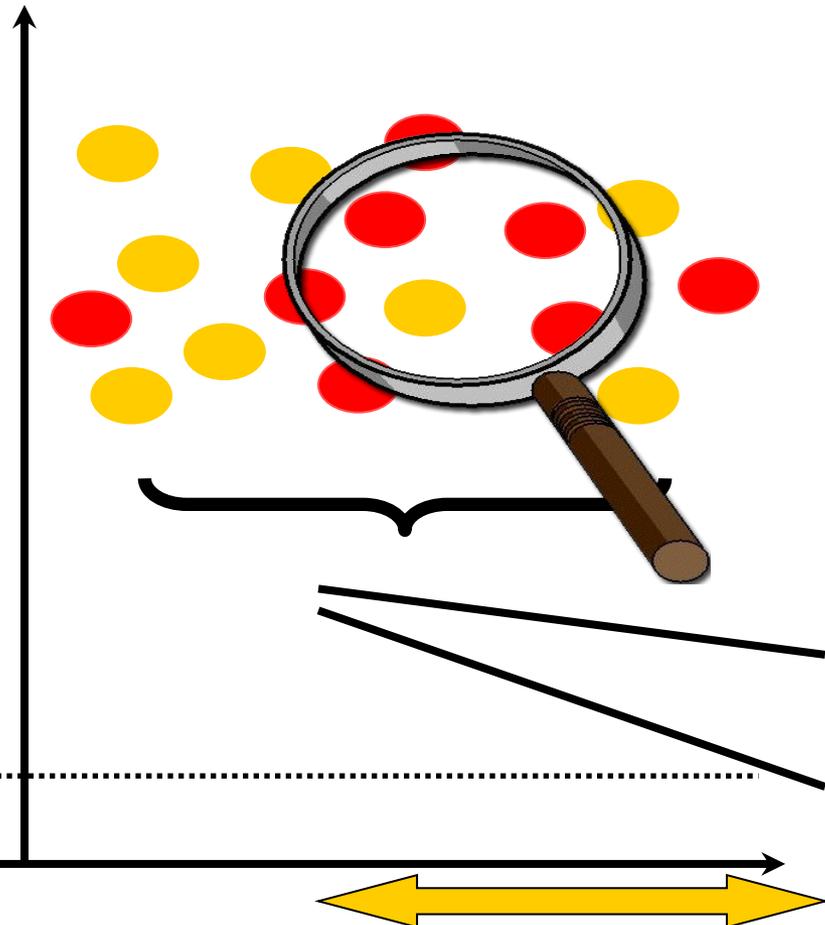
Virus sauvages : Plusieurs options

-> Indéfectibilité dpd de l'observance et du niveau de CV



Chez les prétraités

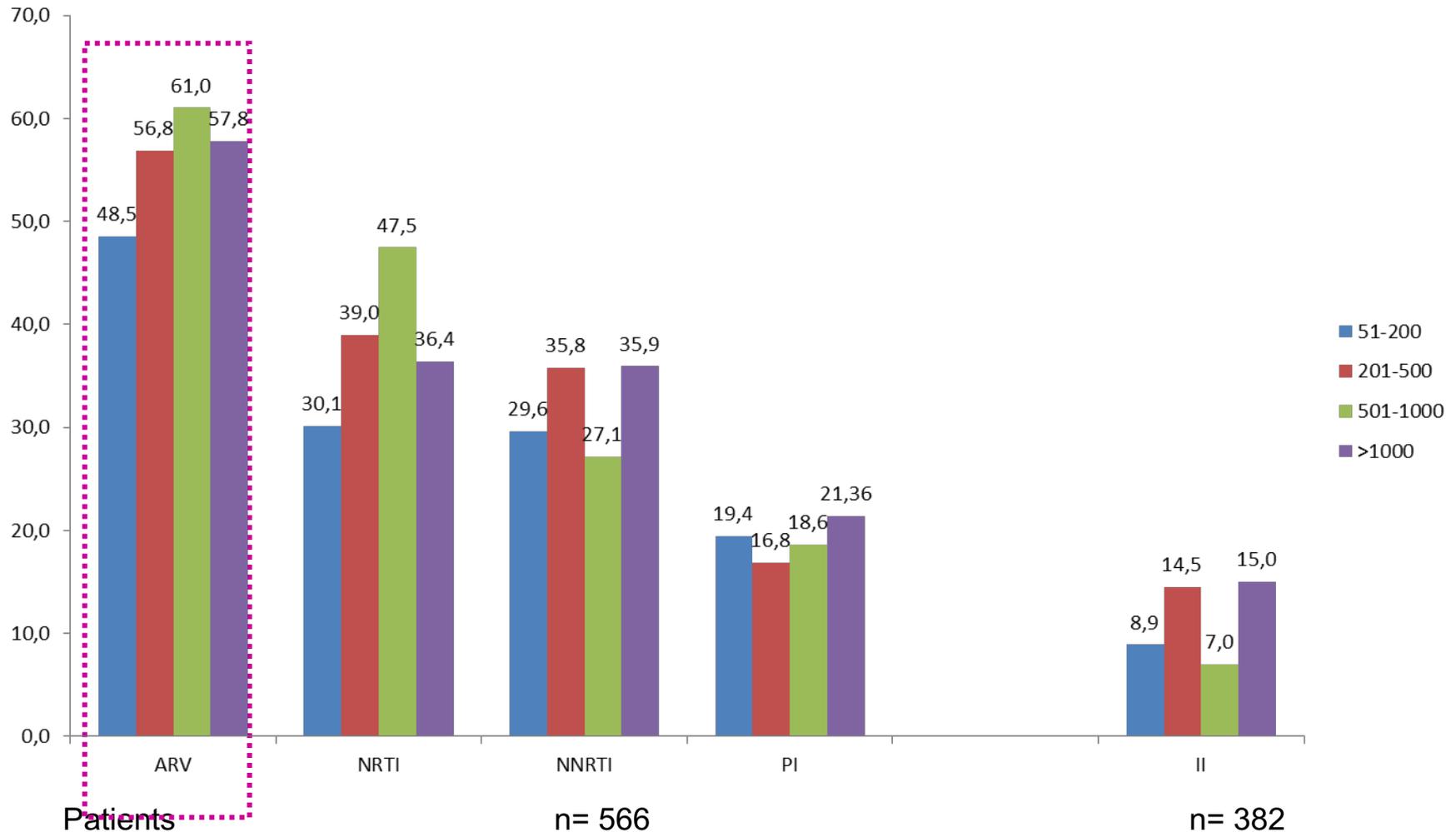
Virus résistants (accumulés + résistance croisée) : moins d'options et plus de comprimés



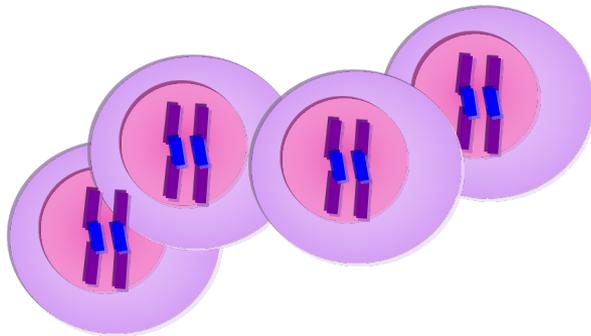
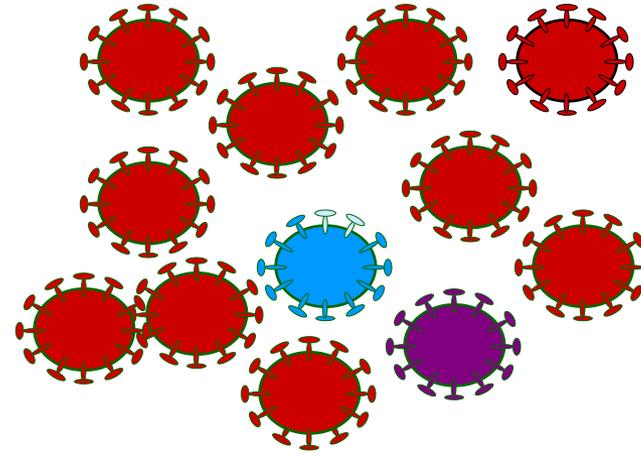
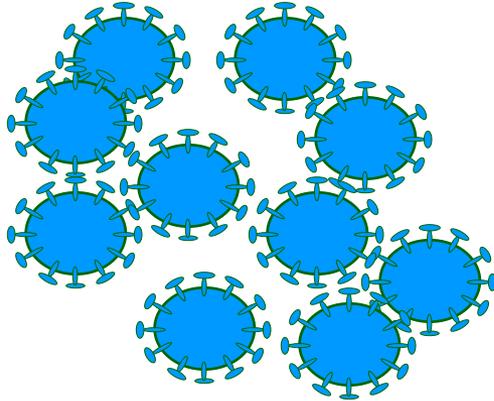
Rates of successful sequencing (RT and PROT) analysed according to the plasma HIV-RNA level

(copies/mL)	2014 %	2009
51 – 100	60%	21%
101 – 150	58%	46%
151 – 200	74%	64%
201 – 300	79%	69%
301 – 500	78%	77%
501 – 1000	80%	80%
>1000	88%	96%

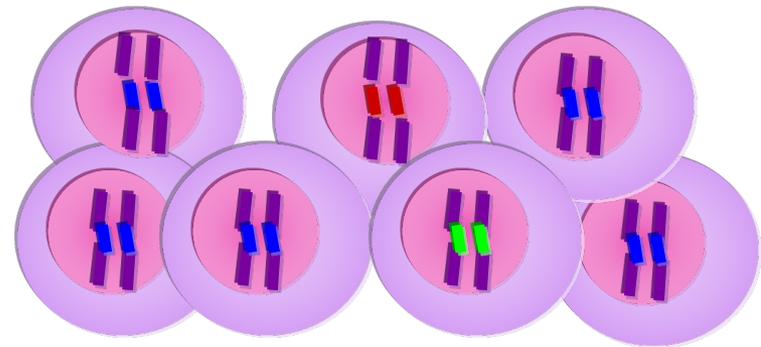
Resistance or possible resistance to at least one drug according to HIV-RNA level



Archivage des mutations



Infection VIH sauvage

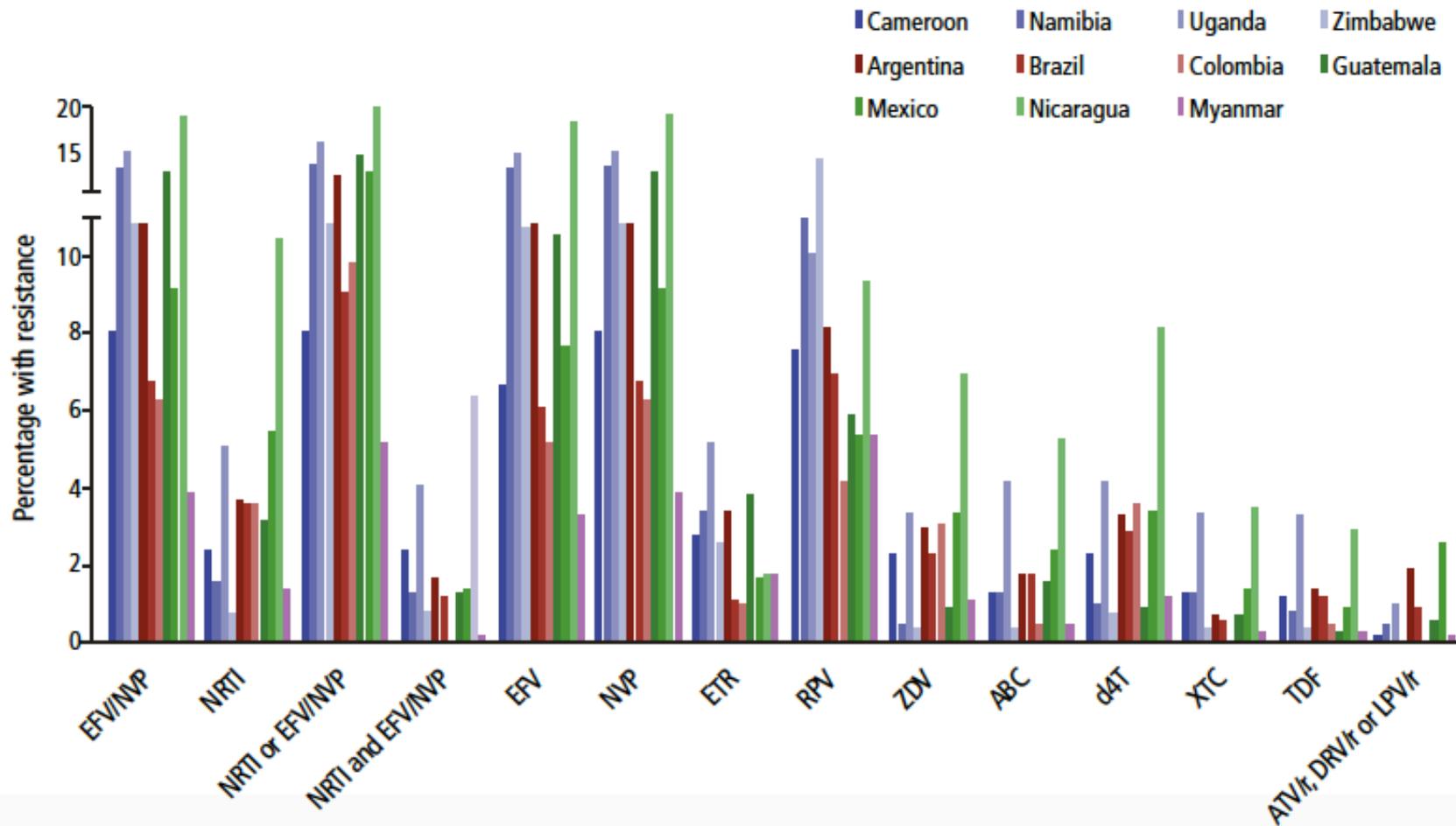


Echec sous Traitement ARV

Il n'est pas recommandé de recycler les ARV avec antécédent de résistance

Transmission de la résistance

Fig. 4: Prevalence of pretreatment HIV drug resistance by country



➔ Résistance primaire : 5-20% aux ARV de 1^{ère} ligne

PrEP et Résistance

Etudes	Groupe 'Bras placebo' Nombre d'infections		Groupe 'Bras actif' Nombre d'infections	
	Total	Résistance (%)	Total	Résistance (%)
Bangkok TFV	33	0	17	0
CAPRISA 004	60	0	38	0
Fem-PrEP	35	0	33	0
IPERGAY	24	0	9	0
VOICE	165	0	174	1 (0,6 %)
PROUD	20	NT	3	0
TOTAL	473	0	375	5 (1,3 %)

Le risque de résistance est élevée en cas de PreP initiée pendant la primo-infection non diagnostiquée

Conclusion

- **Le suivi en charge virale est essentielle pour anticiper l'émergence de résistance**
- **Le renfort de l'observance est indispensable avant de faire un test de résistance**
- **L'émergence de mutations doit être suivi d'un changement de traitement pour contrôler le virus et empêcher la transmission de résistance**
- **Laisser les virus répliquer sous ART diminue les options thérapeutiques**

MOOC HIV Science

A NEW FREE ONLINE COURSE
OF THE INSTITUT PASTEUR

HIV infection remains an outstanding global health issue despite the dramatic progress made over the past 35 years in developing and giving access to prevention and treatment tools. There are still 2 million new HIV infections and 1 million HIV-related deaths every year. Half of the 37 million people living with HIV do not have access to life-saving antiretroviral treatments. Although these molecules are extremely efficient in blocking HIV replication, they have to be maintained for life. More HIV science is thus essential to develop a vaccine and a cure against HIV infection and one day live in an AIDS-free world.

This MOOC is an immersion into HIV science: from the virus biological origin and its identification to the perspectives of eradication. You will learn about the status of the HIV epidemic and diversity in the world, the complex interactions between the virus and the host cell, and how HIV evades the immune system. The course will also describe exceptional individuals who control the infection and animal models of protection. Finally, it will address research questions on HIV clinical management and new treatment and prevention tools.

The MOOC is open to everybody, although we recommend a good scientific background (such as a bachelor of science).



Starts on March 7, 2019



FREE



Certificates available



English with French and English subtitles



Estimated effort: 2h30/week



Forum to exchange opinions, etc.

6
WEEKS

28
SPEAKERS

32
VIDEOS

200
QUESTIONS

REGISTER:



FOLLOW US:

- <https://www.fun-mooc.fr/courses/course-v1:pasteur+96011+self-paced/about>
- @InstitutPasteur
- @MoocPasteur



Institut Pasteur