



HAL
open science

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

Albane Gicquel

► **To cite this version:**

Albane Gicquel. Mise au point d'une méthode de quantification de l'ARN plasmatique spécifique des VIH-1 groupe M. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02464174

HAL Id: dumas-02464174

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02464174>

Submitted on 3 Feb 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE
UFR SANTE – Département PHARMACIE

Année : 2019

N°

THÈSE Pour le DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE
MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement le 09/04/2019

Par

Albane Gicquel

Née le 08/07/1990 à Rennes

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

Président du jury : Madame Martine PESTEL-CARON Professeur des universités, Rouen

Membres du jury : Madame Florence DAMOND Praticien hospitalier, Paris
Madame Anne MAILLARD Praticien hospitalier, Rennes
Madame Alice MOISAN Assistant hospitalo-universitaire, Rouen
Monsieur Jean-Christophe PLANTIER Professeur des universités, Rouen

L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs.

ANNEE UNIVERSITAIRE 2018 - 2019

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN :

Professeur Pierre FREGER

ASSESEURS :

Professeur Michel GUERBET

Professeur Benoit VEBER

Professeur Guillaume SAVOYE

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle APTER	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Jean-Marc BASTE	HCN	Chirurgie Thoracique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mme Sophie CANDON	HCN	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric DI FIORE	CB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie

Mr Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
Mr Claude HOUDAYER	HCN	Génétique
Mr Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépatogastro-entérologie

M. Benoit MISSET (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation Médicale Mr Jean-François
MUIR (<i>surnombre</i>)	HB	Pneumologie
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN (<i>disponibilité</i>)	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Christian THUILLEZ (<i>surnombre</i>)	HB	Pharmacologie
Mr Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
M. Gilles TOURNEL	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre VANNIER (<i>surnombre</i>)	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	HB	Service Santé Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
Mme Marie-Laure WELTER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Neurophysiologie
Mme Sophie CLAEYSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas MOUREZ (<i>détachement</i>)	HCN	Virologie
Mr Gaël NICOLAS	HCN	Génétique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie
Mr Julien WILS	HCN	Pharmacologie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mr Thierry WABLE	UFR	Communication
Mme Mélanie AUVRAY-HAMEL	UFR	Anglais

II - PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Isabelle LEROUX - NICOLLET	Physiologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEUIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy BELLIEN (MCU-PH)	Pharmacologie
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER (LE CLEZIO)	Statistiques
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Dominique DUTERTE- BOUCHER	Pharmacologie
Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL GHARBI-HAMZA	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique
Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques

Mme Hong LU	Biologie
M. Jérémie MARTINET (MCU-PH)	Immunologie
Mme Marine MALLETER	Toxicologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES UNIVERSITAIRES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mme Caroline BERTOUX	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
----------------------------	---------

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Sophie MOHAMED	Chimie Organique
---------------------------	------------------

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR MEDECINE GENERALE

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG) UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCE MEDECINE GENERALE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG) UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mme Laëtitia **BOURDON** UFR Médecine Générale

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mr Emmanuel **HAZARD** UFR Médecine Générale

Mme Marianne **LAINÉ** UFR Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain FRAINEAU (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline GAILDRAT (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel LETELLIER (med)	Physiologie
Mme Christine RONDANINO (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mr Youssan Var TAN	Immunologie
Mme Isabelle TOURNIER (med)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

SJ – Saint Julien Rouen

I.	REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	6
A.	CARACTERISTIQUES GENERALES DES VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH)	6
1.	<i>Découverte du VIH</i>	6
2.	<i>Caractéristiques virologiques</i>	6
3.	<i>Particule virale</i>	6
4.	<i>Organisation du génome</i>	7
B.	LES DIFFERENTS VARIANTS DU VIH-1	8
1.	<i>VIH-1 de groupe M et recombinants intra-groupe M</i>	9
2.	<i>VIH-1 de groupe O</i>	10
3.	<i>VIH-1 de groupes N et P</i>	12
C.	ORIGINE DE LA DIVERSITE GENETIQUE DU VIH	12
1.	<i>Origines simiennes et adaptation à l'Homme</i>	12
2.	<i>Variabilité génétique</i>	14
3.	<i>Recombinaison des VIH</i>	14
a)	Pré-requis	14
b)	Mécanisme de la recombinaison	14
c)	Notion de points chauds de recombinaison	16
d)	Doubles infections VIH-1/M+O et recombinants VIH-1/MO	17
D.	DIAGNOSTIC ET SUIVI VIROLOGIQUE DE L'INFECTION A VIH	17
1.	<i>Diagnostic sérologique</i>	17
2.	<i>Mesure de la charge virale</i>	18
a)	Généralités sur la PCR en temps réel	18
b)	Méthodes commerciales	25
c)	Méthodes académiques	27
II.	TRAVAUX EXPERIMENTAUX	29
A.	INTRODUCTION	29
B.	MATERIELS ET METHODES	32
1.	<i>Mise au point de la qRT-PCR spécifique de groupe M</i>	32
a)	Sélection des amorces et de la sonde	32
b)	Détermination des conditions réactionnelles de la qRT-PCR	35
2.	<i>Evaluation des performances analytiques et cliniques</i>	38
a)	Spécificité clinique	39

b)	Seuil de quantification.....	39
c)	Linéarité.....	39
d)	Répétabilité.....	40
e)	Reproductibilité.....	40
f)	Sensibilité clinique.....	40
g)	Préparation de plasmas doublement infectés par des souches de VIH-1/M et de VIH-1/O.....	41
h)	Analyses statistiques.....	42
3.	<i>Séquençage de la région intégrase des virus présentant une discordance de quantification.....</i>	<i>43</i>
a)	Échantillons séquencés.....	43
b)	Extraction de l'ARN viral.....	43
c)	Amplification de la région intégrase, révélation et purification.....	43
d)	Séquençage de la région intégrase et analyse des séquences.....	44
C.	RESULTATS.....	46
1.	<i>Sélection du couple amorces/sonde.....</i>	<i>46</i>
2.	<i>Détermination des conditions réactionnelles de la qRT-PCR.....</i>	<i>47</i>
a)	Amplification.....	47
b)	Validation d'un contrôle interne.....	50
3.	<i>Performances analytiques de la qRT-PCR INTM.....</i>	<i>52</i>
a)	Spécificité clinique.....	52
b)	Seuil de quantification.....	52
c)	Linéarité.....	54
d)	Répétabilité.....	54
e)	Reproductibilité.....	55
4.	<i>Sensibilité clinique.....</i>	<i>56</i>
a)	Analyse qualitative.....	56
b)	Analyse quantitative.....	57
5.	<i>Analyse de la quantification des simulations de co-infections VIH-1/M+O.....</i>	<i>62</i>
6.	<i>Analyse des séquences de la région intégrase pour les échantillons discordants.....</i>	<i>63</i>
D.	DISCUSSION.....	66
E.	CONCLUSION.....	72
III.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	73

Liste des tableaux

Tableau 1 : Code de dégénérescence selon l'IUPAC.....	20
Tableau 2 : Noms et séquences des sondes et amorces sens et anti-sens.	33
Tableau 3 : Protocoles d'amplification spécifiques des trousse Applied et Invitrogen.	37
Tableau 4 : Mélange simulant une double infection M+O	42
Tableau 5 : Résultats des différents tests réalisés avec les cinq combinaisons.	47
Tableau 6 : Comparaison Applied-Cfx96 et Invitrogen-LC480.....	48
Tableau 7 : Comparaison Applied-Cfx96 et Invitrogen-Cfx96.....	49
Tableau 8 : Impact de la modification de la température d'hybridation sur la sensibilité et la spécificité.....	50
Tableau 9 : Résultats des essais d'amélioration de la sensibilité de la qRT-PCR INTM.....	53
Tableau 10 : Reproductibilité des Ct des quatre points de la gamme.....	55
Tableau 11 : Résultats de l'analyse qualitative.....	57
Tableau 12 : Résultats de l'analyse quantitative	57
Tableau 13 : Valeur de la charge virale du VIH-1/M des différents mélanges de VIH-1/M+O	63
Tableau 14 : Différences de nucléotides entre les amorces/sonde et les séquences des échantillons discordants analysées.....	65

Liste des figures

Figure 1 : Structure de la particule virale du VIH-1.....	7
Figure 2 : Organisation génomique du VIH.....	8
Figure 3 : Diversité génétique du VIH	9
Figure 4 : Génome représentant la structure mosaïque de CRF01_AE	10
Figure 5 : Génome représentant la structure mosaïque de CRF02_AG	10
Figure 6 : Phylogénies des VIH-1/M et VIH-1/O d'après M. Leoz <i>et al.</i> [17]	11
Figure 7 : Relations phylogénétiques entre les VIScpz, les VISgor et les VIH-1 d'après Plantier <i>et al.</i> [32]	13
Figure 8 : Processus de recombinaison chez les rétrovirus d'après <i>Simon-Lorière et al.</i> [43]	15
Figure 9 : Etapes de la PCR en temps réel par la méthode d'hydrolyse des sondes d'après Brodeur <i>et al.</i> [70]	22
Figure 10 : Les différentes phases de la réaction de PCR temps réel d'après Tse C <i>et al.</i> [74].....	24
Figure 11 : Représentation des courbes de PCR en temps réel d'après Callot <i>et al.</i> [75].....	24
Figure 12 : Régions ciblées par les méthodes de quantification commerciales et académiques	27
Figure 13 : Position des amorces sens, anti-sens et sondes synthétisées.....	34
Figure 14 : Comparaison des courbes d'amplification du CI avec des volumes différents du couple amorces/sonde.....	51
Figure 15 : Résumé des étapes de mise au point de la technique de qRT-PCR INTM.....	51
Figure 16 : Courbes de linéarité du surnageant Zach (CRF02_AG)	54
Figure 17 : Reproductibilité des quatre points de la gamme.....	56
Figure 18 : Diagramme de dispersion (n=183).....	59
Figure 19 : Courbe de Bland Altman (n = 183).....	60
Figure 20 : Différence de charge virale entre Abbott et la qRT-PCR INTM.....	61
Figure 21 : Différence de charge virale en log ₁₀ copies/mL entre Abbott et la qRT-PCR INTM pour des moyennes de charges virales inférieures à 3 Log ₁₀ copies/mL	62

Liste des abréviations

ADN = Acide DéoxyriboNucléique

ARN = Acide RiboNucléique

ARV = AntiRétroViral

CDC = Center Disease control

CE = Conformité Européenne

CHU = Centre Hospitalier Universitaire

CI = Contrôle Interne

CNR= Centre National de Référence

CRF = Forme Recombinante Circulante (*Circuling Recombinant Form*)

Ct = Cycle seuil (*Cycle Threshold*)

FDA = Food and Drug Administration

Gp = Glycoprotéine

INNTI = Inhibiteur Non Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse

IUPAC = International Union of Pure and Applied Chemistry (*Union internationale de chimie pure et appliquée*)

LTR = Extrémité répétée (*Long Terminal Repeat*)

MGB = Minor Groove Binder

PCR = Réaction de polymérisation en chaine (*Polymerase Chain Reaction*)

QI = Quantité Insuffisante

RFU = Unité relative de fluorescence (*Relative Fluorescence Unit*)

SIDA = Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis

TI = Transcriptase Inverse

Tm = Température de demi-dénaturation (*Melting Temperature*)

TMA = Amplification de l'acide nucléique médiée par la transcription (*Transcription Mediated Amplification*)

URF = Forme Recombinante Unique (*Unique Recombinant Form*)

VIH = Virus de l'Immunodéficiency Humaine

VIS = Virus de l'Immunodéficiency Simienne

VIScpz= Virus de l'Immunodéficiency Simienne du Chimpanzé

VIScpzPtt = Virus de l'Immunodéficiency Simienne du Chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes*

VISgor= Virus de l'Immunodéficience Simienne du Gorille

VISsm = Virus de l'Immunodéficience Simienne du mangabey enfumé

I. Revue bibliographique

A. Caractéristiques générales des Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)

1. Découverte du VIH

Au début des années 1980, l'agence épidémiologique fédérale des Etats-Unis (Center for Disease Control, CDC) a publié une alerte sur une épidémie d'infection pulmonaire à *Pneumocystis pneumoniae*, des cas de maladie de Kaposi et d'autres infections opportunistes chez des patients immunodéprimés [1]. Une origine virale a été rapidement soupçonnée. En 1983, le VIH a été isolé pour la première fois, par une équipe de l'Institut Pasteur à Paris [2]. Cette souche a été par la suite définie comme la souche prototype du VIH-1 de groupe M. Puis, en 1986, un nouveau variant a été isolé, montrant une forte divergence génétique par rapport à la souche de 1983 (plus de 50% dans le gène de l'enveloppe). Cela a alors conduit à la différenciation du VIH en types 1 (VIH-1) et 2 (VIH-2) [3]. Ensuite, d'autres variants ont été découverts, présentant une divergence génétique moins marquée qu'avec la souche de 1983 (VIH-1/M), mais suffisante pour conduire à la définition de quatre groupes de variants VIH-1 (VIH-1/M, /N, /O et /P).

2. Caractéristiques virologiques

Les VIH appartiennent à la famille des *Retroviridae* et au genre lentivirus. Ils ont un génome composé de deux molécules d'ARN monocaténaire identiques, et possèdent une enzyme caractéristique de la famille, la Transcriptase Inverse (TI). Cette dernière permet la transcription inverse ou rétro-transcription de l'ARN viral en ADN bicaténaire grâce à ses activités ADN polymérase ARN/ADN dépendante et RNase H, qui dégrade le brin d'ARN matrice. L'ADN proviral ainsi synthétisé est capable de s'intégrer au génome de la cellule-hôte [4].

3. Particule virale

La particule virale du VIH mesure entre 90 et 120 nanomètres de diamètre et comporte trois éléments structuraux : l'enveloppe, la matrice et la capside (**Figure 1**).

L'enveloppe provient de la membrane de la cellule-hôte. C'est une bicouche phospholipidique associée à deux glycoprotéines virales : la gp120 et la gp41. La gp120 possède 5 régions hypervariables (de V1 à V5) [4]. L'enveloppe est tapissée sur sa face interne par une matrice protéique formée de polymères de protéine p17. La capside, en forme de cône tronqué, est entourée par la matrice et correspond à un assemblage de protéines p24, dont le rôle est de protéger les acides nucléiques. Les deux molécules d'ARN associées aux nucléoprotéines p7 forment la nucléocapside.

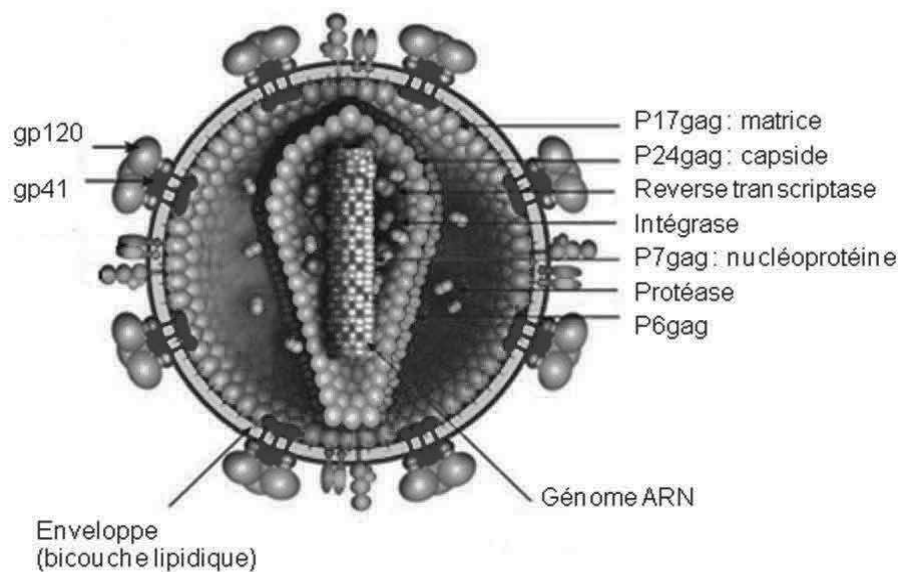


Figure 1 : Structure de la particule virale du VIH-1.

Source : <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/STRUCTURE/INDEX.HTML>

Les différentes protéines du VIH-1 sont représentées dans la structure tridimensionnelle de la particule virale. Les protéines dérivées du gène *gag* (p6, p7, p17 et p24), les enzymes dérivées du gène *pol* (Protéase, Transcriptase Inverse et Intégrase) et les glycoprotéines de l'enveloppe dérivées du gène *env* (gp41 et gp120) sont également indiquées.

4. Organisation du génome

Le génome du VIH, contenu dans la capside, est d'une longueur d'environ 10 000 paires de bases. Le génome possède trois cadres de lectures ouverts et chevauchants, et se compose de trois gènes principaux *gag*, *pol* et *env*, de quatre gènes accessoires, *vif*, *vpr* (pour le VIH-1) ou *vpx* (pour le VIH-2), *vpu* et *nef*, et de deux gènes de régulation, *tat* et *rev* (**Figure 2**). En 2016, un dixième gène nommé *asp* (Anti-Sense Protein) a été découvert. Il code la protéine anti-sens et est spécifique des virus pandémiques [5]. Le gène *gag* code les protéines de structure : la matrice (p17), la capside (p24), et la nucléocapside (p7). Le gène *pol* code les enzymes virales : la protéase (PR), la TI et l'intégrase (INT). Enfin, le gène *env* code les

glycoprotéines d'enveloppe. Les gènes de régulation, *tat* et *rev*, ont un rôle essentiel dans le pouvoir pathogène et le cycle viral. Les gènes accessoires ont divers rôles, ils codent les protéines *Vif* (*Virion infectivity factor*) qui augmente le potentiel infectieux du virus, *Vpr* (*Viral protein R*) impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, *Vpu* (*Viral protein U*) qui favorise la libération des virions et *Nef* (*Negative expression factor*) qui augmente la réplication virale, entraîne une diminution des récepteurs CD4 à la surface des cellules infectées et augmente l'infectiosité des particules du VIH. Le génome est flanqué de part et d'autre par les LTRs (Long Terminal Repeat), des séquences répétitives identiques composées de trois régions : U3, R et U5. Les LTRs ont un rôle dans l'intégration de l'ADN proviral à l'ADN cellulaire, dans la réplication et l'expression du génome viral.

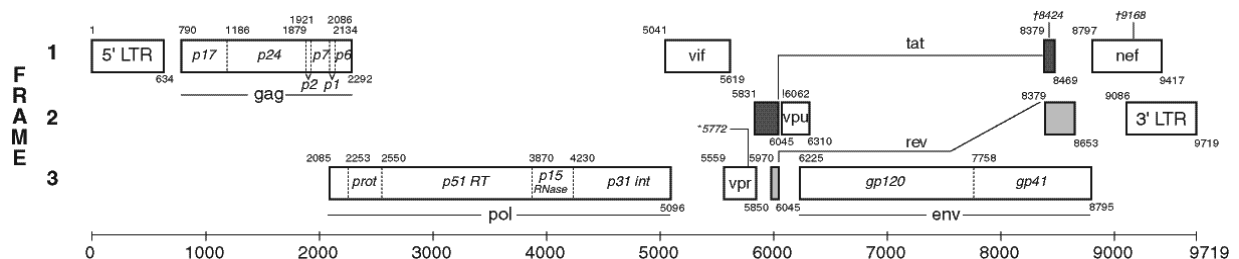


Figure 2 : Organisation génomique du VIH.

Source : <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>

Les différents gènes du VIH-1, ainsi que leur position sur le génome de référence HxB2 (GenBank accession number K03455), sont représentés. Les protéines codées par ces différents gènes sont représentées au niveau du gène correspondant. La région LTR est présente aux extrémités 5' et 3' du génome.

B. Les différents variants du VIH-1

La classification des VIH est basée sur l'homologie de séquence qui existe entre les virus. Ils sont divisés en deux types, le VIH-1 et le VIH-2. Parmi le VIH-1, on distingue quatre groupes. Les VIH-1/M (pour major) sont pandémiques, les VIH-1/O (pour outlier) sont endémiques au Cameroun et les groupes N (pour Non M, Non O) et P sont très rares et présents au Cameroun. Les VIH-2 sont répartis en 9 groupes (A-I) (**Figure 3**). Chaque type et groupe est le résultat d'un évènement de transmission indépendant du singe à l'Homme.

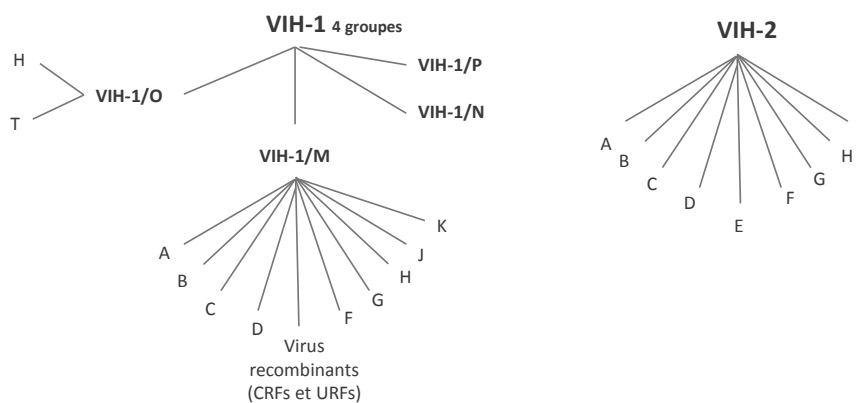


Figure 3 : Diversité génétique du VIH

1. VIH-1 de groupe M et recombinants intra-groupe M

Le groupe M est responsable de plus de 90% des infections à VIH, sachant qu'actuellement, le nombre de personnes atteintes par le VIH se chiffre à 37 millions (M) (Chiffres ONUSIDA 2017). Le VIH-1/M est divisé en 9 sous-types (A-D, F-H, J et K) [6]. Ils divergent entre eux de 15% dans le gène *gag* et de 25 % dans le gène *env*. Le sous-type prédominant est le sous-type C (48-50% des infections à VIH-1/M), que l'on retrouve essentiellement en Afrique australe et de l'Est, en Chine et en Inde. Il est suivi du sous-type A, responsable de 12% des infections à VIH-1/M et répandu en Afrique de l'Est et en Europe de l'Est. Le sous-type B (11%) est majoritairement présent en Europe de l'Ouest, en Amérique du Nord et en Australie [7]. Une très grande diversité génétique est observée en Afrique Centrale, où tous les sous-types sont représentés [8].

Le brassage des populations engendre la co-circulation des souches de VIH pouvant mener à des co-infections. Elles peuvent, par la suite, conduire à des phénomènes de recombinaison, fréquents entre les sous-types du VIH-1/M (recombinaison intra-groupe). Parmi les formes recombinantes, on distingue les formes recombinantes circulantes (Circulating Recombinant Form : CRFs) et uniques (Unique Recombinant Form : URFs). Les CRFs sont retrouvées chez au moins trois individus sans lien épidémiologique. La première CRF caractérisée correspond à la recombinaison entre les sous-types A et E de VIH-1/M et est notée CRF01_AE (**Figure 4**). Celle qui est actuellement la plus répandue est la CRF02_AG (**Figure 5**) ; elle représente 60% des infections à VIH au Cameroun. Les URFs sont retrouvées chez moins de trois individus sans lien épidémiologique ou chez plusieurs individus présentant un lien épidémiologique.

Actuellement, on comptabilise 98 CRFs et plusieurs centaines d'URFs [9] ; de nouvelles formes apparaissant régulièrement.

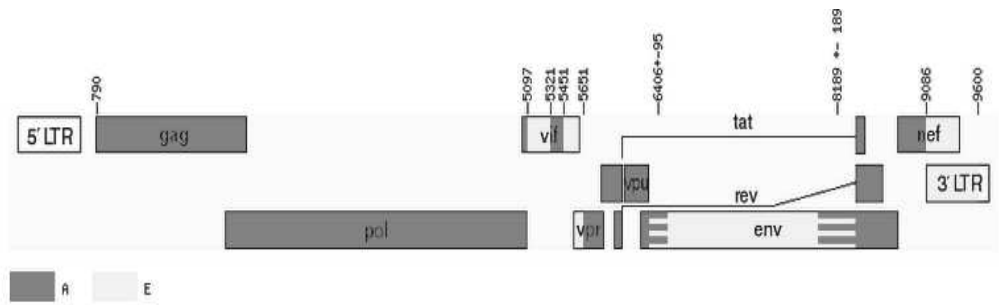


Figure 4 : Génome représentant la structure mosaïque de CRF01_AE

Source : <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>

La séquence du génome complet de CRF01_AE a été caractérisée pour la première fois en Thaïlande. Les fragments dérivés des sous-types A et E sont représentés respectivement en rouge et jaune. Les nombres indiquent les localisations des différents points de cassures.

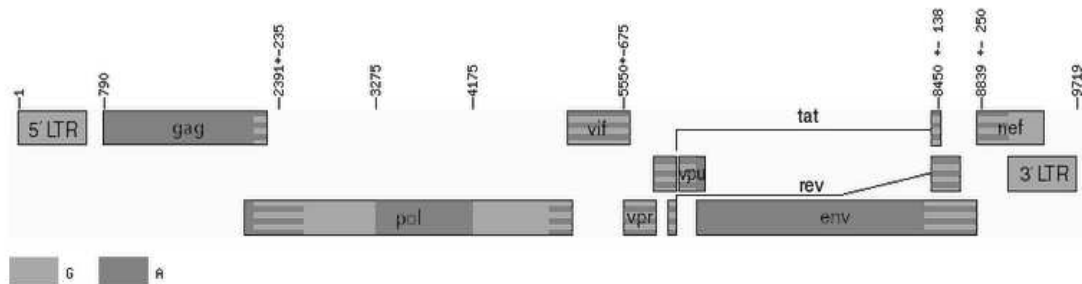


Figure 5 : Génome représentant la structure mosaïque de CRF02_AG

Source : <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>

La souche CRF02_AG a été décrite pour la première fois chez un patient nigérian en 1996 [10]. C'est une forme recombinante de sous-type A / G qui circule largement en Afrique occidentale et centrale [11], mais a également été rapportée à Taïwan [12]. Les fragments dérivés des sous-types A et G sont représentés respectivement en rouge et vert.

2. VIH-1 de groupe O

La souche prototype ANT70 du VIH-1/O a été découverte en 1990 en Belgique chez deux patients camerounais [13]. Quelques années plus tard, les analyses phylogénétiques ont mis en évidence une grande divergence génétique par rapport à la souche de référence HxB2 du VIH-1/M. En effet, on retrouve seulement 67%, 73% et 56% d'homologie de séquence entre les gènes *gag*, *pol* et *env* respectivement, entre ces deux groupes [14]. Il existe également une grande diversité génétique intra-groupe avec 2-14%, 3-12% et 4-13% de divergence entre les gènes *gag*, *pol* et *env* respectivement, pouvant avoir un impact sur le diagnostic [15, 16]. Au sein de ce groupe, on distingue deux sous-groupes : un majoritaire (H) et un minoritaire (T) [17]. L'arbre phylogénétique a la forme d'une comète où la queue (T pour

tail) correspond au sous-groupe minoritaire, et la tête (H pour head), au sous-groupe majoritaire. Cela s'oppose à la représentation en double étoile de l'arbre phylogénétique du VIH-1/M (**Figure 6**). Cette distinction s'expliquerait par l'évolution en deux phases de croissance du groupe O. La première phase de croissance aurait débuté autour des années 1950 avec des souches circulant à cette période et appartenant au sous-groupe T. Les souches H seraient, quant à elles, associées à la seconde phase d'expansion qui aurait eu lieu dans les années 1980.

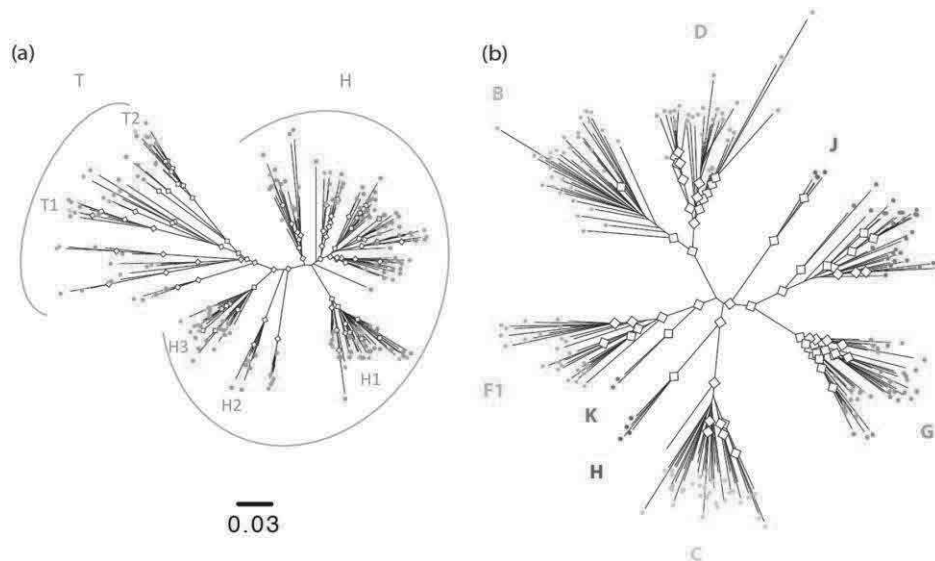


Figure 6 : Phylogénies des VIH-1/M et VIH-1/O d'après M. Leoz *et al.*[17]

(a) Représentation en double étoile des VIH-1/M. (b) Représentation en comète des VIH-1/O

Le groupe O reste endémique au Cameroun, où il est responsable de 0,6 à 1% des infections à VIH, soit environ 10 000 cas [18]. Cette épidémie ne semble plus évoluer depuis une quinzaine d'années [19, 20] et la diffusion du VIH-1/O en dehors du Cameroun reste limitée. Toutefois, des cas sporadiques d'infection par ce groupe ont été décrits dans d'autres régions d'Afrique (Ouest et Est [21, 22]), mais aussi sur d'autres continents (Europe [23-25], Amérique du Nord [26]), avec un lien avec le Cameroun dans tous les cas. La France, du fait de son lien historique fort avec le Cameroun, a rapporté le plus grand nombre d'infections à VIH-1/O. Le réseau national de surveillance des infections à VIH-1/O (RES-O), créé en 2003, a permis d'identifier, rétrospectivement et prospectivement, 143 patients infectés par le ce groupe, depuis la découverte du premier cas en 1992 [27].

3. VIH-1 de groupes N et P

A l'heure actuelle, une vingtaine de patients est infectée par le groupe N [28-31] et deux par le groupe P [32, 33]. Ils sont tous originaires du Cameroun.

C. Origine de la diversité génétique du VIH

1. Origines simiennes et adaptation à l'Homme

Peu de temps après l'identification du VIH comme cause du Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA), le premier Virus de l'Immunodéficience Simienne (VIS) a été isolé à partir de macaques rhésus *Macaca mulatta* (VISmac) au centre de recherche sur les primates de la Nouvelle-Angleterre [34]. Des études rétrospectives ont alors montré que ces singes avaient été en contact avec des mangabeys enfumés (*Cercocebus atys*), porteurs « sains » du VISsm (pour sooty mangabey). La relation phylogénétique étroite entre le VISsm et le VISmac a identifié le mangabey comme source de la transmission inter-espèce du VISsm chez le macaque. La découverte du VISmac comme responsable d'une maladie très similaire au SIDA humain chez le macaque a fait suspecter rapidement une origine simienne du VIH [34]. Ainsi, le VIH-2 découvert en Afrique de l'Ouest a montré par la suite une similarité génétique élevée avec le VISsm [35]. Mais c'est en 1989, que la découverte de VIS apparentés au VIH-1 chez des chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* (VIScpzPtt) a permis de considérer cette espèce comme la source du VIH-1 chez l'Homme [36]. Les analyses phylogénétiques ont permis de mettre en évidence, chez les VIS du chimpanzé (VIScpz), une grande diversité génétique associée à une répartition géographique différente, à l'origine de deux événements de transmission ayant abouti aux VIH-1/M et /N [37, 38]. En 2006, des études, réalisées chez le gorille de l'Ouest de l'Afrique centrale (*Gorilla gorilla gorilla*), ont mis en évidence que celui-ci pouvait être également infecté par un VIS (VISgor). Les VISgor ont également été transmis à l'Homme et sont à l'origine du VIH-1/O [39] et du VIH-1/P. Le lien phylogénétique étroit de ce dernier avec les VISgor, en fait le groupe le plus proche de cette lignée [32] (**Figure 7**).

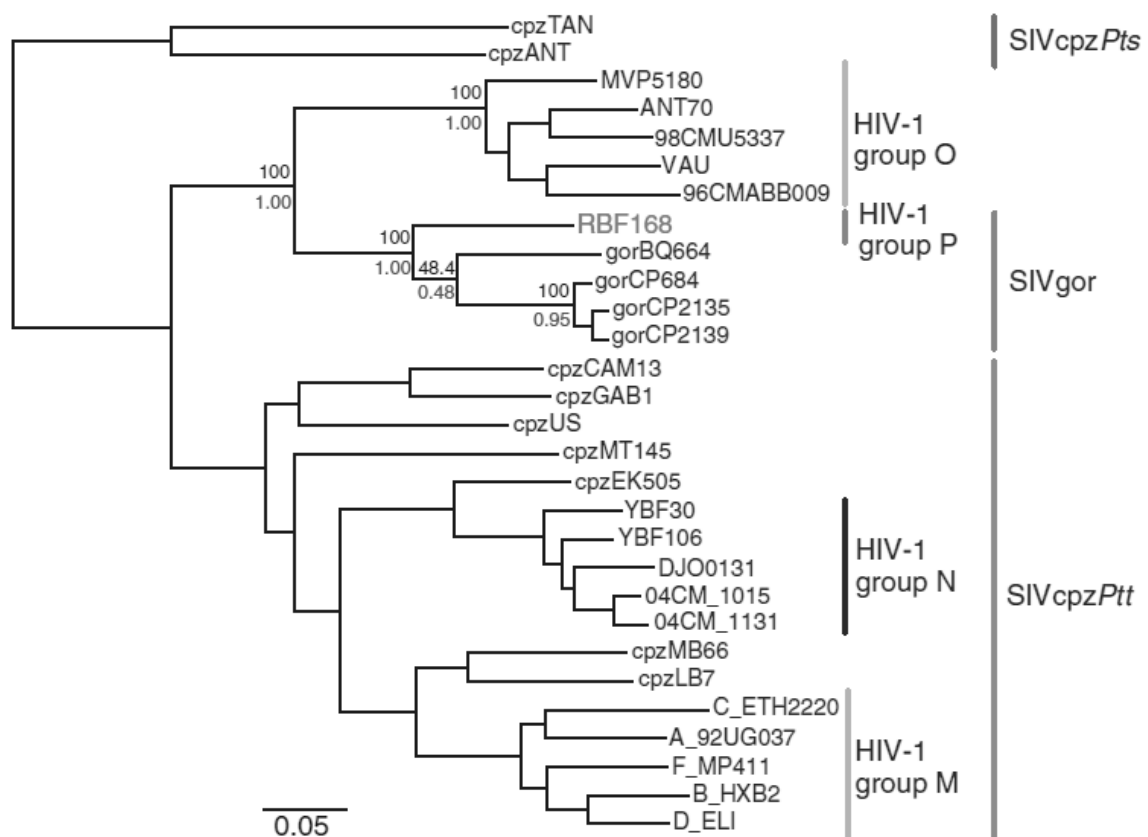


Figure 7 : Relations phylogénétiques entre les VIScpz, les VISgor et les VIH-1 d'après Plantier *et al.*[32]

Cet arbre montre le lien phylogénétique entre les différents VIH-1 et leurs précurseurs VIS. Ils sont issus d'épisodes distincts de transmission inter-espèces de grands singes (chimpanzés et gorilles) à l'Homme.

La voie sanguine semble être le mode de transmission du singe à l'Homme le plus plausible. Le contact avec du sang de singe infecté, lors d'activités présentant un risque de blessure au niveau de la peau, comme la chasse et la préparation de la viande de brousse, ou après morsures par des singes captifs ou domestiqués, a pu être à l'origine de l'infection d'individus humains. Dans de rares cas, le virus simien transmis se serait adapté à son nouvel hôte, pouvant alors être le point de départ de sa diffusion chez l'Homme. Une fois la barrière d'espèce franchie, différents facteurs ont contribué à la progression de l'épidémie chez l'Homme : des facteurs biologiques (facteurs de restriction cellulaires, adaptation du virus, sensibilité génétique de l'hôte), environnementaux, démographiques, comportementaux et médicaux [40].

2. Variabilité génétique

Le virus, une fois adapté à son hôte, est capable de se multiplier de façon intense après la pénétration du virus dans l'organisme. Ce fort taux de réplication virale est à l'origine de la production de plus de 10^{10} particules virales par jour chez l'individu infecté [41]. S'ajoute à cela une faible fidélité de la TI, qui commet de nombreuses erreurs, étant donné l'absence d'activité 3'exonucléase. Ainsi, le niveau d'erreur est d'environ 2.10^{-5} par nucléotide et par cycle [42]. Cela conduit, chez un même individu, à l'établissement d'une population virale très hétérogène issue d'un même virus, et qui se comporte comme s'il s'agissait d'une seule et même espèce, désignée quasi-espèce.

Cette variabilité du VIH associée à la pression de sélection chez l'Homme et à des facteurs épidémiologiques spécifiques conduisent à une augmentation de la diversité virale au cours du temps et de l'épidémie.

3. Recombinaison des VIH

Elle correspond à la formation, pendant la phase de transcription inverse, d'un virus chimérique, possédant un génome mosaïque, constitué de plusieurs fragments d'origine parentale différente (**Figure 8**).

a) Pré-requis

La recombinaison génétique entre deux particules virales nécessite qu'une cellule soit initialement infectée par deux virus parentaux, à l'occasion soit d'une co-infection (infection simultanée par deux virus parentaux), soit d'une surinfection (infections successives), afin de générer un virus hétérozygote. Elle a lieu du fait de la présence, dans la capside, de deux copies d'ARN génomique. Si les deux copies d'ARN sont génétiquement différentes, cela définit un virus hétérozygote. La recombinaison est alors d'autant plus visible que les deux copies d'ARN sont génétiquement éloignées.

b) Mécanisme de la recombinaison

La recombinaison des VIH se déroule en deux étapes : une double infection par deux virus différents qui aboutit, entre autres, à la production de virions hétérozygotes, puis une

infection d'une autre cellule hôte, par un virion hétérozygote permettant la formation d'un virus recombinant.

Lors de la première étape, la même cellule-hôte est infectée par deux virus parentaux différents, et leur matériel génétique s'intègre au génome cellulaire après l'action de la TI et de l'intégrase (**Figure 8**). Les protéines de structure des deux virus sont ensuite exprimées. Elles doivent être compatibles pour interagir entre elles, afin de former un virus hétérozygote. Par la suite, il est nécessaire que l'hétérodimère, formé à partir des différents ARN génomiques issus de la double infection, soit fonctionnel. Après bourgeonnement des virus à partir de la cellule infectée, une population hétérogène de virions est obtenue, constituée à la fois de virions hétérozygotes (composés d'un brin de chaque virus parental) et de virions homozygotes (identiques aux virus parentaux). La deuxième étape nécessite que les virions hétérozygotes soient fonctionnels, capables d'infecter d'autres cellules, d'être reconnus par la machinerie virale impliquée dans la transcription inverse et de s'y multiplier.

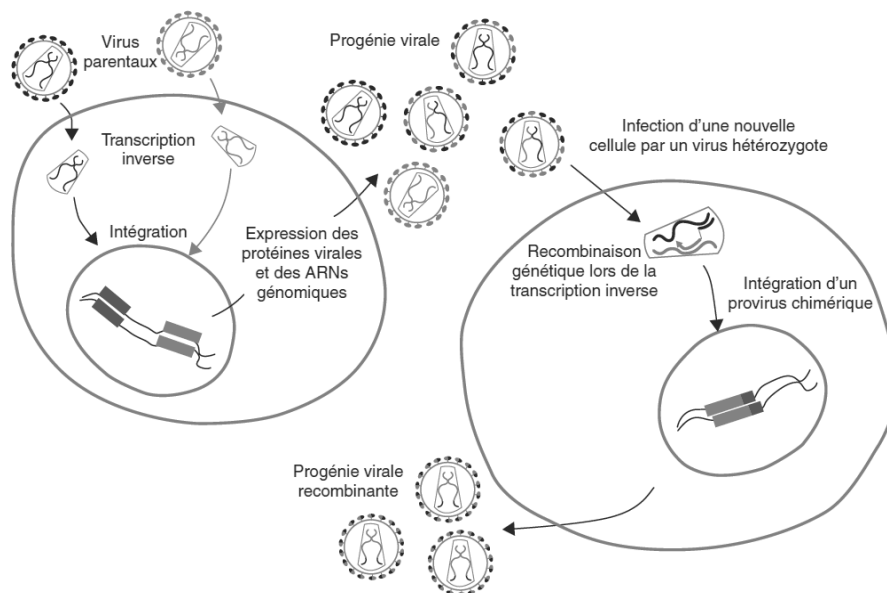


Figure 8 : Processus de recombinaison chez les rétrovirus d'après *Simon-Lorière et al.* [43]

L'infection d'une même cellule par des particules virales génétiquement distinctes mène à l'intégration de deux provirus dans le génome des cellules (le dimère d'ARN est montré dans la capside virale). Les particules virales sont représentées en rouge et en noir. Il en résulte la libération d'une progénie virale constituée par des virions hétérozygotes (dimères d'ARN rouge-noir) et homozygotes (dimères d'ARN rouge-rouge ou noir-noir). Chaque particule de la progénie virale est potentiellement constituée par l'assemblage de protéines issues de la synthèse de l'un ou l'autre des deux provirus. Cela est schématiquement indiqué par les capsides et les enveloppes virales partiellement noires ou rouges. Après infection d'une deuxième cellule cible par un virion hétérozygote, un génome chimérique peut être produit pendant la transcription inverse, menant à la génération des particules virales recombinantes.

Lors de la deuxième étape, un virion hétérozygote infecte une nouvelle cellule et la recombinaison génétique peut avoir lieu (**Figure 8**). La TI se fixe sur un premier brin d'ARN qui sert de matrice pour la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire négatif (ADN(-)). Le brin d'ADN(-) est transféré vers la région R du 3'LTR de l'ARN et la synthèse se poursuit. L'activité RNase H de la polymérase dégrade ensuite l'ARN génomique, puis le deuxième brin d'ADN est synthétisé [43].

La recombinaison lors de la synthèse du premier brin d'ADN (ADN (-)), semble être le mécanisme prépondérant. Il est appelé « choix de copie » et correspond à un saut de la TI, d'une matrice à l'autre [43].

L'ADN chimérique ainsi obtenu est ensuite intégré au génome de la cellule hôte. Les protéines chimériques générées par la suite doivent être fonctionnelles, pour aboutir à la libération d'une progénie virale recombinante.

c) Notion de points chauds de recombinaison

Le transfert de la TI d'un brin d'ARN à l'autre s'effectue dans des régions préférentielles du génome appelées les « points chauds » de recombinaison (ou « hot-spot »). De nombreuses études ont mis en évidence un lien direct entre l'identité de séquence des virus parentaux et la fréquence de recombinaison. En effet, des études *in vitro* ont montré que la fréquence de recombinaison semble plus importante quand la recombinaison a lieu entre deux virus de même sous-type qu'entre des virus de sous-types différents [44]. Cependant, une autre étude, n'a pas mis en évidence de corrélation entre fréquence de recombinaison et homologie [45]. D'autres paramètres peuvent également intervenir dans la fréquence de recombinaison, telle que la structure secondaire de l'ARN génomique [46]. Plusieurs études menées ont montré des résultats similaires quant à la localisation des points de cassure, qui n'est pas aléatoire. Des points chauds de recombinaison ont ainsi principalement été retrouvés au début et à la fin du gène *env*, ainsi que dans les régions de la TI, de l'intégrase et des gènes accessoires [45, 47, 48].

d) Doubles infections VIH-1/M+O et recombinants VIH-1/MO

Les premières doubles infections ont été décrites au sein du VIH-1/M en Afrique de l'Ouest et Centrale dans les années 1990. Cela montrait qu'il n'y avait pas de protection liée à une première infection, et a conduit à l'émergence des CRFs et URFs. Au Cameroun, et dans les pays limitrophes, il existe une co-circulation des VIH-1/M et VIH-1/O, pouvant favoriser la co-infection d'un même individu par ces virus génétiquement différents, pré-requis nécessaire à la recombinaison. La première co-infection par un VIH-1/M et un VIH-1/O a été décrite au Bénin, en 1996, démontrant que l'infection par deux virus de groupes différents était possible, contrairement à ce qui était pensé alors [49, 50]. Actuellement, le nombre de doubles infections M+O rapportées s'élève à 13 [49, 51-54], parmi lequel un cas unique de surinfection M après une infection par un VIH-1/O, décrit en 2004 [55]. Cette possible co-infection a conduit à l'émergence de formes recombinantes malgré une divergence génétique entre ces deux groupes. Ainsi, les deux premiers cas de formes recombinantes MO ont été décrits par Peeters *et al.* [56] et Takehisa *et al.* [57] en 1999, puis un troisième cas, par Yamaguchi *et al.* en 2004 [58]. Ces dernières années, de nombreux recombinants ont été identifiés, chiffrant à 19 le nombre d'URFs VIH-1/MO. Différents cas d'infection sont possibles. La forme recombinante est soit isolée [53, 54, 59, 60], soit associées à une forme parentale O ou M [50, 51, 55, 56] soit aux deux formes parentales [53, 54, 57]. Tous ces patients présentent un lien étroit avec le Cameroun. Des cas de doubles infections VIH-1 et VIH-2 ont également été décrits [61, 62], cependant aucun recombinant n'a été identifié à ce jour. Les deux groupes de virus sont probablement trop divergent génétiquement.

D. Diagnostic et suivi virologique de l'infection à VIH

1. Diagnostic sérologique

La première étape de diagnostic d'une infection par le VIH consiste en un test sérologique de dépistage, mettant en évidence des anticorps dirigés contre les protéines d'enveloppe du virus (recommandation HAS 2008). Le test actuellement recommandé est un test ELISA de quatrième génération combiné permettant de détecter simultanément des anticorps anti-VIH-1 (groupes M et O) et anti-VIH-2, ainsi que l'antigène p24 de la capsid de VIH-1 [63]. Les performances des tests sérologiques peuvent être variables, étant donnée la forte

diversité antigénique des VIH-1/O, qui est difficile à couvrir [64, 65]. Le risque de diagnostic faussement négatif n'est alors pas à exclure, même s'il est très faible avec les tests marqués CE ou FDA.

En cas de positivité du test ELISA, un test Western-blot est réalisé sur le prélèvement initial. Ce test permet de détecter différents anticorps dirigés contre le VIH, de confirmer l'infection par le VIH et de différencier le VIH-1 du VIH-2, ou de suspecter les doubles infections. La confirmation de l'infection par le VIH nécessite obligatoirement de réaliser un deuxième prélèvement, sur lequel un nouveau test ELISA est pratiqué, afin d'éliminer une erreur d'identité (Algorithme de dépistage cas général, HAS 2008).

2. Mesure de la charge virale

La quantification virale (ou charge virale) est un outil essentiel dans la confirmation moléculaire de l'infection et dans la prise en charge d'une infection par le VIH. Elle reflète la réplication du virus dans l'organisme et permet de mesurer l'importance de cette réplication, d'évaluer le risque de progression vers la maladie, de guider la réponse à une thérapie antirétrovirale et de rechercher un échappement virologique.

Pour cela, on utilise la qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) en temps réel, qui est une méthode sensible, rapide et spécifique de détection et de quantification de molécules d'ADN et d'ARN. A la différence de la PCR en point final (c'est-à-dire après un nombre défini de cycles de PCR), la PCR en temps réel permet de détecter le produit de PCR au fur et à mesure qu'il est amplifié et qu'il s'accumule au cours de la réaction.

a) Généralités sur la PCR en temps réel

i Amplification

Les étapes de la PCR

La PCR, exploitant le processus de la réplication grâce à une ADN polymérase, nécessite la présence de brin d'ADN dans le milieu réactionnel. L'amplification d'ARN doit donc passer par une étape de transcription inverse pour obtenir un brin d'ADN complémentaire. On parle alors de RT-PCR. Des amorces spécifiques de la cible à amplifier vont s'hybrider aux

brins d'ADN au niveau de la séquence complémentaire. Puis, l'ADN polymérase allonge les amorces en y incorporant les désoxyribonucléiques complémentaires de la séquence de la matrice auxquelles elles sont hybridées. La fin de l'élongation correspond à la fin d'un cycle de PCR et deux nouveaux brins d'ADN sont synthétisés. Les cycles suivants de PCR débutent par une dénaturation de l'ADN double brin à 95°. Puis, les amorces s'hybrident de nouveau et l'ADN polymérase synthétise les brins complémentaires.

Conception des amorces

Il est important de respecter un certain nombre de règles dans la conception des amorces. En effet, celles-ci doivent être ubiquitaires, c'est-à-dire capables d'amplifier toutes les souches cibles, mais doivent être également spécifiques afin de ne pas amplifier d'autres souches que la cible. Pour cela, l'utilisation d'alignements multiples de séquences cibles, permet de repérer une région du génome qui est suffisamment conservée pour pouvoir amplifier la majorité des souches d'intérêts. Dans certains cas, la région ciblée pour concevoir l'amorce peut présenter une hétérogénéité d'un ou plusieurs nucléotide(s). Pour s'assurer de l'amplification de la majorité des souches cibles, l'utilisation d'amorces dites dégénérées peut être nécessaire. Elles consistent en un mélange équimolaire de plusieurs amorces quasi identiques, où la seule différence est le(s) nucléotide(s) hétérogène(s). La conception de ces amorces nécessite un code de dégénérescence ou des lettres, capables de représenter plus d'un nucléotide à la fois. Le choix peut porter sur deux, trois ou les quatre nucléotides A, C, G ou T. Le **Tableau 1** indique les lettres qui permettent de remplacer les différentes possibilités de nucléotide. En général, la dégénérescence n'est pas souhaitable, car elle implique de synthétiser différentes amorces et sondes ou d'utiliser des nucléotides génériques (ex : inosine, capable de se fixer à toutes les bases), avec le risque d'augmenter les interactions non spécifiques lors de la réaction de PCR.

Tableau 1 : Code de dégénérescence selon l'IUPAC

A	Adenine
C	Cytosine
G	Guanine
T (or U)	Thymine (or Uracil)
R	A or G
Y	C or T
S	G or C
W	A or T
K	G or T
M	A or C
B	C or G or T
D	A or G or T
H	A or C or T
V	A or C or G
N	any base

Il est également important de s'assurer que la région sélectionnée n'est pas présente dans le génome d'autres organismes. Il est donc nécessaire d'ajouter des séquences autres que la souche cible, lors de la mise au point des amorces.

Après avoir sélectionné des amorces ubiquitaires et spécifiques, il faut vérifier qu'elles répondent à un certain nombre de critères réactionnels [66]:

- Le Tm (melting temperature) est la température de fusion (ou température de demi-dénaturation ou température de dissociation), c'est-à-dire la température à laquelle 50% des amorces sont appariées (ou dissociées). Elle est fonction de la composition en bases et de la longueur en nombre de nucléotides de l'amorce. Cette température doit être comprise entre 55 et 65°C, et détermine la température d'hybridation correspondant au Tm – 4-5°, permettant une bonne fixation des amorces lors de l'étape d'hybridation.
- La différence de Tm entre les amorces sens et anti-sens ne doit pas dépasser 5°C, afin qu'elles s'hybrident à la même température.
- Le contenu en guanine et cytosine (%GC) doit être entre 40 et 60%, afin que la dissociation de l'amorce et de sa cible soit plus facile.
- Les amorces ne doivent pas former de dimères entre elles, pour éviter une compétition avec la cible, ce qui nuirait à la PCR. De plus, afin d'éviter une auto-amplification des amorces, celles-ci ne doivent pas être complémentaires l'une de l'autre, en région 3'.

- L'ADN polymérase permet l'élongation de l'amorce dans le sens 5'-3'. Il est donc important que l'appariement dans la région 3' de l'amorce à la cible soit stable, c'est-à-dire d'éviter les mésappariements dans cette région [67-69].

- Il faut éviter la présence de structures secondaires dans la région à amplifier.

ii Systèmes de détection

Les sondes fluorogéniques : Principe et conceptions des sondes TaqMan

Une première technique de détection du matériel génétique, au cours de l'amplification, utilise des sondes fluorogéniques, capables de s'hybrider spécifiquement sur le fragment cible à amplifier. Quatre technologies principales existent : hybridation de 2 sondes (HybProbes), balises moléculaires (Molecular Beacons), amorces scorpion (Scorpion primers) et la plus utilisée, les sondes d'hydrolyse ou sondes TaqMan [66]. Ces dernières sont composées d'une vingtaine de nucléotides et sont marquées aux extrémités 5' et 3' par des groupements fluorophores. Le fluorophore de l'extrémité 5' est dit émetteur (ou reporter) et dérive de la fluoresceine (FAM, Cy5). A l'extrémité 3', le fluorophore est nommé supprimeur (ou quencher). Lorsque la sonde est hybridée à l'ADN, les deux fluorophores sont proches, le quencher est ainsi capable d'inhiber l'émission de fluorescence (effet quenching) du fluorophore émetteur. L'étape d'élongation des amorces fait intervenir une ADN polymérase dotée d'une activité 5'-3' exonucléase spécifique de l'ADN double brin, et capable d'hydrolyser la sonde hybridée à sa cible spécifique. Ce clivage induit un éloignement entre les deux fluorophores. Le fluorophore émetteur est ainsi libéré de l'effet quenching, ce qui permet de lever l'inhibition de l'émission de fluorescence. Le signal de fluorescence est mesuré à la fin de chaque cycle d'amplification, en temps réel (**Figure 9**).

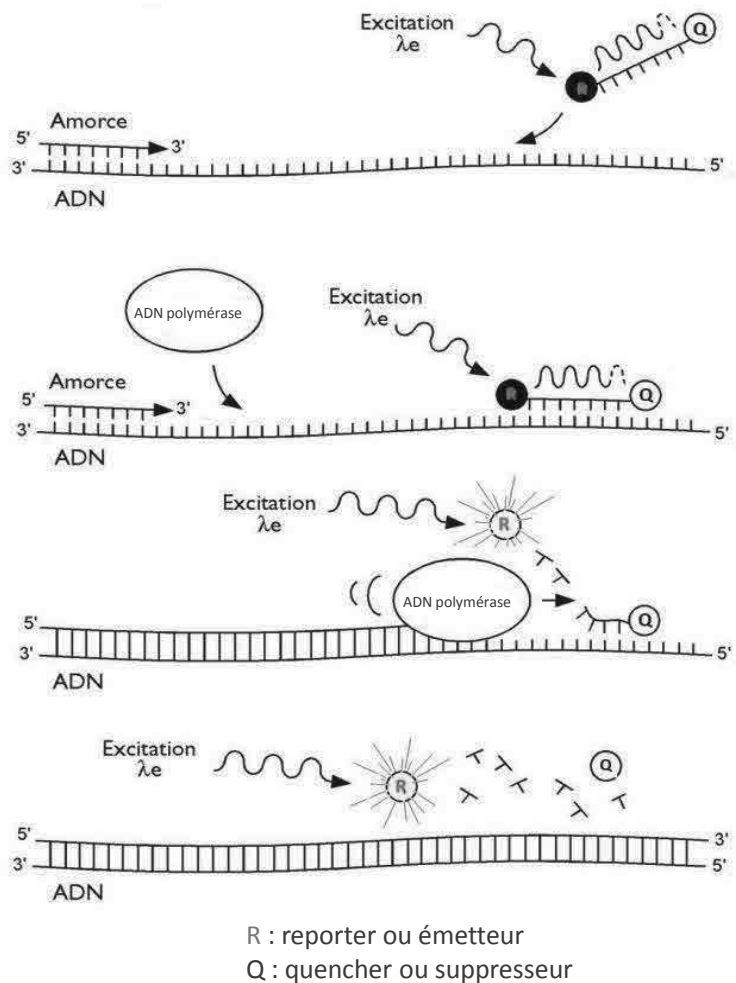


Figure 9 : Etapes de la PCR en temps réel par la méthode d'hydrolyse des sondes d'après Brodeur *et al.*[70]

Durant l'étape de dénaturation de l'ADN double brin, la sonde TaqMan et les amorces sont à l'état libre dans le milieu réactionnel. (a) A la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes (reporter ou émetteur (R) et quencher ou supprimeur (Q)) permet l'inhibition de la fluorescence. (b) La polymérisation débute. (c) L'ADN polymérase déplace la sonde puis l'hydrolyse. (d) Le fluorophore reporter est libéré de l'effet quenching du fluorophore quencher et permet ainsi la fluorescence.

Certaines règles régissant la conception des amorces s'appliquent aussi à la conception d'une sonde (sensibilité, spécificité, absence de structure secondaire, % GC). Elles doivent avoir une longueur comprise entre 20 et 40 nucléotides. En 5', la présence d'une guanine induit une suppression de la fluorescence de l'émetteur même après hydrolyse de la sonde, et est donc proscrite. A la différence des amorces, la spécificité d'une sonde doit principalement se situer en son centre [71, 72]. Un autre critère à prendre en compte est le T_m qui est fonction de la composition en bases et de la longueur de la sonde et qui conditionne la spécificité de l'amplification. Le T_m de la sonde se trouve autour de 70°C et doit être de 5 à 10°C plus élevé que celui des amorces. Cette différence de température entre les amorces et la sonde permet à cette dernière de s'hybrider avant les amorces et de

rester hybridée pendant l'étape combinée d'hybridation et de polymérisation réalisée en général autour de 60-62°C.

Les agents intercalants

Un autre système de détection utilise un agent intercalant, tel que le SYBR Green, capable de se fixer directement sur l'ADN double brin. A chaque étape d'hybridation et d'élongation d'un cycle de PCR, la molécule s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN double brin, et émet un signal fluorescent mesuré en fin d'élongation. Cette technique est moins spécifique que la sonde TaqMan.

iii Principe de la quantification par PCR en temps réel

L'émission de fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR et est mesurée à la fin de chaque cycle. L'intensité de fluorescence augmente à chaque cycle, en trois phases (**Figure 10**).

La phase d'initiation correspond à la phase où le signal émis par le fluorochrome n'est pas suffisant pour être détecté.

La phase exponentielle est celle pendant laquelle l'efficacité d'amplification est constante, avec le nombre de produits amplifiés qui double à chaque cycle. Pendant cette phase, la valeur seuil de fluorescence est fixée à partir du moment où il y a une augmentation significative de la quantité d'amplicons. La valeur de cycle correspondant au signal seuil est appelée Ct, pour Cycle threshold. Il existe alors une relation linéaire entre la quantité de molécule cible initialement présente dans l'échantillon, et le Ct obtenu pour cet échantillon [73]. Ainsi, plus un échantillon est concentré en matériel génétique, plus le nombre de cycles nécessaire pour détecter un signal est faible.

La phase plateau est la phase au cours de laquelle certains réactifs de la réaction deviennent limitants, ne permettant plus une amplification exponentielle.

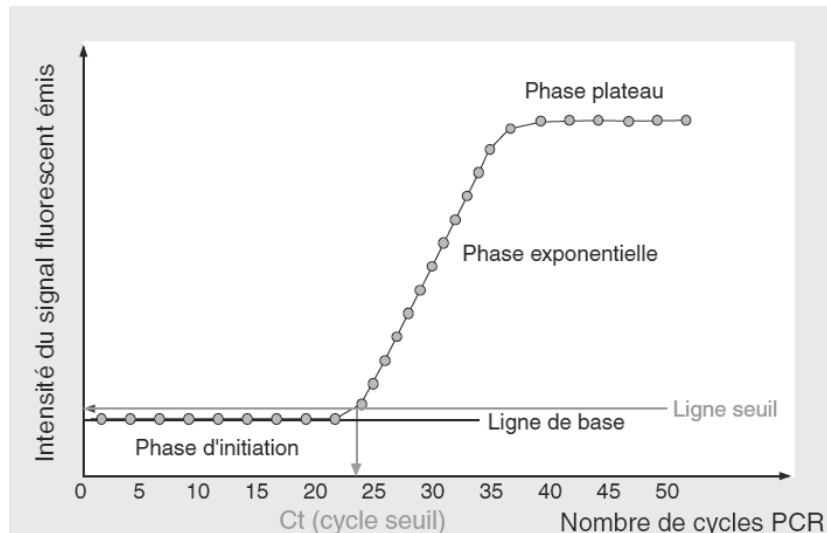


Figure 10 : Les différentes phases de la réaction de PCR temps réel d'après Tse C *et al.* [74]

La ligne de base reflète la fluorescence du bruit de fond. Le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles nécessaire pour obtenir un signal de fluorescence significativement plus élevé que la ligne de base.

Afin de quantifier le génome viral, il est nécessaire d'établir une courbe d'étalonnage à l'aide d'une gamme. Elle permet de construire la courbe d'étalonnage à partir de plusieurs dilutions de concentration connue d'un standard homologue externe. Pour chaque concentration, le nombre de Ct est déterminé lors de la réaction de PCR en temps réel. La droite d'étalonnage exprime alors les variations de Ct en fonction de la quantité connue de copies d'acide nucléique (en \log_{10}) de chaque dilution (**Figure 11**)[75].

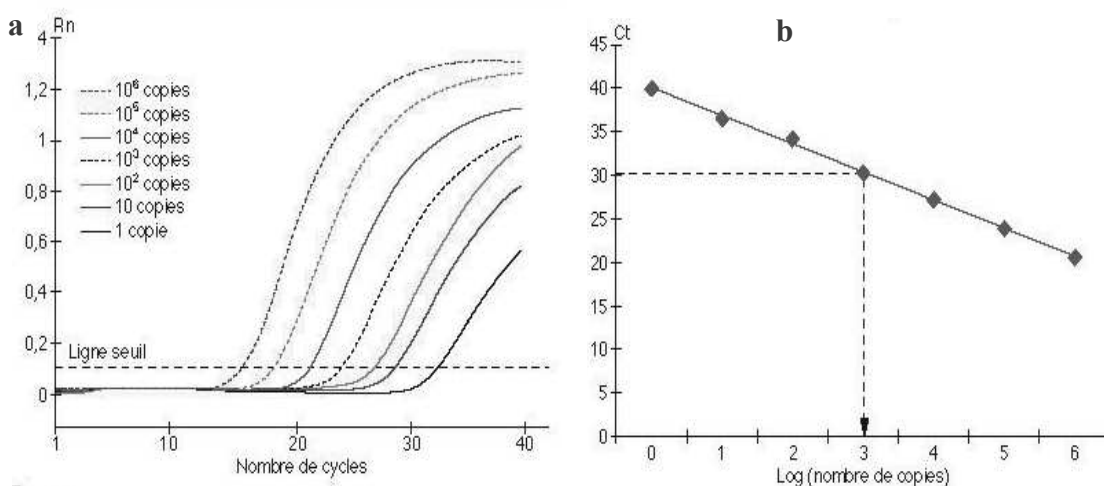


Figure 11 : Représentation des courbes de PCR en temps réel d'après Callot *et al.*[75].

(a) Courbes d'amplification des différentes dilutions du standard. La valeur du Ct est définie comme le nombre de cycles à partir duquel la fluorescence dépasse la ligne seuil. (b) Relation linéaire existant entre le Ct et le nombre de copies de standard. L'équation de la droite d'étalonnage permet de déterminer la quantité cible en reportant la valeur de Ct de l'échantillon.

Plusieurs critères permettent de valider la droite d'étalonnage et donc la qPCR. Premièrement, l'efficacité d'amplification, E, correspond à la proportion moyenne des molécules d'ADN cible se dupliquant à chaque cycle d'amplification. Elle est comprise entre zéro (aucune amplification ne s'est produite) et un (chaque molécule d'ADN cible a généré deux amplicons, après chaque cycle de PCR). Elle est calculée selon la formule :

$$E = 10^{-1/\text{pente}} - 1$$

Une bonne réaction doit avoir une efficacité comprise entre 0,9 et 1,10, ce qui correspond à des valeurs de pente entre -3,58 et -3,1. L'efficacité de PCR est un critère important pour la reproductibilité des résultats. Plus l'efficacité de PCR est grande, plus la PCR sera sensible et robuste, en particulier lorsque l'on travaille avec des échantillons présentant un faible nombre de copies d'acide nucléique. Cette reproductibilité est directement dépendante de la concentration en cible initiale ; plus cette dernière est forte, meilleure sera la reproductibilité. Le deuxième critère est le coefficient de régression linéaire r^2 , qui doit être supérieur à 0,95.

b) Méthodes commerciales

La quantification fiable des différents variants du VIH-1 doit être une caractéristique essentielle des tests commerciaux. La sous-quantification de l'ARN du VIH-1, ou même l'absence de détection de certaines souches, peut avoir des implications pratiques pour la prise en charge clinique des patients infectés. En effet, cela peut mener à une stratégie inappropriée pour la multithérapie antirétrovirale ou à des résultats faussement négatifs pour le diagnostic et le suivi de l'infection. Les fabricants des trousse de quantification doivent donc tenir compte de la forte diversité génétique qui peut atteindre près de 17 % de divergence de séquence au sein d'un même sous-type et jusqu'à 35 % entre les sous-types, en fonction de la région génomique étudiée du VIH-1. Ils doivent également faire face à l'émergence de nouveaux variants.

Les premières trousse de quantification ont été mises au point et optimisées pour la détection et la quantification du VIH-1/M sous-type B, prédominant dans les pays occidentaux au début de l'épidémie. Ces génomes étaient disponibles dans les banques de séquences mais cela ne reflétait pas l'épidémiologie moléculaire du VIH-1 dans le monde

entier, qui était et reste majoritairement « non-B » [76]. Ces techniques pouvaient donc échouer dans la détection de ces sous-types [77, 78]. Les trousse ont alors été adaptées à cette diversité génétique.

Parallèlement, les fabricants ont fait évoluer la technologie de quantification de la charge virale. En effet, avant 2005, les tests étaient basés sur des techniques d'amplification par PCR en point final, de NASBA (*nucleic acid sequence based amplification*) ou ADN branché. Leur seuil de quantification, c'est à dire la plus faible quantité d'ARN quantifiable, était compris entre 300 et 500 copies/mL [76]. Depuis 2005, la quantification par PCR en temps réel est la plus utilisée avec des seuils de quantification de 20 à 40 copies/mL.

Depuis fin 2010, six trousse de quantification en temps réel sont principalement utilisées dans la quantification de l'ARN VIH-1 et ciblent des régions variées du génome viral (**Figure 12**) :

- la trousse Real Time HIV-Assay (Abbott Molecular, États-Unis), qui cible la région hautement conservée de l'intégrase du gène *pol*. Elle permet de quantifier les quatre groupes de VIH-1 [79] à partir de 40 copies/mL [80].

- la trousse Cobas TaqMan HIV-1 v-2.0 (Roche Molecular Diagnostics, Suisse), qui amplifie deux régions : l'une conservée, située dans le LTR et l'autre dans le gène *gag*. Cela a permis d'améliorer la quantification de certaines souches et de détecter les groupes O et N, en comparaison à la première version de cette trousse qui ne ciblait que la région *gag* [81]. Elle est capable de mesurer des charges virales à partir de 20 copies/mL [80].

- la trousse Xpert HIV-1 viral load (Cepheid, États-Unis), qui amplifie une région du LTR. Elle est capable de détecter tous les groupes des VIH-1 avec une limite de quantification de 40 copies/mL [82-84].

- la trousse Versant HIV-1 RNA kinetic PCR assay (Siemens, Allemagne), qui amplifie une région très conservée du gène *pol*, avec une limite de quantification de 35 copies/mL [80]. Elle permet de quantifier les différents sous-types de VIH-1/M uniquement.

- La trousse Nuclisens EasyQ HIV-1 (Biomérieux, France) qui se base sur la technologie NASBA couplées à une détection en temps réel. Elle cible une région du gène *gag*, et est spécifique du groupe M [79]. Sa limite de quantification est de 25 copies/mL [85, 86].

- La trousse Aptima HIV-1 Quant Dx (Hologic Inc., CA), commercialisée plus récemment, qui utilise la technique de l'amplification médiée par la transcription (TMA en anglais) couplées à une détection en temps réel. Elle cible deux régions distinctes du génome : l'une dans le gène *pol* et l'autre dans le LTR. Cette technique permet de quantifier des charges virales à partir de 30 copies/mL [87, 88].

c) Méthodes académiques

A côté des trousse commerciales, on trouve des trousse académiques, permettant de quantifier spécifiquement certains variants du VIH. En effet, du fait de la diversité génétique de certaines souches et de la spécificité groupe M des trousse commerciales à la fin des années 90 et début des années 2000, des erreurs de quantification pouvaient survenir. Des méthodes académiques ont donc été développées pour le VIH-2 par le groupe «Quantification» de l'Agence Nationale de la Recherche sur le Sida et les hépatites virales (ANRS) puis commercialisée par Biocentric [89], et pour le VIH-1/O par le CNR VIH de Rouen (**Figure 12**). Pour ce dernier, une première qRT-PCR spécifique du groupe O a été mise au point en 2003, ciblant la région 3' LTR du VIH-1/O (qRT-PCR LTRO) [90]. Elle présentait un seuil de quantification élevé à 200 copies/mL [91] et manquait de spécificité, car de nombreux variants de groupe M étaient amplifiés. Une nouvelle qRT-PCR ciblant cette fois la région de l'intégrase (qRT-PCR INTO) a été développée en 2011 ; elle était plus sensible (seuil de détection 40 copies/mL) avec une spécificité de 100% [92] (**Figure 12**).

La qRT-PCR spécifique du VIH-2 de Biocentric cible la région gag et LTR. Son seuil de quantification est à 50 copies/mL et peut être optimisé à 10 copies/mL.

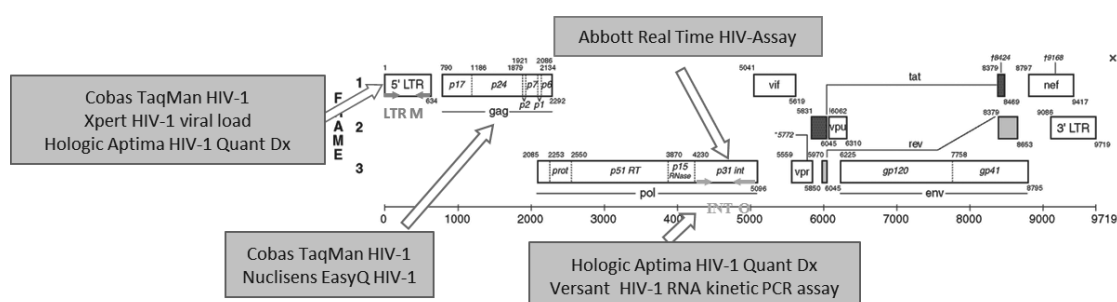


Figure 12 : Régions ciblées par les méthodes de quantification commerciales et académiques.

Les flèches en bleu ciblent les sites d'amplification des différentes méthodes de quantification commerciales non spécifiques de groupes. En rouge est indiquée la région qui est amplifiée par la qRT-PCR non commerciale spécifique pour amplifier les VIH-1/M. La région du génome amplifiée et spécifique du groupe O est indiquée en vert.

Dans un but de favoriser la mise en place du suivi dans les pays à ressources limitées, des alternatives aux trousseaux commerciaux souvent trop coûteuses et difficiles à implanter dans ces pays, ont été mises en place. La méthode spécifique du VIH-1/M (LTRM de Biocentric) a ainsi été développée [93]. Elle cible la région LTR avec un seuil de quantification à 300 copies/mL et une spécificité de 100%.

II. Travaux expérimentaux

A. Introduction

La forte diversité génétique de VIH ayant eu et ayant encore parfois un impact sur les outils de diagnostic et donc le suivi, les industriels ont dû faire évoluer leurs trousse pour détecter et quantifier un maximum de variants différents. Si désormais, les trousse de charge virale permettent la quantification théorique de tous les variants VIH-1, le paradoxe est que ces outils rendent la détection et le suivi des doubles infections M+O et des recombinants MO plus difficile.

L'utilisation des techniques précédentes spécifiques du VIH-1 de groupe M permettaient de suspecter des variants atypiques devant des discordances séro-moléculaires (discordance entre les résultats sérologiques positifs et la charge virale négative), immuno-virologique (discordance entre le bilan immunologique tel qu'une valeur basse de lymphocytes CD4+ et une charge virale négative) ou génotypiques. C'est ainsi qu'ont été identifiés un cas de surinfection M chez un patient infecté initialement par un VIH-1/O [55] et la présence d'un recombinant MO chez une patiente avec une charge virale indétectable sans traitement anti-retroviral et avec seulement 6 CD4/ μ L [60]. Il est important de bien dépister une forme recombinante MO ou une co-infection VIH-1/M+O, car les VIH-1/O sont naturellement résistants aux inhibiteurs non nucléosidiques de la TI (INNTI) et ont une moindre sensibilité à l'élvitgravir (inhibiteur de l'intégrase). La non-détection de ces formes peut donc mener à la mise en place d'une trithérapie comprenant ces molécules, avec un risque de non-efficacité du traitement.

Paradoxalement à la démarche des industriels, il faut donc disposer d'outils spécifiques de groupe pour dépister et suivre ces co-infections M+O ou recombinants MO associés à l'une ou aux deux souches parentales. Disposer de ces outils permettrait également de comprendre la physiopathologie des doubles infections et l'évolution des différentes espèces virales en l'absence de traitement, mais aussi la cinétique de réponse de chaque espèce sous traitement. Dans le cas particulier du diagnostic de la transmission de la mère à l'enfant, il est nécessaire d'avoir des outils spécifiques pour vérifier l'absence de réplication des différentes populations virales chez l'enfant.

Actuellement, deux techniques spécifiques de groupes sont utilisées au laboratoire de virologie du CHU de Rouen, pour confirmer et suivre ces infections atypiques ; la qRT-PCR INTO du CNR et la qRT-PCR LTRM de Biocentric. Or, une étude récente sur 23 formes recombinantes inter-groupes MO recensées chez 22 patients menée par le laboratoire, a permis d'identifier un point chaud de recombinaison dans les régions 5'LTR et 3'LTR, en plus de ceux décrits au niveau des gènes accessoires centraux (*vif*, *vpr*, *vpu*), du gène *env*, et de la TI. Sur les 16 formes recombinantes MO complètement séquencées, 10 présentent un point de cassure dans les LTR (5' et/ou 3'), soit 67% [94] (données personnelles non publiées). De plus, une étude a été réalisée au CHU de Rouen, afin de déterminer la localisation exacte de ces points de cassure dans la région LTR, chez des souches recombinantes. Les résultats ont montré que certaines souches ont un point de cassure dans la région amplifiée spécifiquement par la qRT-PCR LTRM [95, 96].

Dans le cadre du suivi des doubles infections M+O sans recombinant, ces deux qRT-PCR sont suffisantes pour quantifier séparément chaque souche virale. Cependant les co-infections peuvent évoluer vers l'émergence de formes recombinantes. Chez un patient infecté par une ou les deux formes parentales M et/ou O associée(s) à un recombinant MO, sans qu'il y ait eu de caractérisation préalable des différentes formes virales présentes, l'utilisation de deux qRT-PCR ciblant deux régions différentes du génome peut poser un problème. En fonction du site du point de cassure, le recombinant peut être soit quantifié par les deux qRT-PCR (recombinant avec une région intégrase O et une région LTRM) soit non quantifié (recombinant avec une région INTM et une région LTRO). De plus, la région LTR étant connue pour être un hot spot de recombinaison, un recombinant ayant un point de cassure situé au niveau de la zone d'amplification de la qRT-PCR LTRM, risque de ne pas être détecté et donc quantifié.

L'objectif de ce travail de thèse était donc de développer une méthode de quantification ciblant la région de l'intégrase et spécifique du groupe M (qRT-PCR INT M), en se situant dans la même région que la qRT-PCR INTO. La quantification dans la même région permettrait ainsi de suivre au moins deux populations différentes, une avec une région intégrase issue d'une souche M et une avec une région intégrase issue d'une souche O. Cependant, afin de savoir lesquelles sont des formes parentales ou des recombinants, des explorations préalables restent nécessaires. Ainsi, en fonction du profil de co-infection, la

qRT-PCR INTM quantifiera soit la forme parentale seule, soit la forme recombinante seule dont la région intégrase est issue d'une souche M, soit les deux.

B. Matériels et méthodes

1. Mise au point de la qRT-PCR spécifique de groupe M

a) Sélection des amorces et de la sonde

Les amorces et la sonde devaient cibler l'intégrase du VIH-1/M. La région choisie était proche de celle utilisée dans la qRT-PCR INTO mise au point précédemment par le laboratoire. Nous avons utilisé un alignement de 24 génomes complets de VIH-1/O et de 150 séquences du gène de l'intégrase de VIH-1/M sélectionnées dans la database Los Alamos HIV [97], afin de mettre au point deux couples d'amorces et deux sondes n'amplifiant pas le VIH-1/O, et permettant l'amplification de différents sous-types et CRFs du VIH-1/M. Les premières amorces et sondes dessinées étaient positionnées strictement au même endroit que celles de la qRT-PCR INTO. Les premiers résultats ont conduit à dessiner un autre couple d'amorces et une sonde, en modifiant leur taille ou leur site de fixation, en s'en éloignant de quelques nucléotides.

La quantification spécifique du VIH-1/M reposait sur une sonde d'hybridation, utilisant la technologie Taqman, comme pour la qRT-PCR INTO. Le fluorochrome émetteur fixé à l'extrémité 5' était FAM (6-carboxyfluorescein) et son émission était inhibée par un second fluorochrome suppresseur en 3'. Deux types de sondes ont été testés : deux sondes classiques avec un Eclipse Dark Quencher (EDQ) et une sonde présentant en 3' un résidu MGB (Minor Groove Binder) couplé au suppresseur NFQ (nonfluorescent quenching). La technique MGB permettait d'améliorer la spécificité de la sonde en la raccourcissant, tout en gardant une température de demi-dénaturation suffisamment importante par rapport à celles des amorces. Le résidu MGB augmentait l'affinité de la sonde à l'ADN.

La compatibilité entre les amorces et sondes a été testée avec le logiciel Oligo (Medprob, Olso, CA), sur trois souches de VIH-1/M (VIH-1/M sous-type B : HxB2 (GenBank, numéro d'accèsion K03455), VIH-1/M sous-type D : JX140670 et VIH-1/M recombinant CRF02_AG : AY371126), et deux souches de VIH-1/O (ANT70 sous-groupe H et MVP1580 sous-groupe T). Cette étape permettait de vérifier la stabilité interne des amorces, ainsi que l'absence de dimérisation, de formation d'épingles à cheveux et d'hybridation sur des sites secondaires.

De plus, ce logiciel calculait la température de demi-dénaturation (T_m) des amorces et des sondes. Il permettait donc de s'assurer qu'il existait bien une différence de température inférieure à 5°C entre les amorces sens et anti-sens, et une différence de plus de 10°C entre le T_m de la sonde et des amorces. Ainsi, trois amorces sens, deux amorces anti-sens et trois sondes ont été synthétisées par la société Eurogentec (Seraing, Belgium). Le nom des amorces et leurs séquences sont présentés dans le **Tableau 2** et leur position sur le génome sont indiquées sur la **Figure 13**.

Tableau 2 : Noms et séquences des sondes et amorces sens et anti-sens.

Nom	Nom complet (selon la nomenclature du laboratoire)	Séquence*
<i>Amorces sens 5'-3'</i>		
U3	Int-M-4890-U25	CAAATTTTCGGGTTTATTACAGRG
562U	Int-M-4900D-U24	GGGTTTATTWCAGRGACAGC
563U	Int-M-4901-U21	GGGTTTATTWCAGRGACAGCA
<i>Amorces anti-sens 5'-3'</i>		
L1	Int-M-4957-L21	CTACTGCCCTTCACCTTTCC
L2	Int-M-4965-L23	TCYTGTATTACTACTGCCCTTC
<i>Sonde 5'-3'</i>		
S1	S1-Int-M-4934-L24	GAAAGGACCAGCMAARCTWCTCT
S2	S2-Int-M-4931-L24	AGWAGYTTKGCTGGTCCTTTCCAA
S-MGB	S-Int-M-4935-L23-MGB	AGWAGYTTKGCTGGTCCTTT

* Code de dégénérescence : K = G ou T, R = A ou G, W = A ou T et Y = C ou T

Cinq combinaisons ont été ensuite testées sur quatre dilutions d'un même surnageant de raison 10, ayant des valeurs comprises entre de 2,5 à 5,5 \log_{10} copies/mL environ. Les combinaisons 1 à 4 ont été testées sur un surnageant de culture d'une souche de VIH-1/M sous-type B (Bru), et les combinaisons 4 et 5 sur un surnageant de culture de VIH-1/M CRF02_AG (Zach). Les cinq combinaisons ainsi testées étaient :

- Combinaison 1 = 562U + L2 + S1
- Combinaison 2 = 562U + L1 + S1
- Combinaison 3 = U3 + L1 + S1
- Combinaison 4 = 563U + L2 + S2
- Combinaison 5 = 563U + L2 + S-MGB

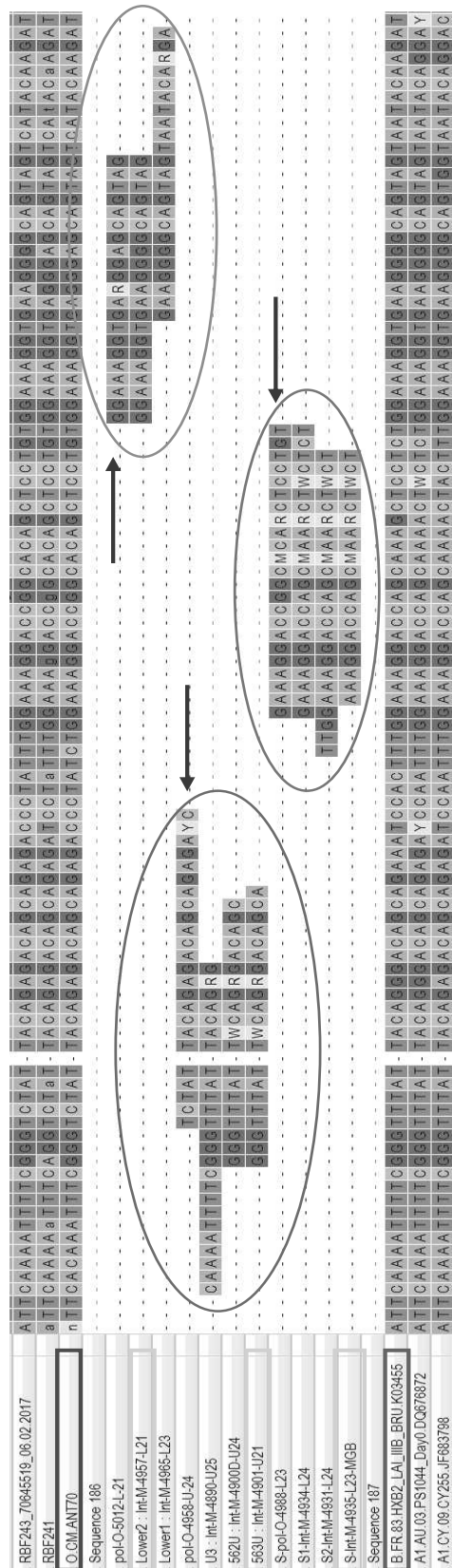


Figure 13 : Position des amorces sens, anti-sens et sondes synthétisées

Les flèches noires indiquent les amorces sens, anti-sens et la sonde de la qRT-PCR INTO. Les amorces sens testées sont entourées en vert. Les amorces anti-sens testées sont entourées en orange. Les sondes testées sont entourées en rouge. La souche de référence du VIH-1/M, HxB2, est entourée par un cadre bleu. La souche de référence du VIH-1/O, ANT70 est entourée par un cadre violet. Les amorces et la sonde sélectionnées pour la qRT-PCR INTM sont entourées en jaune.

b) Détermination des conditions réactionnelles de la qRT-PCR

i Extraction de l'ARN viral

L'extraction de plasma ou des surnageants a été effectuée avec l'automate EZ1 advanced XL à l'aide du kit EZ1® DSP Virus (Qiagen, Hilden, Allemagne), selon les recommandations du fabricant.

ii Gamme de quantification

La quantification de l'ARN du VIH a été réalisée avec une gamme fabriquée à partir d'un standard correspondant à un surnageant d'une souche de VIH-1/M CRF02_AG (Zach). Le standard correspond à un échantillon qui a une séquence amplifiable homologue à celle de la séquence cible, c'est-à-dire qui a une longueur et une composition en bases G et C similaires à ceux de la cible. Ainsi les amorces et la sonde permettant la détection et quantification de la séquence cible, amplifient également le standard. L'efficacité de PCR de la cible et du standard doit être la même. Le standard a été obtenu après dilution au 1/4000^{ème} du surnageant, dans du plasma négatif. Pour obtenir une valeur de référence, il a été quantifié par la méthode Xpert® HIV-1 Viral Load (Cepheid) à 6 log₁₀ copies/mL. Il a alors été extrait, aliquoté par volume de 7µL et congelé à -80°C. La gamme a ensuite été obtenue par dilution de raison 10 de l'extrait de l'un des aliquots, afin d'avoir quatre points entre 5 log₁₀ (10⁵ copies/mL) et 2 log₁₀ (100 copies/mL).

iii Amplification

Deux thermocycleurs ont été testés : le CFX96 de BioRad (Hercules, Etats-Unis) et le LC480 de Roche Applied Science (Penzberg, Allemagne). Deux mix d'amplification ont été comparés : RNA UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR system (Invitrogen®, Carlsbad, Californie, États-Unis) et TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, Californie, États-Unis). L'objectif était de sélectionner le couple thermocycleur-mix permettant la meilleure amplification des différents points testés.

Comparaison couple thermocycleur/mix habituel

La première étape a consisté à comparer la qRT-PCR INTM sur chaque thermocycleur avec le mix habituellement utilisé au laboratoire, selon les protocoles des fournisseurs. Des dilutions

de raison 10 ont été réalisées après extraction du matériel génétique d'un surnageant de culture Zach (CRF02_AG), quantifié à $6,62 \log_{10}$ copies/mL par la trousse Xpert (Cepheid). Les concentrations, après dilution, allaient de $5,6 \log_{10}$ (400 000 copies/mL) à $1,6 \log_{10}$ (40 copies/mL), avec une dilution supplémentaire à $2 \log_{10}$ (100 copies/mL). Les valeurs de Ct des 6 dilutions ont été comparées.

La quantification d'un témoin positif souche Zach (CRF02_AG) à une concentration de $4,62 \log_{10}$ copies/mL (quantifiée par la trousse Xpert) a également été testée. Ce contrôle permettait de s'assurer que la technique quantifie correctement les échantillons. Si la valeur obtenue avec la qRT-PCR INTM était comprise entre $\pm 0,5 \log_{10}$ de la valeur mesurée par la technique Xpert, l'expérience pouvait être analysée.

Nous avons testé la trousse RNA UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR system (Invitrogen), actuellement utilisée au laboratoire du CHU de Rouen pour la qRT-PCR INTO sur le LC480. Elle contient l'enzyme et le mélange RNA ultrasense 5X Reaction. Le mix utilisé pour notre qRT-PCR INTM contenait, pour un volume réactionnel de 20 μ L, 2,5 μ L de mix enzymatique (SuperScript III RT), 10 μ L de mix RNA ultrasense 5X Reaction, 1 μ L de chaque amorce (10 μ mol/L), et 1 μ L de la sonde (10 μ mol/L) spécifique du groupe M. Dans le cadre de cette mise au point, le CI (PrimerDesign) a été ajouté au mélange réactionnel. Les essais étaient réalisés avec deux volumes différents du mélange amorces/sonde permettant l'amplification du CI : 1 μ L et 1,5 μ L. Une quantité suffisante d'eau sans RNase a été ajoutée pour obtenir un volume de 20 μ L. Le volume ajouté de l'extrait était de 30 μ L, pour un volume final de 50 μ L.

Le deuxième mix enzymatique testé, TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied), était utilisé sur le thermocycleur CFX96, et contenu dans les trousse Biocentric VIH-1 et VIH-2. Le mix, de 10 μ L, défini pour le protocole qRT-PCR INTM contenait pour un échantillon : 5 μ L de mix enzymatique 4X, 0,5 μ L de chaque amorce (10 μ mol/L), 0,5 μ L de sonde (10 μ mol/L), 0,5 μ L du mix amorces/sonde du CI et 3 μ L d'eau. Le CI et le mélange amorces/sonde du CI étaient fournis dans la trousse Biocentric, à la différence de la trousse Invitrogen. Le volume d'échantillon utilisé était de 10 μ L, portant le volume de la réaction à 20 μ L. Un essai en doublant le volume de mix et d'échantillon a été réalisé, portant le volume total à 40 μ L.

Comparaison des programmes d'amplification

Lors de la deuxième étape, la trousse Invitrogen a été testée sur le CFX96, en adaptant le programme d'amplification de ce mix à ce thermocycleur, les programmes d'amplification étant légèrement différents entre la trousse Invitrogen et Applied (**Tableau 3**). Dans les deux cas, une étape préalable de transcription inverse était réalisée à 50°C, soit pendant 15min (Trousse Invitrogen), soit pendant 10min (Trousse Applied). Elle était suivie d'une étape d'activation enzymatique d'une durée de 2min (Invitrogen) ou 5min (Applied) à 95°C. Enfin, l'étape d'amplification était une succession de 50 cycles de dénaturation à 95°C pendant 15s et d'hybridation d'une durée d'une minute (protocole Applied) ou 30s (protocole Invitrogen).

Tableau 3 : Protocoles d'amplification spécifiques des trousse Applied et Invitrogen.

	Trousses	Invitrogen RNA UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR system	Applied TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix	Invitrogen RNA UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR system
	Thermocycleurs	LC480	Cfx96	Cfx96
Protocoles	Volume d'extrait	30µL	10 µL	30µL
	Volume de mix	20µL	10µL	20µL
	Transcription inverse	50°C ; 15 min	50°C ; 10 min	50°C ; 15 min
	Activation enzymatique	95°C ; 2 min	95°C ; 5 min	95°C ; 5 min
	Amplification : 50 cycles - dénaturation - hybridation	95°C ; 15 sec 60°C ; 30 sec	95°C ; 15 sec 60°C ; 1 min	95°C ; 15 sec 60°C ; 1 min

En rouge, sont indiquées les modifications apportées pour adapter le protocole d'amplification de la trousse Invitrogen sur le Cfx96. Les deux couples mix-thermocycleur qui ont été comparés, sont entourés en vert.

Nous avons donc comparé deux couples mix-thermocycleur : [Applied + CFX96] et [Invitrogen + CFX96]. Cinq points d'une dilution de raison 10 de l'extrait du surnageant Zach (400 000 à 40 copies/mL), cinq surnageants dilués de Zach à la concentration de 40 copies/mL et un témoin positif Zach à une concentration de 4,62 log₁₀ copies/mL ont été testés, afin de sélectionner le protocole le plus optimal. Pour ces deux essais, le choix du meilleur protocole de qRT-PCR INTM s'est basé sur les valeurs des Ct obtenues pour ces différents points, sur la proportion d'échantillons amplifiés à 40 copies/mL et sur la valeur de quantification du témoin positif.

Comparaison des températures d'hybridation

Après les essais mix-thermocycleur, plusieurs températures d'hybridation ont également été testées : 60°C, 58°C et 55°C. La température d'hybridation devait avoir une valeur inférieure de cinq degrés par rapport aux T_m des amorces. Cependant, si cette température est trop basse, il y a un risque d'hybridation non spécifique. Trois conditions de température ont donc été testées sur cinq dilutions à 40 copies/mL du surnageant Zach, un témoin positif Zach (à 4,62 log₁₀ copies/mL) et trois surnageants de VIH-1/O (YBF16, BCF003 et BCF178 dilués à 10⁻⁵). Les cinq dilutions à 40 copies/mL du VIH-1/M Zach permettaient de voir si la baisse de température d'hybridation améliorait l'amplification de cette faible concentration ; le témoin positif permettait de s'assurer que la qRT-PCR INTM quantifiait le VIH-1/M, comme attendu. Les tests sur les trois surnageants de groupe O permettaient de vérifier que la baisse de la température d'hybridation n'induisait pas une fixation non spécifique des amorces et/ou sonde.

iv Validation d'un contrôle interne

Un contrôle interne (CI) (Internal RNA extraction control, PrimerDesign, Southampton, Royaume-Uni) a été utilisé afin de s'assurer que toutes les étapes du processus moléculaire (extraction, retrotranscription et PCR) s'étaient déroulées comme attendu. Le CI a été testé à deux concentrations, l'une recommandée par le fournisseur et l'autre après une dilution au 1/10^{ème}. Ainsi, pour chaque concentration, 2µL de CI ont été ajoutés à 60µL d'ARN entraîneur. Ces essais ont permis de déterminer la concentration de CI la plus adéquate pour s'affranchir d'interférences liées à la présence du CI lors de l'amplification.

Les valeurs de Ct du CI mis dans chaque échantillon ont été comparées au Ct du CI du témoin « extraction », constitué uniquement d'eau dépourvue de RNase. Une augmentation supérieure de trois cycles pour l'amplification du CI de l'échantillon peut signifier la présence d'un inhibiteur de PCR dans l'échantillon.

2. Evaluation des performances analytiques et cliniques

Une fois les amorces, sonde et conditions de réalisation de la qRT-PCR INTM déterminées, nous avons procédé à l'évaluation de ses performances sur des échantillons cliniques et des surnageants issus de cultures cellulaires, représentatifs de la diversité génétique des VIH-1.

a) Spécificité clinique

La spécificité de groupe a été déterminée en testant 30 surnageants de culture de VIH-1/O dilués à 10^{-5} , parmi lesquels 17 souches appartenaient au sous-groupe H, 11 appartenaient au sous-groupe T, et deux étaient de sous-groupe indéterminé.

b) Seuil de quantification

Cette étape permettait de définir la limite de quantification, c'est-à-dire la plus faible concentration d'ARN d'un échantillon qui puisse être quantifiée. Pour déterminer cette limite, deux concentrations de surnageant Zach dilué dans du plasma négatif ont été testées : 80 et 100 copies/mL ($1,9$ et $2 \log_{10}$ copies/mL). Dix quantifications ont été réalisées pour chacune de ces concentrations.

Afin d'optimiser ce seuil, trois volumes d'échantillon à extraire ont été testés pour augmenter la quantité de particules virales présente dans l'échantillon : 200 μ L, 400 μ L et 200 μ L après une étape d'ultracentrifugation (pendant 1h à 240 000xG) d'un volume initial d'échantillon de 1mL. L'élution était réalisée dans 60 μ L. L'objectif était de déterminer le volume d'échantillon nécessaire pour obtenir une sensibilité de 100% d'un point à $2 \log_{10}$ (100 copies/mL). Pour cela, 10 dilutions proches de 100 copies/mL de cinq surnageants (deux CRF02_AG, deux sous-type B, et un CRF01_AE) ont été amplifiées avec les trois volumes testés. Les dilutions ont été quantifiées avec la technique commerciale Panther (Hologic) (nouvelle technique de quantification du VIH -1 mise en place au laboratoire en juillet 2017), afin de contrôler que la dilution réalisée était proche de 100 copies/mL.

c) Linéarité

Cette étape a consisté à déterminer les limites de validité de la relation linéaire, qui existe entre les concentrations observées et les concentrations théoriques des dilutions d'un échantillon. Les limites inférieure et supérieure de linéarité définissent l'intervalle de mesure (exprimé en concentration), à l'intérieur duquel les mesures peuvent être effectuées avec fiabilité. La linéarité a été évaluée en testant deux fois le surnageant Zach à des concentrations allant de 100 à 10^7 copies/mL (2 à $7 \log_{10}$) lors de la même expérience. Chaque point de la dilution était extrait avant quantification.

d) Répétabilité

Elle permet de s'assurer de la fidélité de la technique lors d'une même expérience ; elle évalue la variabilité intra-essai. Pour cela, le surnageant de culture Zach, dilué à 10^{-4} , était soumis à 20 extractions, puis amplifié lors d'une même manipulation. La moyenne et l'écart type ont été calculés. L'objectif était d'avoir un écart type inférieur à $0,25 \log_{10}$ copies/mL [98].

e) Reproductibilité

Elle permet également de vérifier la fidélité de la technique, mais dans des conditions différentes et d'évaluer la variabilité inter-essai. Lors de chacune des manipulations ($n = 43$) permettant d'évaluer les performances de cette nouvelle qRT-PCR, un témoin de reproductibilité, préparé à partir du surnageant de culture Zach dilué à 10^{-5} , était quantifié. Il a été quantifié lors de chaque essai de qRT-PCR INTM, après avoir déterminé les différents paramètres de cette dernière. La moyenne, l'écart type et le coefficient de variation ont été calculés pour évaluer la reproductibilité de la technique. L'objectif était d'avoir un écart type inférieur à $0,25 \log_{10}$ copies/mL et un coefficient de variation inférieur à 5%.

De la même façon, la reproductibilité a pu être évaluée avec les valeurs de Ct des quatre points de gamme (2 à $4 \log_{10}$ copies/mL) obtenus à chaque essai.

f) Sensibilité clinique

La sensibilité clinique correspond à la capacité de cette nouvelle technique à détecter et quantifier les différents variants du VIH-1/M. Elle a été réalisée par comparaison aux résultats des échantillons initialement quantifiés avec la technique RealTime HIV-1 sur l'automate M2000 (Abbott, États-Unis), utilisée à ce moment-là en routine au laboratoire.

Nous avons testé 200 échantillons de plasma de patients différents, collectés dans des tubes EDTA, entre 2006 et 2016. Les échantillons testés représentaient la diversité intra-groupe M circulant en France (sous-type B, $n=53$; sous type C, D, G et H, $n=6$; sous-type A et F, $n=5$ et sous-type J, $n=3$) et des formes recombinantes circulantes (CRF02, $n=48$; formes complexes, $n= 9$; CRF01, $n=8$; CRF06, $n=6$, CRF18, CRF37, CRF42, $n= 5$; CRF11, $n=4$; CRF03, CRF14, CRF22, $n = 3$; CRF12, CRF19, CRF45, $n= 2$, CRF09, CRF13, CRF17, CRF36, CRF43, $n= 1$). Les

charges virales allaient de $2,03 \log_{10}$ à $6,34 \log_{10}$ copies/mL (106 copies/mL à $2,2 \cdot 10^6 \text{ copies/mL}$). Parmi ces 200 échantillons, 100 avaient une charge virale inférieure à $3 \log_{10}$ (1000 copies/mL) dont 56, une charge virale comprise entre 2 et $2,7 \log_{10}$ (100 et 500 copies/mL) et 44, entre $2,7$ et $3 \log_{10}$ (500 et 1000 copies/mL). Parmi les 100 échantillons restants, 47 échantillons avaient une charge virale comprise entre 3 et $4 \log_{10}$, 32 entre 4 et $5 \log_{10}$ et 21 une charge virale supérieure à $5 \log_{10}$.

g) Préparation de plasmas doublement infectés par des souches de VIH-1/M et de VIH-1/O

Afin de s'assurer de l'absence d'interférences lors de la quantification, en présence de deux souches de groupes différents dans les plasmas co-infectés, nous avons préparé quatre mélanges différents. Ils contenaient une souche de VIH-1/M (parmi deux CRF02, un sous-type B ou D) et une souche de VIH-1/O (parmi deux sous-groupes T ou H), différentes pour chaque mélange. Les mélanges ont été réalisés à partir de surnageants dilués à 10^{-4} dans du plasma négatif pour le VIH-1/M. Les souches de VIH-1/M ont été quantifiées avec la méthode Hologic, avant la réalisation des mélanges avec les souches de VIH-1/O ; cela permettait de calculer les valeurs théoriques de la souche de VIH-1/M après les mélanges. Trois proportions ont été testées (**Tableau 4**). Cela consistait à mélanger $180\mu\text{L}$ de plasma contenant la souche de VIH-/M avec $20\mu\text{L}$ de plasma contenant la souche de VIH-1/O pour la proportion 90M/10O et inversement pour la proportion 10M/90O, et $100\mu\text{L}$ de chaque plasma pour la proportion 50M/50O. Les mélanges ont été quantifiés une seule fois, avec le protocole défini pour la qRT-PCR INTM, utilisant un volume d'échantillon à extraire de $200\mu\text{L}$.

Tableau 4 : Mélange simulant une double infection M+O

	Proportion %M/%O	Valeur théorique de la concentration du VIH- 1/M (log ₁₀ copies/mL)	CV des surnageants de VIH-1/M (log ₁₀ copies/mL)*
Mélange 1 VIH-1/M CRF02 + VIH-1/O sous-groupe T	90/10	6,02	6,07
	50/50	5,77	
	10/90	5,07	
Mélange 2 VIH-1/M sous-type B + VIH-1/O sous-groupe H	90/10	5,40	5,44
	50/50	5,14	
	10/90	4,44	
Mélange 3 VIH-1/M sous-type D + VIH-1/O sous-groupe T	90/10	5,20	5,25
	50/50	4,95	
	10/90	4,25	
Mélange 4 VIH-1/M CRF02 + VIH-1/O sous-groupe H	90/10	5,83	5,87
	50/50	5,57	
	10/90	4,87	

*La valeur indiquée est la mesure de la charge virale des surnageants VIH-1/M, avant la réalisation des mélanges, par la technique Panther (Hologic).

h) Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel MedCalc (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium).

Pour les analyses de chaque point de gamme, un diagramme en boîte a été réalisé.

Les résultats de quantification avec la technique Abbott et la technique qRT-PCR INTM ont été comparés dans un diagramme de dispersion, et une analyse de régression linéaire simple a fourni une valeur de coefficient de détermination r^2 .

L'analyse de Bland-Altman des échantillons a été utilisée pour évaluer l'accord entre la technique Abbott Real-Time HIV-1 et la qRT-PCR INTM. Une différence maximale inférieure à 0,5 log₁₀ copies/mL entre les deux techniques a été considérée comme acceptable. En effet, lors du suivi de la charge virale d'un patient, une variation supérieure à 0,5 log₁₀ copies/mL entre deux échantillons successifs est considérée comme un changement significatif dans la réplication du virus.

3. Séquençage de la région intégrase des virus présentant une discordance de quantification

a) Échantillons séquencés

Un séquençage de l'intégrase des échantillons cliniques présentant une discordance entre la technique qRT-PCR INTM et la technique Abbott, à deux reprises, a été réalisé, s'il n'était pas déjà disponible. L'objectif était d'identifier d'éventuelles mutations susceptibles d'expliquer ces différences de quantification. Ces mutations pouvaient être ainsi responsables d'un moindre appariement, des amorces ou de la sonde de révélation dessinées.

b) Extraction de l'ARN viral

L'extraction ARN a été effectuée avec l'EZ1 advanced XL (Qiagen®) à l'aide du kit EZ1® DSP Virus (Qiagen®), selon les recommandations du fabricant. Un volume de 200µL d'extrait était prélevé et l'élution était réalisée dans 60µL. Les extraits ont été conservés à -80°C.

c) Amplification de la région intégrase, révélation et purification

Les régions intégrase ont été amplifiées par un système de PCR nichées couplant une PCR externe suivie d'une PCR interne.

PCR externe

Dix microlitres d'extrait d'ARN ont été ajoutés à 40µL de mélange réactionnel contenant 2µL de chaque amorce à 10µmol/L, 8µL de MgSO₄ à 5mmol/L, 2µL d'eau dépourvue de RNase, 1µL de RT/Platinum TAQ Hifi, et 25µL de mix provenant du kit SuperScript III One step RT-PCR for long template (Invitrogen®, Carlsbad, Californie, États-Unis), selon les recommandations du fournisseur. L'enzyme utilisée était une Taq polymérase avec une activité correctrice, augmentant la spécificité de la PCR. Les conditions d'amplification comprenaient une première étape de transcription inverse à 50°C pendant 30 minutes, suivi d'une dénaturation à 94°C pendant 2 minutes, puis une deuxième étape de 35 cycles comprenant chacun une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 55°C

pendant 30 secondes puis une élongation à 68°C pendant 2 minutes. L'élongation finale était de 10 minutes à 68°C. Les produits d'amplification ont été ensuite conservés à 4°C.

PCR interne

Pour réaliser la PCR interne, 2µL de produit de PCR externe ont été prélevés et ajoutés à 48µL de mélange réactionnel contenant 2µL de chaque amorce à 10µmol/L, 2µL de MgCl₂ à 25mmol/L, 17µL d'eau dépourvue de RNase et 25µL de tampon de réaction à l'aide du Kit HotStartaq MasterMix (Qiagen®, Hilden, Allemagne). Les conditions d'amplification comprenaient une première étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 15 minutes suivie de 30 cycles comprenant chacun une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 55°C pendant 30 secondes puis une élongation à 72°C pendant 1 minute 30. L'élongation finale était de 7 minutes à 72°C. Les produits d'amplification ont été ensuite conservés à 4°C.

Les amplicons obtenus ont ensuite été déposés sur gel d'agarose à 1% et soumis à un champ électrique (110V pendant 40min), permettant une séparation selon leur poids moléculaire. La taille des fragments a été contrôlée grâce à la présence d'un marqueur de taille.

d) Séquencage de la région intégrase et analyse des séquences

La région de l'intégrase a été séquencée par la méthode de Sanger à l'aide du séquenceur Beckman Coulter Ceq8000 (Brea, Californie, Etats-Unis). Dans chaque puits d'une plaque de 96 puits, nous avons mélangé 4µL de DCTS Quick Start Kit (Beckman Coulter), 11µL d'eau dépourvue de RNase, 3µL d'amorce à 1,6pmol/µL, et 2µL de l'amplicon purifié. Une réaction de séquence a été effectuée selon le programme d'amplification suivant : une dénaturation à 96°C pendant 25 secondes, une hybridation à 50°C pendant 25 secondes puis une élongation de 4 minutes à 60°C pendant 30 cycles. Ensuite, des étapes de précipitation à l'éthanol et de purification suivaient la réaction de séquence. La plaque a été placée dans le séquenceur, dont le principe repose sur l'électrophorèse capillaire. Une analyse spectrale des fluorescences émises par les didéoxyriboNucléotides TriPhosphates (ddNTPs) a permis de déterminer la séquence des fragments amplifiés à l'aide d'une séquence de référence HxB2.

Les séquences ont été comparées à celles des amorces sens, anti-sens et à la sonde afin de rechercher d'éventuelles mutations sur les génomes viraux.

C. Résultats

1. Sélection du couple amorces/sonde

La sélection du couple amorces/sonde était basée sur deux critères : l'amplification des différentes dilutions de surnageant (2,5 ; 3,5 ; 4,5 et 5,5 log₁₀ copies/mL) et l'intensité de fluorescence émise pendant la PCR du point à la plus forte concentration. Les résultats des différents tests sont présentés dans le **(Tableau 5)**. Dans un premier temps, les combinaisons 1, 2 et 3 ont été testées avec des dilutions d'un extrait du surnageant Bru (sous-type B). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la combinaison n°1 (562U + L2 + S1), avec laquelle les quatre dilutions étaient amplifiées. Seule la plus forte concentration (200 000 copies/mL ; 5,3 log₁₀) était amplifiée avec les combinaisons n°2 (562U + L1 + S1) et n°3 (U3 + L1 + S1). Cependant, avec la combinaison n°1, l'intensité de fluorescence de la plus forte concentration était faible (1400 RFU), les valeurs attendues devant se situer aux alentours de 10000 RFU. Une nouvelle amorce sens (563U) a alors été mise au point, afin d'optimiser la PCR. Elle correspondait à l'amorce 562U avec une adénine supplémentaire en 3', rapprochant ainsi son Tm de celui de l'amorce anti-sens. Cette combinaison n°4 (563U + L2 + S2) a ensuite été testée avec le même surnageant Bru. Elle a montré une meilleure fluorescence que la combinaison n°1, tout en conservant l'amplification des quatre points de dilution. Malgré tout, cette intensité de fluorescence restait encore un peu faible (3500 RFU). L'hypothèse était que les différentes amorces et la sonde ne se fixaient pas correctement sur la souche Bru, conduisant à tester cette quatrième combinaison sur un autre surnageant de VIH-1/M CRF02_AG (Zach). La fluorescence du point le plus concentré était alors meilleure (7000 RFU) que celle obtenue précédemment, mais toujours faible. Une nouvelle sonde, basée sur la technique MGB, a été par la suite dessinée, afin d'augmenter la différence de température d'hybridation entre les amorces et la sonde, et donc d'optimiser davantage la PCR. En effet, cette différence ne semblait pas suffisante pour les quatre premières combinaisons testées, ce qui pouvait avoir un impact sur la sensibilité de la PCR, et donc expliquer les premiers résultats obtenus. La combinaison n°5 contenant cette nouvelle sonde, a été testée sur le surnageant CRF02_AG, et le point le plus concentré avait une fluorescence à 10000 RFU, comme attendu **(Tableau 5)**.

Le couple retenu était donc celui avec l'amorce sens (563U), se fixant en position 4901 de la souche HxB2, et l'amorce anti-sens (L2) en position 4965, générant un produit d'amplification de 88 paires de bases. La détection spécifique du VIH-1/M reposait sur une sonde d'hybridation (S-MGB) selon la technologie Taqman.

Tableau 5 : Résultats des différents tests réalisés avec les cinq combinaisons.

Combinaison	N° 1 562U+L2+S1	N° 2 562U+L1+S1	N° 3 U3+L1+S1	N° 4 563U+L2+S2	N° 5 563U+L2+SMGB
Points de dilution amplifiés	4/4	1/4 (la plus forte concentration)	1/4 (la plus forte concentration)	3/4 (Bru) 4/4 (Zach)	4/4 (Zach)
Fluorescence du point le plus concentré de Bru	1400	1000	Absence d'amplification	3500	Non testé
Fluorescence du point le plus concentré de Zach	Non testé	Non testé	Non testé	7000	10000

2. Détermination des conditions réactionnelles de la qRT-PCR

a) Amplification

i Comparaison thermocycleur/mix habituel

La première étape des manipulations a consisté à comparer la qRT-PCR INTM, réalisée sur chaque thermocycleur avec la trousse habituellement utilisée [Invitrogen + LC480] et [Applied + CFX96], selon le protocole fournisseur.

Les résultats ont montré que la trousse Applied sur le CFX96 apportait de meilleurs résultats (**Tableau 6**). En effet, la valeur de quantification du témoin positif obtenu avec cette trousse était de $4,79 \log_{10}$, pour une valeur attendue de $4,62 \pm 0,5 \log_{10}$. A la différence, la manipulation sur le LC480 a donné une valeur bien plus faible à $3,21 \log_{10}$, en dehors de l'intervalle attendu. De plus, les valeurs de Ct des différentes dilutions de la gamme sur le CFX96, plus faibles qu'avec le LC480, étaient favorables à une meilleure détection pour une même concentration. Ceci a été confirmé avec la concentration à 100 copies/mL, qui était amplifiée avec le CFX96, et non avec le LC480.

Tableau 6 : Comparaison Applied-Cfx96 et Invitrogen-LC480

Trousses	Invitrogen RNA UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR system		Applied TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix	
Thermocycleurs	LC480		Cfx96	
Dilution du surnageant CRF02_AG (copies/mL) (Zach)	Ct cible	*Concentration en log ₁₀	Ct cible	*Concentration en log ₁₀
400 000	30,33	5,6	27,28	5,6
40 000	31,91	4,6	31,14	4,6
4 000	34,96	3,6	35,02	3,6
400	39,09	2,6	37,31	2,6
100	-	N	38,41	1,6
40	-	N	-	N
Témoin positif	36,80	3,21	30,38	4,79

* concentrations théoriques des différentes dilutions du surnageant Zach et concentration calculée du témoin positif. Les tirets dans les colonnes Ct cible correspondent à l'absence d'amplification de l'échantillon. Le N correspond à la non-détection de la charge virale

Nous avons ensuite testé la trousse Applied sur le CFX96 en doublant le volume de mix et d'échantillon (soit 20µL de mix et 20µL d'échantillon), dans le but d'amplifier le point à 40 copies/mL (pour se rapprocher des seuils de sensibilité des techniques commerciales). Malheureusement, cela n'a pas permis de l'amplifier.

ii Comparaison des programmes d'amplification

Dans un deuxième temps, nous avons comparé la combinaison [Applied-Cfx96] avec la combinaison [Invitrogen-Cfx96], dans le but d'améliorer la détection du point le plus bas (40 copies/mL), étant donné les volumes d'extrait et de mix plus importants avec la trousse Invitrogen (30µL d'extrait et 20µL de mix contre 10µL d'extrait et de mix avec la trousse Applied). Les résultats obtenus étaient meilleurs, puisque sur les cinq échantillons à 40 copies/mL, trois étaient amplifiés avec le mix Invitrogen contre aucun avec le mix Applied. Les concentrations obtenues pour ces trois échantillons étaient toutes proches de 40 copies/mL. Pour les deux conditions, les valeurs des Ct des différentes dilutions de la gamme étaient quant à elles comparables, avec l'absence d'amplification de la dilution à 40 copies/mL. Dans les deux cas, la valeur calculée du témoin positif était dans les valeurs

attendues ($4,62 \pm 0,5 \log_{10}$) (**Tableau 7**). Il a alors été décidé par la suite d'optimiser les conditions opératoires, en utilisant la trousse Invitrogen sur l'automate CFX96.

Tableau 7 : Comparaison Applied-Cfx96 et Invitrogen-Cfx96

Trousse		Applied TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix		Invitrogen RNA UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR system	
Thermocycleurs		Cfx96		Cfx96	
		Ct cible	*Concentration en \log_{10}	Ct cible	*Concentration en \log_{10}
Témoin positif		30,23	4,653	30,96	4,581
Gamme	400 000	27,04	5,6	27,37	5,6
	40 000	30,37	4,6	30,85	4,6
	4 000	34,03	3,6	34,39	3,6
	400	36,62	2,6	38,01	2,6
	40	-	1,6	-	1,6
Echantillons	40 copies/mL : 1	-	N	41,19	1,697 (50)
	40 copies/mL : 2	-	N	-	N
	40 copies/mL : 3	-	N	-	N
	40 copies/mL : 4	-	N	41,36	1,647 (44)
	40 copies/mL : 5	-	N	41,69	1,556 (36)

* Concentrations théoriques des différentes dilutions de la gamme et concentration calculée du témoin positif. Les tirets dans les colonnes Ct cible correspondent à l'absence d'amplification de l'échantillon.

iii Comparaison des températures d'hybridation

Nous avons testé trois températures d'hybridation, le but étant de déterminer la température apportant la meilleure sensibilité, tout en restant spécifique du VIH-1/M. En effet, une diminution de la température d'hybridation améliore la fixation des amorces/sonde et donc la sensibilité analytique à 40 copies/mL, mais augmente la fixation non spécifique. A 55°C, quatre dilutions à 40 copies/mL de VIH-1/M sur les cinq testées, étaient amplifiées (**Tableau 8**). Cette température n'était pas optimale pour l'amplification du VIH-1/M, et nous avons donc été décidés de ne pas tester les échantillons de VIH-1/O. A 58°C, trois souches de VIH-1/M sur cinq ont été amplifiées, et un surnageant de VIH-1/O était également amplifié. A 60°C, trois souches de VIH-1/M ont été amplifiées, sans que les trois souches de VIH-1/O ne l'aient été (**Tableau 8**). Les changements de température d'hybridation n'ont pas eu d'influence sur la quantification du témoin positif. Etant donné que les amorces et/ou la sonde n'étaient plus suffisamment spécifiques du VIH-1/M à une

température d'hybridation inférieure à 60°C. La température d'hybridation à 60°C a donc été retenue, afin de ne pas amplifier de VIH-1/O.

Tableau 8 : Impact de la modification de la température d'hybridation sur la sensibilité et la spécificité.

	Sensibilité	Spécificité	
Echantillons Testés Température d'hybridation	VIH-1/M (n = 5 dilutions à 40 copies/mL du surnageant Zach)	VIH-1/O (n = 3 surnageants)	CV du témoin positif Zach (4,62 log ₁₀ copies/mL)
55° C	4/5 échantillons amplifiés	Non réalisé	4,74
58° C	3/5 échantillons amplifiés	1/3 échantillon amplifié	4,52
60° C	3/5 échantillons amplifiés	0/3 échantillon amplifié	4,65

Le protocole d'amplification ainsi retenu sur le thermocycleur CFX96 avec la trousse Invitrogen était le suivant :

Transcription inverse	50°C 15 min	
Dénaturation	95°C 5 min	} 50 cycles
Amplification : Dénaturation	95°C 15 sec	
Hybridation	60°C 1 min	

b) Validation d'un contrôle interne

Le volume de CI ajouté dans l'ARN entraîneur, avant l'extraction, était de 2 µL. Le contrôle interne choisi était celui initialement présent dans le mix Applied (LTRM) de la trousse Biocentric, utilisé pour la quantification du VIH-1/M. Les recommandations d'utilisation du fournisseur étaient d'ajouter 0,5 µL du couple amorces/sonde pour un volume de mix de 10 µL et un volume d'extrait de 10 µL. Nous avons donc adapté le volume du couple amorces/sonde du CI au mix de la trousse Invitrogen. Ce dernier étant de 20 µL, nous avons décidé de doubler le volume du couple amorces/sonde en le portant à 1 µL. Dans ces conditions, les Ct obtenus pour le CI avaient une valeur autour de 40 et la fluorescence était très faible (200 RFU) (**Figure 14**). Cela aurait pu être anticipé, étant donné le volume d'extrait utilisé avec la trousse Invitrogen plus important (30µL), et donc une quantité de CI dans chaque puits d'amplification également plus importante. Il y avait donc un risque que le

couple amorces/sonde du CI soit en quantité limitante. Dans cette situation, il peut alors être difficile d'interpréter des résultats d'une PCR quantitative avec un CI ayant ce type de courbes. Nous avons donc changé le volume du couple amorces/sonde du CI, en le fixant à 1,5 μL , ce qui a permis d'obtenir des valeurs de Ct autour de 32 et une fluorescence à 800 RFU (valeurs obtenues avec la qRT-PCR LTRM).

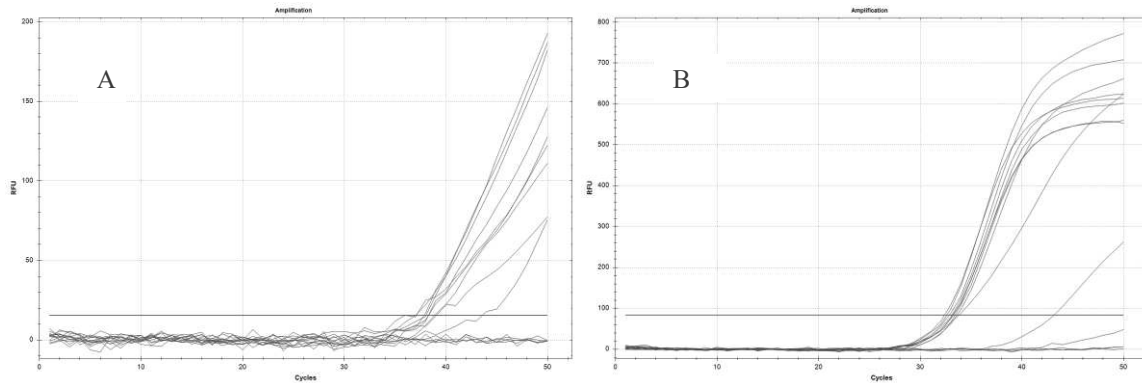


Figure 14 : Comparaison des courbes d'amplification du CI avec des volumes différents du couple amorces/sonde.

En (A), volume du couple amorces/sonde utilisé de 1 μL et en (B), volume du couple amorces/sonde utilisé de 1,5 μL .

Les différentes étapes qui ont permis de définir les conditions opératoires de la qRT-PCR INTM sont résumées dans la **Figure 15** ci-après.

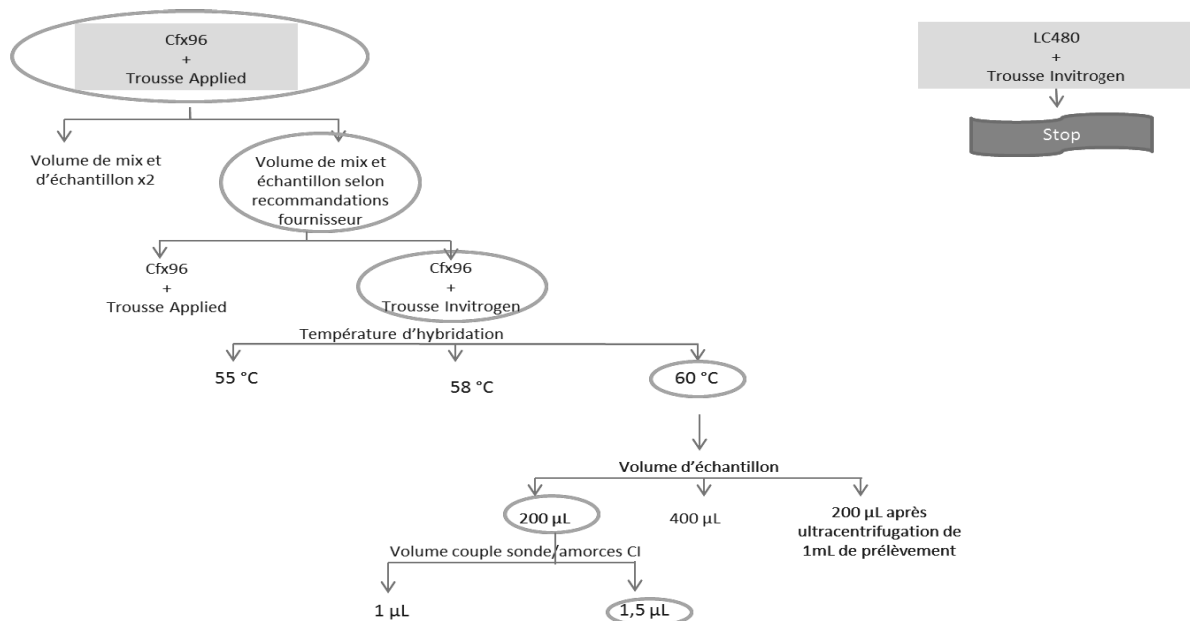


Figure 15 : Résumé des étapes de mise au point de la technique de qRT-PCR INTM

Les différentes conditions opératoires testées pour chaque étape de mise au point, sont représentées sur cette figure. Les conditions opératoires sélectionnées sont entourées en vert.

3. Performances analytiques de la qRT-PCR INTM

a) Spécificité clinique

La spécificité de la nouvelle technique de qRT-PCR INTM était très bonne. Aucune des 30 souches de VIH-1/O n'a été amplifiée. L'extraction avait bien eu lieu, car le Ct de CI des différents échantillons avait bien des valeurs comprises entre +/- 3 Ct par rapport au CI du témoin d'extraction.

b) Seuil de quantification

Pour évaluer la sensibilité de cette nouvelle qRT-PCR INTM, nous avons testé dans un premier temps le surnageant Zach à la concentration de 100 copies/mL ($2 \log_{10}$) ; 100% des échantillons ont été amplifiés, cependant, deux échantillons sur 10 nécessitaient un plus grand nombre de cycles pour être détectés (43,7 et 44,4 pour des valeurs attendues autour de 39,9), avec donc un risque de quantification erronée. Nous avons décidé ensuite de tester la concentration à 80 copies/mL, pour laquelle uniquement huit échantillons sur 10 étaient amplifiés.

Dans le but d'améliorer davantage la sensibilité analytique, nous avons testé deux autres volumes d'extraction avec une concentration à 100 copies/mL (400 μ L et 200 μ L après ultracentrifugation de 1mL pendant une heure à 240 000xG). En théorie, l'extraction de 400 μ L devait permettre de doubler la quantité d'ARN à amplifier, tandis que l'extraction après centrifugation de 1mL de plasma, permettait de multiplier par cinq la quantité d'ARN obtenue. Cinq surnageants, représentant le sous-type B (MaOI et GuFu), CRF02_AG (AAS287 et KaJe) et CRF01 (AoKa), ont été dilués dans du plasma négatif en VIH-1, afin d'obtenir une concentration autour de 100 copies/mL. Dix aliquots de chacun des surnageants dilués ont été testés selon les trois protocoles d'extraction. Les valeurs de charges virales des cinq surnageants dilués, mesurées avec la technique de référence (Hologic) étaient $2,52 \log_{10}$ (333 copies/mL), $2,25 \log_{10}$ (177 copies/mL), $1,95 \log_{10}$ (90 copies/mL), $1,93 \log_{10}$ (86 copies/mL) et $1,89 \log_{10}$ (70 copies/mL) (**Tableau 9**) respectivement pour GuFu, AAS287, AoKa, KaJe et MaOI. Le surnageant GuFu était très mal quantifié avec notre nouvelle méthode ; en effet, après l'extraction de 200 μ L, seul un échantillon sur les 10 était détecté mais non quantifié, les autres étant tous indétectables. Le nombre d'échantillons détectés

non quantifiés augmentait à six sur 10 avec une extraction de 400µL, et à sept sur 10 après extraction de 200µL ultracentrifugés. Les données de ce surnageant n'ont donc pas été exploitées. Pour les autres souches, le seuil de sensibilité, avec un volume d'extraction de 200µL, n'était pas à 100 copies/mL. En effet dans chaque cas, un ou deux prélèvements sur les 10 amplifiés n'étaient pas détectés (**Tableau 9**). De plus, le nombre d'échantillons discordants de $\pm 0,5 \log_{10}$ copies/mL, allait de zéro à cinq, en fonction de la souche. L'extraction d'un volume de 400µL a permis de quantifier les 10 échantillons, néanmoins certaines valeurs de quantification restaient discordantes par rapport aux valeurs obtenues avec la technique Hologic. L'extraction des 200µL après ultracentrifugation de 1mL de plasma permettait également de quantifier tous les échantillons, avec toujours des discordances par rapport à la technique Hologic. Cependant, il semblait y avoir une amélioration de la quantification, en utilisant 1mL d'échantillon. En effet, la différence entre la valeur maximum et la valeur minimum de charge virale quantifiée semblait réduite, ainsi que la valeur de l'écart type. Au final, ces différents essais ont permis d'établir le seuil de quantification de notre technique à 100 copies/mL.

Tableau 9 : Résultats des essais d'amélioration de la sensibilité de la qRT-PCR INTM

Surnageant (sous type)	AAS287 (CRF02_AG)			AoKa (CRF01)			KaJe (CRF02)			MaOI (B)		
	200	400	200µL (C)*	200	400	200µL (C)*	200	400	200µL (C)*	200	400	200µL (C)*
Quantification Hologic	2,25 log ₁₀ copies/mL			1,95 log ₁₀ copies/mL			1,93 log ₁₀ copies/mL			1,89 log ₁₀ copies/mL		
Nombre d'échantillons quantifiés (/10)	9	10	10	9	10	10	9	10	10	8	10	10
Nombre d'échantillons discordants > 0,5log₁₀	4	1	0	2	0	0	2	5	5	2	1	3
Moyenne des 10 répliqués	1,95	2,13	1,99	2,28	2,06	1,96	1,87	1,39	1,48	2,00	1,82	1,56
Ecart type	0,30	0,24	0,15	0,21	0,25	0,14	0,29	0,34	0,17	0,31	0,26	0,27
Ecart entre la valeur la plus forte et la plus faible	0,91	0,67	0,43	0,64	0,88	0,38	0,72	0,99	0,52	0,82	0,81	0,94

* (C) = 200 µL de plasma extrait après ultracentrifugation de 1mL.

c) Linéarité

La linéarité a été évaluée deux fois avec le surnageant Zach, à des concentrations allant de 100 copies/mL ($2 \log_{10}$) à 10^7 copies/mL ($7 \log_{10}$).

Lorsque l'efficacité de la réaction est de 100%, la pente a une valeur de -3,32. Une efficacité comprise entre 85 et 115% est habituellement retrouvée avec les trousse commerciales.

Les pentes obtenues étaient de -3,21 et -3,40, soit une efficacité de réaction de 104,9% et 97%. De plus, le coefficient de détermination r^2 devait être supérieur à 0,985, ce qui était le cas avec des valeurs de 0,994 et 0,996 (**Figure 16**).

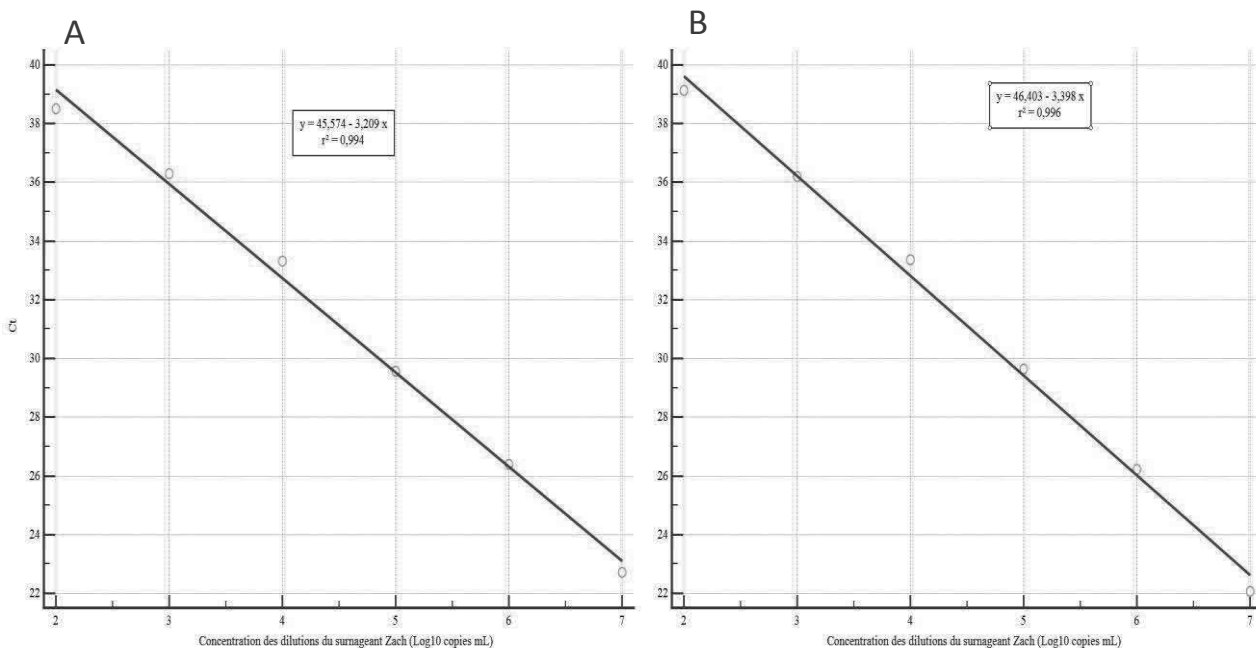


Figure 16 : Courbes de linéarité du surnageant Zach (CRF02_AG)

La linéarité a été testée en double (A et B) avec des valeurs allant de $2 \log_{10}$ copies/mL à $7 \log_{10}$ copies/mL, lors de la même expérience. Les valeurs des Ct sont représentées en ordonnée et les valeurs des concentrations en abscisse. Les équations de la droite (y) ainsi que les valeurs de la pente (r^2), sont indiquées dans l'encadré.

d) Répétabilité

Les expériences de répétabilité, consistant à amplifier 20 points de la dilution 10^{-4} du surnageant de la souche Zach, ont donné une valeur moyenne de $5,54 \log_{10}$ copies/mL et un écart type de $0,04 \log_{10}$ copies/mL. La valeur attendue était de $5,62 \log_{10}$ copies/mL (valeur obtenue avec la technique Cepheid) et l'écart type devait être inférieur à $0,25 \log_{10}$ copies/mL. Ces deux critères de bonne répétabilité étaient donc remplis.

e) Reproductibilité

Les points de gamme des différents essais permettaient d'évaluer la reproductibilité. Chaque point de la gamme a été amplifié lors des 43 expériences, à l'exception de la dilution à 100 copies/mL ($2 \log_{10}$), quantifiée 30 fois sur les 43 expériences. La moyenne des Ct de chaque point de gamme, l'écart type et le coefficient de variation ont été calculés ; pour les points de gamme à 3, 4 et 5 \log_{10} copies/mL, les moyennes des Ct étaient respectivement de 29,7, 33,1 et 36,8 avec des écarts types autour de 0,5 (respectivement 0,44 ; 0,47 et 0,43) (**Tableau 10**). La moyenne des Ct des 30 points de gamme à 2 \log_{10} copies/mL était de 40,8 avec un écart type de 1,9, ce qui montre une forte dispersion des valeurs de Ct à cette concentration (**Figure 17**). Les coefficients de variation des 3 points les plus concentrés de la gamme étaient 1,18%, 1,41% et 1,44% pour les points de gamme à 3, 4 et 5 \log_{10} copies/mL, respectivement. Ces résultats sont en accord avec ceux retrouvés avec les différentes méthodes utilisées dans le service de virologie du CHU de Rouen.

Tableau 10 : Reproductibilité des Ct des quatre points de la gamme.

Concentration des points de gamme en copies/mL (\log_{10})	Moyenne des Ct	Ecart type des valeurs de Ct	Coefficient de variation en %
100 (2)	40,8	1,87	4,59
1 000 (3)	36,8	0,44	1,18
10 000 (4)	33,1	0,47	1,41
100 000 (5)	29,7	0,43	1,44

Les valeurs, des 43 expériences, du témoin de reproductibilité ont donné une moyenne de 4,63 \log_{10} copies/mL avec un écart type de 0,11 \log_{10} copies/mL ce qui correspond à l'exigence de 0,25 \log_{10} copies/mL requise par la QUAMIC [98]. Le coefficient de variation, d'une valeur de 2,31%, a été considéré acceptable. Nous nous sommes basées sur les objectifs du CHU de Rouen qui considère une valeur acceptable si elle est inférieure à 5%. Notre technique était donc reproductible.

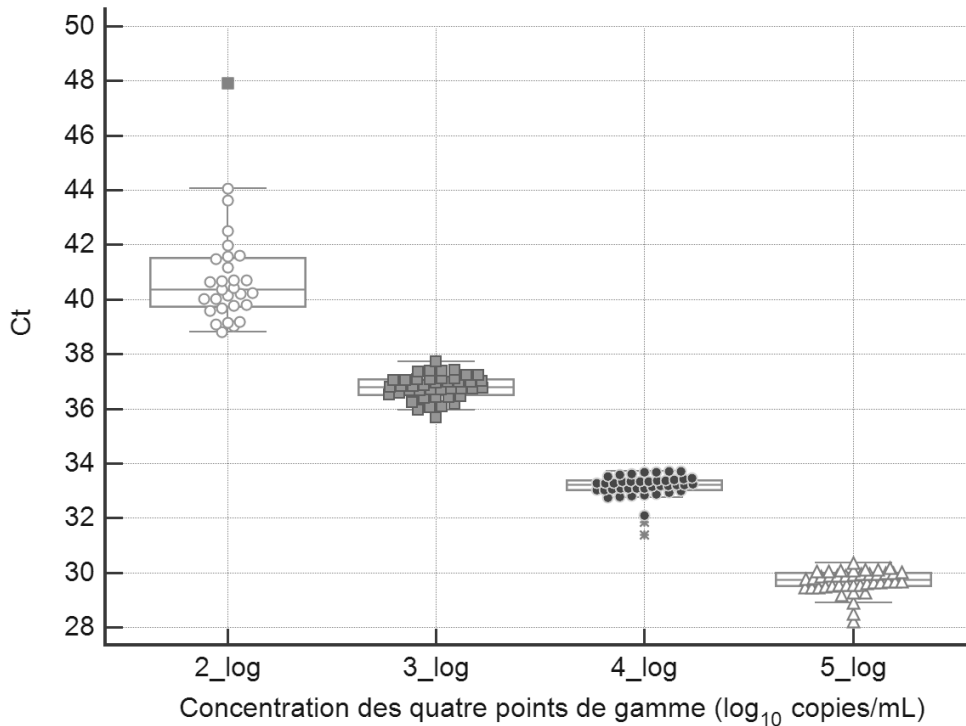


Figure 17 : Reproductibilité des quatre points de la gamme.

Les quatre dilutions des points de gamme sont représentées en abscisse et les valeurs de Ct en ordonnée.

Pour le point de gamme à 2 \log_{10} copies/mL, seules les 30 mesures sont représentées par les ronds orange. Pour les concentrations 3, 4 et 5 \log_{10} copies/mL, les 43 mesures sont représentées respectivement par des carrés oranges, des ronds bleus et des triangles verts. Ces diagrammes en boîte indiquent les médianes, les 25^{ème} au 75^{ème} percentiles (boîtes) et les étendues des valeurs (moustaches). Les carrés rouges, en dehors de ces lignes, sont des valeurs très éloignées de la valeur moyenne obtenue des 43 expériences (30 expériences pour la concentration à 2 \log_{10} copies/mL).

4. Sensibilité clinique

a) Analyse qualitative

En utilisant un seuil de quantification à 100 copies/mL, parmi les 200 testés, 184 échantillons ont été quantifiés (Q = 92%), 14 ont été détectés mais non quantifiables (DNQ = 7%) et deux étaient indétectables (I = 1%). Les 14 échantillons DNQ en qRT-PCR INTM étaient des échantillons, dont les quantifications en technique Abbott allaient de 123 à 3625 copies/mL. Les détails, en fonction des niveaux de charges virales en Abbott, sont précisés dans le **(Tableau 11)**. Les deux échantillons indétectables en qRT-PCR INTM avaient des charges virales de 210 et 949 copies/mL avec la technique Abbott. Ces discordances qualitatives n'étaient pas dues à la présence d'inhibiteur. En effet, le Ct du CI de ces échantillons avait une valeur ne dépassant jamais +/-3Ct par rapport à la valeur de Ct du témoin extraction. Les discordances de ces 16 échantillons non quantifiés (DNQ et I) n'étaient pas liées à des sous-

types ou CRFs en particulier. On retrouvait trois sous-types B (5,7% des sous-types B), trois CRF02_AG (6,3% des sous-types CRF02_AG), deux sous-types D et deux CRF19, un sous-type A et J, et un CRF01, CRF12, CRF42 et CRF43 soit 10 sous-types non B (10,1%).

Tableau 11: Résultats de l'analyse qualitative

CV Abbott (copies/mL)	Nombre d'échantillons	Résultats de la qRT-PCR INTM (en nombre d'échantillon)		
		*I	**DNQ	CV > 100 (copies/mL)
100-200	25	0	6	19
200-500	31	1	5	25
500-1 000	44	1	2	41
>1 000	100	0	1	99
Total	200	2	14	184

*I = indétectable, le seuil de quantification est établi à 100 copies/mL, **DNQ = détecté non quantifiable.

b) Analyse quantitative

Au total en fixant un seuil de quantification à 100 copies/mL, nous obtenions 9,8% de discordance quantitative (**Tableau 12**). Parmi les 183 quantifiés, 18 échantillons étaient discordants, avec pour 14 d'entre eux une différence de charge virale en \log_{10} copies/mL ($\Delta\log_{10}$) comprise entre 0,5 et 1 (moyenne $\Delta\log_{10} = 0,64 \log_{10}$) et quatre, une différence de plus de 1 \log_{10} (moyenne $\Delta\log_{10} = 1,25 \log_{10}$). Un 19^{ème} échantillon avec une discordance de 2,70 \log_{10} (charge virale Abbott = 5,86 \log_{10}) a été exclu de ces résultats, étant en quantité insuffisante pour être quantifié une deuxième fois.

Tableau 12 : Résultats de l'analyse quantitative

CV (copies/mL)	Abbott		qRT-PCR INTM
		Total	*D (%)
100-200		19	2 (10,5)
200-500		25	1 (4,0)
500-1 000		41	1 (2,3)
>1 000		98	14 (14,3)
Total		183	18 (9,8)

*D = discordance > 0,5 \log_{10} copies/mL entre la technique Abbott et qRT-PCR INTM.

Les différences de charges virales étaient en faveur de la quantification en Abbott pour cinq échantillons (charges virales entre : 3,85 et 5,58 \log_{10} copies/mL, moyenne $\Delta\log_{10} = 0,93$

\log_{10}) et en faveur de la quantification en qRT-PCR INTM dans 13 cas (charges virales entre 2,04 et 5,59 \log_{10} copies/mL, moyenne $\Delta\log = 0,72 \log_{10}$), également indépendamment du sous-type.

Le CI a permis de s'assurer que les échantillons ne présentaient pas d'inhibiteur de PCR, pouvant être à l'origine d'une mauvaise quantification de l'ARN viral. Pour huit échantillons, la valeur de Ct du CI était supérieure à trois Ct par rapport à la valeur de Ct du CI du témoin extraction. Parmi eux, deux ont été repassés, du fait d'une différence de quantification de plus de 0,5 \log_{10} copies/mL par rapport aux résultats de la technique de référence Abbott. Après repasse, le CI de ces deux échantillons sortait de nouveau avec une différence de plus de trois Ct, par rapport au CI du témoin extraction, et les charges virales mesurées étaient proches de celle du premier passage. Ces deux résultats confirmaient donc la présence d'un inhibiteur de PCR dans ces deux échantillons. Les six autres échantillons n'ont pas été repassés, les valeurs de Ct du CI pouvant être expliquées par leur forte charge virale.

Les discordances de ces 18 échantillons n'étaient pas liées à des sous-types ou CRFs en particulier. En effet, on retrouvait 6 sous-types B (12,2% des sous-types B), 4 CRF02_AG (8,9% des sous-types CRF02_AG), deux sous-types F et H, et un sous-type C, un CRF06, CRF11, CRF42 soit 8 sous-types non B (9%).

Concernant la corrélation de quantification entre les deux techniques (qRT-PCR INTM et Abbott), le coefficient de détermination r^2 du diagramme de dispersion était de 0,905 (**Figure 18**). Cela traduisait une forte corrélation entre les deux techniques. Seuls deux échantillons (avec une valeur plus élevée en technique Abbott) s'éloignaient de la droite de corrélation. Cette représentation nous a permis de mettre en évidence une légère tendance à une quantification plus forte avec la qRT-PCR INTM pour les niveaux de charges virales élevés.

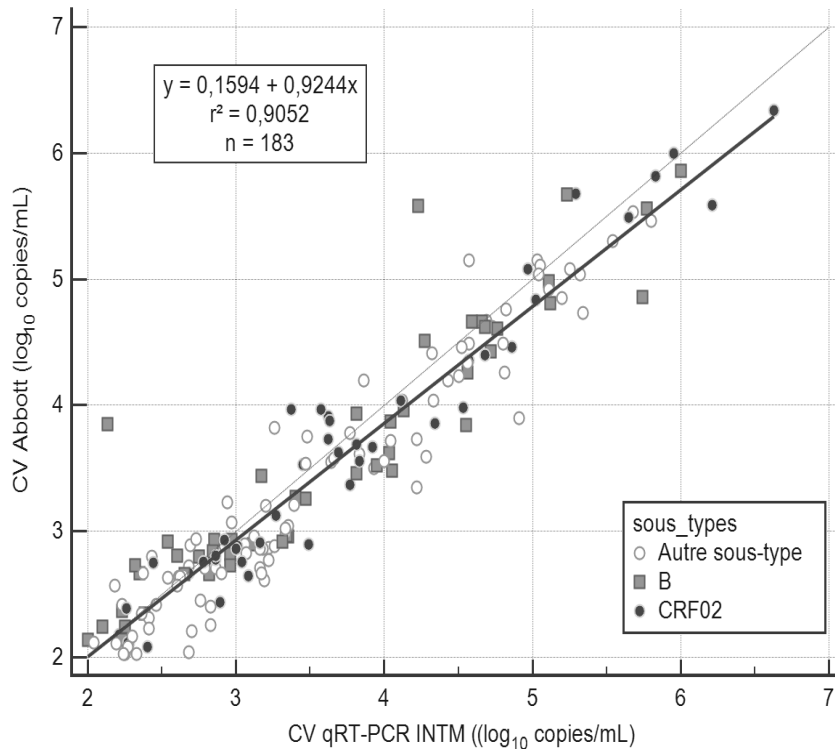


Figure 18 : Diagramme de dispersion (n=183)

Les échantillons quantifiés dans les deux techniques sont représentés sur le diagramme de dispersion. Un échantillon présentant une forte discordance (2,7 log₁₀ copies/mL), a été exclu de l'analyse, étant en quantité insuffisante pour une seconde quantification. Les sous-types B, CRF02 AG et les autres sous-types non-B ont été représentés, afin de voir un éventuel impact de la diversité sur la quantification. Les charges virales quantifiées en Abbott sont représentées sur l'axe des ordonnées et celles en qRT-PCR INTM sur l'axe des abscisses.

L'analyse des échantillons avec la représentation de Bland-Altman a été utilisée pour évaluer l'accord entre les deux techniques (**Figure 19**). Cette représentation montre une moyenne des différences entre la technique Abbott et la qRT-PCR INTM de -0,11 log₁₀ copies/mL, ce qui indique une quantification par la qRT-PCR INTM légèrement plus élevée qu'avec la technique Abbott. On peut également observer une légère tendance à une quantification plus faible avec notre méthode, pour les charges virales inférieures à 3 log₁₀ copies/mL. De plus, comme le montrait le diagramme de dispersion, on retrouve sur la courbe de Bland Altman une légère tendance à avoir des valeurs plus fortes dans les niveaux de charges virales élevés, avec la qRT-PCR INTM. L'intervalle de confiance, qui englobe 95 % des différences, va de -0,76 à 0,53 log₁₀ copies/mL. La plupart des échantillons était comprise dans cet intervalle ; quatre échantillons (deux sous-types B, un CRF02 et un sous-type H) avaient des valeurs supérieures à 1,96 écart type, donc en faveur d'Abbott, alors que trois

(un sous-type B, CRF11 et F1) avaient des valeurs supérieures à -1,96 écart type, donc plutôt en faveur de la qRT-PCR INTM.

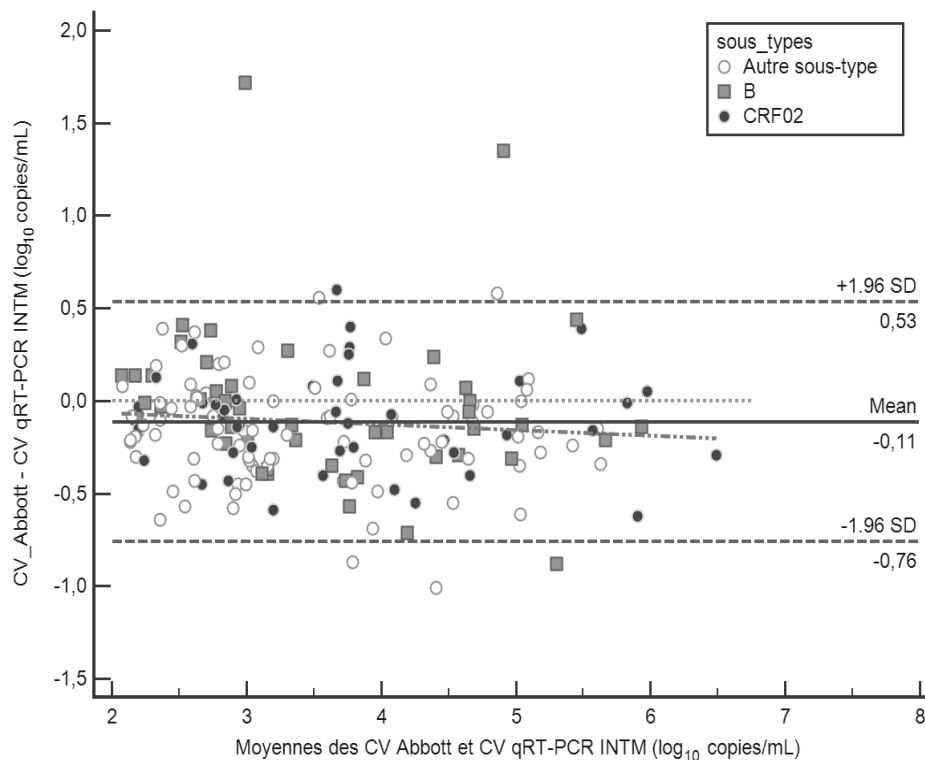


Figure 19 : Courbe de Bland Altman (n = 183)

Degré d'accord en log₁₀ copies/ml entre les charges virales déterminées par les méthodes Abbott RealTime HIV-1 et qRT-PCR INTM. Les valeurs moyennes pour chaque échantillon obtenu par les deux techniques sont tracées sur l'axe des x. Les différences entre les valeurs obtenues par les deux techniques sont tracées sur l'axe y. La ligne pleine montre la différence moyenne entre les valeurs, et les lignes en pointillés montrent les différences moyennes plus ou moins 1,96 écart type (95% des limites d'accord). Le point ayant une discordance à 2,7 log₁₀ copies/mL a été exclu de l'analyse, car étant en quantité insuffisante, il n'a pu être quantifié une deuxième fois.

L'analyse par niveau des moyennes de charges virales obtenues avec les techniques Abbott et qRT-PCR INTM permet d'observer que la dispersion des points de différences des charges virales entre les deux techniques est très proche (**Figure 20**). Les médianes des différences sont négatives en faveur de la qRT-PCR INTM, -0,05 log₁₀ (écart type = 0,319 log₁₀), -0,22 log₁₀ (0,308 log₁₀), -0,17 log₁₀ (0,615 log₁₀) et -0,15 (0,302 log₁₀) pour les charges virales inférieures à 3 log₁₀ copies/mL, 3-4 log₁₀ copies/mL, 4-5 log₁₀ copies/mL et supérieures à 5 log₁₀, respectivement. Ces valeurs confirment les résultats du Bland Altman et de la courbe de dispersion, sur la légère tendance à sous-quantifier avec la technique Abbott, quelques soient les charges virales. Elles indiquent également qu'il n'y avait pas de dérive en fonction des niveaux de charge virale.

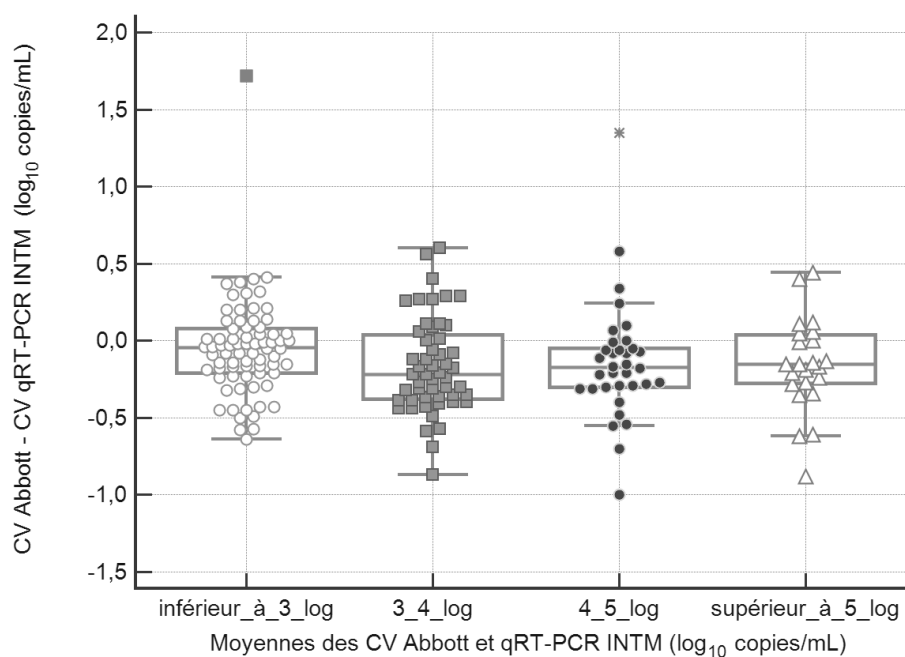


Figure 20 : Différence de charge virale entre Abbott et la qRT-PCR INTM

Différence de charge virale en \log_{10} copies/mL entre Abbott et la qRT-PCR INTM en fonction des moyennes de charge virale des deux techniques, réparties en 4 niveaux ($< 3 \log_{10}$; $3-4 \log_{10}$; $4-5 \log_{10}$; $> 5 \log_{10}$). Les ronds rouges vides sont les échantillons présentant une discordance de plus de $1 \log_{10}$ copies/mL. Les lignes horizontales à l'intérieur des boîtes représentant les médianes des différences de charge virale entre les deux techniques, sont négatives pour chaque niveau de charge virale mettant en évidence une plus forte quantification en qRT-PCR INTM.

L'analyse plus précise des charges virales inférieures à $3 \log_{10}$ copies/mL ($2-2,3 \log_{10}$ copies/mL et $2,3-3 \log_{10}$ copies/mL) donne les mêmes résultats. Pour ces deux niveaux, la médiane était très proche de la moyenne ($-0,03$ et $-0,04 \log_{10}$ pour le niveau $2-2,3 \log_{10}$ copies/mL et $-0,01$ et $-0,08 \log_{10}$ pour le niveau $2,3-3 \log_{10}$ copies/mL). La médiane proche de zéro reflétait une quantification similaire entre les 2 techniques (**Figure 21**).

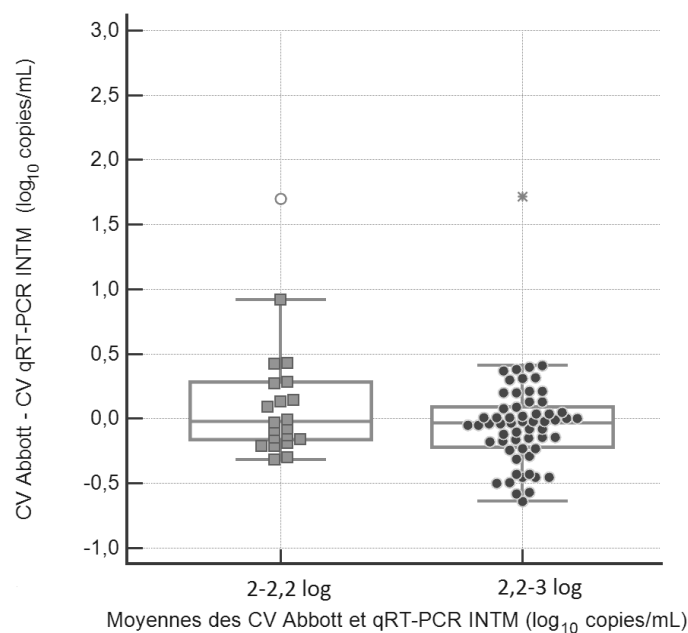


Figure 21 : Différence de charge virale en log₁₀ copies/mL entre Abbott et la qRT-PCR INTM pour des moyennes de charges virales inférieures à 3 Log₁₀ copies/mL

Tous ces résultats confirment la bonne corrélation entre la technique Abbott et la nouvelle technique de qRT-PCR INTM pour des charges virales supérieures à 2 log₁₀ copies/mL.

5. Analyse de la quantification des simulations de co-infections VIH-1/M+O

L'objectif était de vérifier l'absence d'interférences lors de la quantification, pouvant être dues à la présence de deux souches de groupes différents dans les plasmas co-infectés. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 13**. Dans un premier temps, nous pouvons observer que la présence de deux souches de VIH de groupes différents dans un même échantillon, n'a pas induit d'interférence lors de la réaction de PCR, puisqu'aucun prélèvement n'était inhibé. En effet, le Ct du CI du témoin négatif était égal à 29,52 et aucun échantillon n'avait un Ct de CI supérieur à 32,5 (valeur au-dessus de laquelle un prélèvement est considéré comme inhibé).

Deuxièmement, en diminuant la proportion de la souche de VIH-1/M, la charge virale qRT-PCR INTM diminuait également pour les mélanges 1, 3 et 4 comme attendu. Un gradient dans les charges virales de VIH-1/M, pour le mélange 1 et 3, était observé lorsque la proportion de la souche virale de VIH-1/M diminuait dans le mélange. Cependant, pour les mélanges 2 et 4, la proportion 50M/50O, avaient une quantification plus forte (mélange 2)

ou très proche (mélange 4) de la proportion 90M/10O. L'explication pouvait venir d'un défaut de la dilution. Pour ces deux couples, une différence de charge virale était cependant retrouvée entre les proportions 50M/50O et 10M/90O.

Cette analyse qualitative des valeurs de charges virales des VIH-1/M dans un mélange de deux souches de groupes différents, mettait donc en évidence une bonne amplification du VIH-1/M, avec diminution de la charge virale lorsque celui-ci était en plus faible proportion dans le mélange.

Tableau 13 : Valeur de la charge virale du VIH-1/M des différents mélanges de VIH-1/M+O.

	Proportion %M/%O	CV en copies/mL	CV en log ₁₀ copies/mL *	Différence de CV obtenue	Valeur théorique de la CV VIH-1/M **	Différence de CV attendue ***
Mélange 1 VIH-1/M CRF02 + VIH-1/O sous-groupe T	90/10	466000	5,67	0,47	6,02	0,26
	50/50	156600	5,20	0,31	5,77	0,70
	10/90	76120	4,88	0,79	5,07	0,95
Mélange 2 VIH-1/M sous-type B + VIH-1/O sous-groupe H	90/10	75120	4,88	-0,08	5,40	0,26
	50/50	90330	4,96	0,73	5,14	0,70
	10/90	16710	4,22	0,65	4,44	0,95
Mélange 3 VIH-1/M sous-type D + VIH-1/O sous-groupe T	90/10	102800	5,01	0,31	5,20	0,26
	50/50	50540	4,70	0,62	4,95	0,70
	10/90	12140	4,08	0,93	4,25	0,95
Mélange 4 VIH-1/M CRF02 + VIH-1/O sous-groupe H	90/10	161700	5,21	0,08	5,83	0,26
	50/50	135000	5,13	0,84	5,57	0,70
	10/90	19320	4,29	0,92	4,87	0,95

*charge virale obtenue en qRT-PCR INTM, ** charge virale théorique du VIH-1/M calculée pour chaque proportion à partir de la charge virale du surnageant VIH-1/M quantifiée avec la technique Panther (Hologic).
*** Les différences de charge virale obtenues ou théoriques entre la proportion 90/10 et 50/50 sont indiquées en rouge, entre la proportion 50/50 et 10/90 en vert, et entre la proportion 90/10 et 10/90 en bleu.

6. Analyse des séquences de la région intégrase pour les échantillons discordants

Le but de cette analyse était de rechercher une explication aux résultats discordants observés. La mise en évidence de différences de nucléotides entre les séquences des souches et entre les amorces/sonde au niveau de leurs sites de fixation, pourrait être à l'origine d'un mésappariement et donc d'une sous-quantification. Parmi les 35 échantillons, dont les résultats étaient différents de ceux attendus (I, DNQ et discordants de plus de 0,5

\log_{10} copies/mL), seuls neuf avaient eu un séquençage dans le gène de l'intégrase dans le cadre du suivi des patients. Nous avons complété ces résultats en séquençant les 26 échantillons restants (**Tableau 14**). Au final, sur les échantillons analysables, 13 ne présentaient aucune différence de nucléotides par rapport aux deux amorces et à la sonde ; les discordances de CV de ces 13 échantillons étaient comprises entre -1 et +1 \log_{10} copies/mL pour 11 d'entre eux (CV en Abbott = 2,04 à 5,59 \log_{10} copies/mL), un avait une discordance de 2,7 \log_{10} copies/mL (CV en Abbott = 5,86 \log_{10}) et un était indétectable (CV en Abbott = 2,09 \log_{10}).

Deux mutations, à des localisations différentes, ont été retrouvées pour plusieurs souches. La première, retrouvée pour six souches, correspond à la présence d'une adénine à la place de la guanine en position 19 de l'amorce sens. Pour ces six souches, quatre étaient détectables mais non quantifiables (CV en Abbott 2,56 à 3,56 \log_{10} copies/mL) et les deux autres étaient sous-quantifiées en qRT-PCR INTM (CV en Abbott 3,85 et 5,58 \log_{10} copies/mL). La deuxième mutation correspond à la présence d'une cytosine en position 18 sur la sonde, à la place d'une thymidine ou d'une adénine, également retrouvée pour six souches. Parmi ces dernières, une était indétectable (CV en Abbott 2,56 \log_{10} copies/mL), trois avaient une discordance comprise entre 0,5 et 1 \log_{10} copies/mL (3,59 à 5,15 \log_{10} copies/mL) et deux, une sous-quantification en qRT-PCR INTM supérieure à 1 \log_{10} copies/mL (CV en Abbott 3,85 et 5,58 \log_{10} copies/mL). Ces deux dernières souches présentaient également la mutation au niveau de la position 19 de l'amorce sens. Nous pouvons supposer que la forte sous-quantification (1,32 et 1,72 \log_{10} copies/mL) observée pour ces deux souches pouvait être due à la présence simultanée des deux mutations. D'autres mutations ont été retrouvées mais présentes que chez une seule souche. Parmi celles-ci, deux souches étaient indétectables (CV en Abbott = 2,32 et 2,98 \log_{10} copies/mL), pour lesquelles, les mutations étaient localisées en position 17 de l'amorce sens et une mutation en position 9 de la sonde.

Tableau 14 : Différences de nucléotides entre les amorces/sonde et les séquences des échantillons discordants analysés.

	Position du nucléotide sur l'amorce/sonde	Nucléotide sur l'amorce	Nucléotide sur la souche	Nombre de souches concernées	Autres différences de nucléotides	Type de discordance
Aucune différence de nucléotides				13		1 *DNQ 11 **D : 0,5-1 log ₁₀ 1 **D : > 1 log ₁₀
Différences de nucléotides par rapport à la séquence de l'amorce sens	5	thymidine	cytosine	1	W18C sur la sonde	**D : 0,5-1 log ₁₀
	17	cytosine	adénine	1	aucune	***I
	19	guanine	adénine	6	3/6 W18C sur la sonde	4 *DNQ et 2 **D : > 1 log ₁₀
Différences de nucléotides par rapport à la séquence de l'amorce anti-sens	14	guanine	adénine	1	aucune	**D : 0,5-1 log ₁₀
Différences de nucléotides par rapport à la séquence de la sonde	9	adénine	cytosine	1	aucune	***I
	16	cytosine	thymidine	1	aucune	*DNQ
	16	cytosine	S (guanine ou cytosine)	1	G19A sur amorce sens	*DNQ
	18	adénine ou thymidine (W)	cytosine	6	3/6 G19A sur amorce sens	1 *DNQ 3 **D : 0,5-1 log ₁₀ 2 **D : > 1 log ₁₀

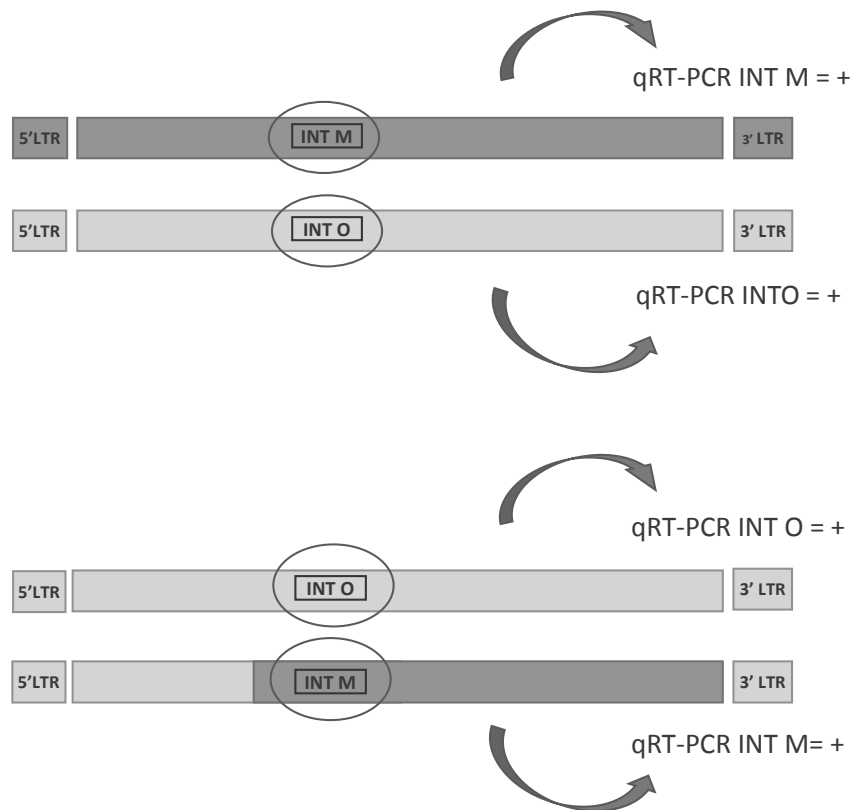
*DNQ : détecté non quantifiable. **D : discordance (différence de charge virale > 0,5 log₁₀ entre la technique Abbott et qRT-PCR INTM. Deux niveaux de discordance ont été établis : 0,5-1 log₁₀ et supérieure à 1 log₁₀. ***I : indétectable. Les deux mutations les plus souvent retrouvées sont entourées en rouge.

D. Discussion

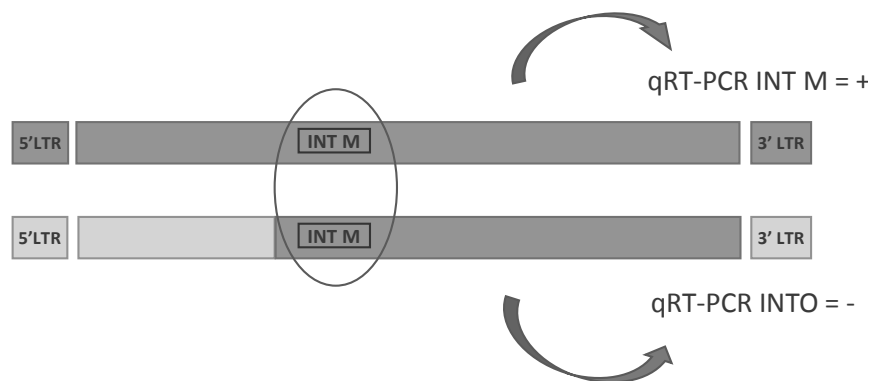
La divergence génétique importante entre les différents groupes de VIH-1 et le processus dynamique évolutif propre au VIH conduisent à une diversification continue des génomes viraux. La quantification de l'ARN viral dans le plasma peut être impactée (sous-quantification voire non-détection), et représente un défi permanent. Les évaluations continues des tests de quantification d'ARN du VIH-1 disponibles en utilisant de larges panels représentatifs de la diversité génétique sont donc cruciales. Elles ont permis de faire évoluer les trousseaux au cours du temps. Ces tests commerciaux présentent désormais, pour la plupart, de bonnes performances et permettent même une quantification non spécifique des différents groupes de VIH-1, pour le suivi des patients en routine [76]. Dans le contexte d'étude qui nous intéresse, à savoir la co-infection et la recombinaison entre les variants génétiquement divergents VIH-1/M et VIH-1/O, cette quantification non spécifique est paradoxalement problématique. En effet, elle ne permet pas d'évaluer séparément la réplication de chaque population virale. Or, il est important de comprendre la dynamique de ces populations au sein de l'individu, qu'il soit sous traitement anti-retroviral ou non. Des outils spécifiques, afin de suivre la charge virale de chaque population (parental M, parental O et recombinant MO) sont donc nécessaires.

Le laboratoire de Rouen associé au CNR dispose déjà de techniques spécifiques telles que la qRT-PCR INTO (CNR) et la qRT-PCR LRTM (Biocentric). Cette dernière cible la région LTR, connue pour être un point chaud de recombinaison ; elle présente donc un risque de ne pas quantifier ou de sous quantifier certaines formes recombinantes MO selon leur profil génétique et peut poser problème en cas de co-infection M +/- O +/- MO. L'objectif de ce travail était donc de mettre au point une qRT-PCR spécifique du VIH-1/M complétant le panel de qRT-PCR utilisé au laboratoire. Au-delà de l'aspect quantitatif, cette nouvelle technique permet aussi d'avoir un outil supplémentaire de confirmation d'une double infection ou d'une infection par un recombinant et sa(es) forme(s) parentale(s). Le choix de la région à amplifier s'est porté sur l'intégrase, région ciblée par la qRT-PCR spécifique de groupe O [92], pour avoir une quantification des populations virales VIH-1/M et VIH-1/O, dans la même région.

Cette quantification en parallèle par ces deux méthodes n'a d'intérêt que chez les patients co-infectés M+O et chez les patients infectés par un recombinant associé à une forme parentale de groupe différent dans le gène de l'intégrase, comme représenté dans les schémas ci-dessous.



Dans le cas contraire, l'utilisation de ces deux qRT-PCR ne permet pas de mesurer séparément la charge virale de la forme recombinante VIH-1/MO et de la forme parentale VIH-1/M. Elles seront quantifiées par la qRT-PCR INTM sans distinction et la qRT-PCR INTO sera négative ou inversement.



Un autre intérêt de cibler la région de l'intégrase est qu'elle est conservée au sein des VIH-1/M ; de nombreuses techniques commerciales de quantification du VIH-1 utilisent aussi cette région. Malgré cette conservation, l'importance de l'épidémie à VIH-1/M, avec 36 millions de personnes infectées par des souches quasiment toutes différentes, complexifie la mise au point d'une qRT-PCR devant être capable de détecter toutes ces souches. Nos contraintes étaient donc que cette nouvelle PCR devait être très sensible cliniquement (détecter toutes les souches), mais aussi spécifique (ne jamais amplifier le groupe O, alors que les deux groupes de variants présentent 73% d'identité de séquence dans le gène *pol* [14]). La forte diversité au sein des souches M a été responsable des difficultés observées lors des essais des premières combinaisons amorces/sonde. Afin de pouvoir amplifier les multivariants du VIH-1/M, l'utilisation d'amorces et de sondes dégénérées était indispensable, tout en gardant aussi une bonne spécificité. Le premier surnageant Bru (sous-type B) utilisé pour tester les premiers couples amorces/sonde était très mal amplifié, avec des fluorescences faibles et pouvait conduire à un risque de faux négatifs (absence d'amplification de l'échantillon). L'utilisation d'un autre sous-type, CRF02_AG, a permis d'améliorer les résultats. Notre choix s'est porté sur cette souche car le CRF02 est majoritairement présent au Cameroun (zone d'endémie des co-infections M+O et recombinants MO). Malgré une amélioration, le signal de fluorescence était encore faible. Il a donc été nécessaire de mettre au point de nouvelles sondes et amorces. Nous avons choisi d'utiliser une sonde MGB, permettant d'améliorer la sensibilité et la spécificité de notre technique.

Il a ensuite été nécessaire de déterminer la meilleure combinaison de mix et thermocycleur, ainsi que les conditions opératoires optimales. Les deux mix testés étaient composés d'enzymes différentes, et les volumes de mix et d'extraits variaient également. Nous avons montré que cela avait un impact sur la quantification. En effet, la sensibilité de détection, c'est-à-dire le nombre d'échantillons amplifiés, était différent en fonction du mix et du thermocycleur utilisés. Le mix Invitrogen, utilisant un plus grand volume d'extrait, avait une meilleure sensibilité. Le choix du couple thermocycleur/mix avait donc son importance. Ces comparaisons nous ont permis de sélectionner le thermocycleur CFX96 avec la trousse Invitrogen.

Le couple amorces/sonde et le couple trousse enzymatique/thermocycleur ainsi sélectionnés nous ont permis d'obtenir de très bonnes performances analytiques. La

spécificité était très bonne, aucun surnageant de VIH-1/O n'a été amplifié. Nos résultats montrent que notre technique était reproductible, puisque l'écart type du témoin de reproductibilité était faible (0,11 log₁₀ copies/mL). La répétabilité était également très bonne et la linéarité proche de celle de trousse commerciale et académique. Concernant le seuil de quantification, nous n'avons pas réussi à nous rapprocher de ceux des techniques commerciales (actuellement de 20 à 40 copies/mL) [80, 83, 88], malgré les nombreuses modifications apportées lors de l'optimisation de la méthode. Ce seuil a une importance au niveau thérapeutique, car selon les recommandations nationales et internationales, l'objectif des antirétroviraux est de rendre la charge virale plasmatique indétectable à un seuil de 50 copies/mL. Dans un premier temps, l'intégration d'un contrôle interne (CI) dans la qRT-PCR INTM a pu éventuellement jouer sur ce seuil. En effet, il peut se produire un phénomène de compétition entre les deux cibles à amplifier, pouvant être responsable de la faible amplification des valeurs basses de la gamme, au profit du CI en quantité plus abondante. A l'inverse, une très forte charge virale de la cible peut diminuer l'amplification du CI, ce qui est le cas pour huit de nos échantillons. Un CI est cependant essentiel afin de s'assurer de la bonne extraction et amplification des échantillons. Le volume d'échantillon utilisé a également un impact sur la quantification. En augmentant le volume de prise d'essai, la quantité de matériel génétique est donc plus élevée. Le volume des prises d'essai des techniques commerciales étant plus important (Roche : 0,85mL, Abbott : 0,6mL, Siemens et Hologic : 0,5mL, Cepheid : 1mL [80, 83, 88]), nous avons augmenté le volume à extraire à 400µL et 200µL après ultracentrifugation de 1mL. En parallèle, les surnageants utilisés pour déterminer le seuil de quantification ont été quantifiés avec la méthode Hologic par précaution (pour vérifier que les dilutions étaient correctes). L'augmentation de la prise d'essai a permis d'avoir un seuil de quantification à 100 copies/mL avec une sensibilité de 100%, comparativement à une prise d'essai de 200µL dont la sensibilité était plutôt autour de 80-90%. Il faut toutefois noter que trois des quatre surnageants testés dans ces essais, avaient des valeurs de charges virales en dessous de 100 copies/mL. Le seuil de quantification n'a donc pas été étudié pour une valeur exacte de 100 copies/mL, mais pour des valeurs légèrement plus faibles. Nos résultats permettent donc d'établir le seuil de quantification de notre technique à 100 copies/mL.

L'évaluation clinique a été réalisée avec un panel d'échantillons cliniques de VIH-1/M, sélectionné sur la base de l'épidémiologie moléculaire observée en France et au Cameroun.

En effet, la plupart des patients co-infectés M+O ou infectés avec une forme recombinante MO ont été identifiés dans ces deux pays. Avec un seuil de quantification établi à 100 copies/mL, en utilisant le protocole de 200 μ L, 92% des échantillons ont été quantifiés par notre technique, bien que certains aient une forte charge virale. Le fait de ne pas quantifier 8% des échantillons avec une charge virale en Abbott supérieure à 100 copies/mL est une limite non négligeable de notre méthode. Parmi les échantillons quantifiés (n=183), 9,8% avaient une discordance supérieure à 0,5 log₁₀ copies/mL, résultats indépendants du sous-type. Ils confirment que le risque de ne pas amplifier ou sous-quantifier certaines souches existe toujours, aucune méthode de PCR n'étant parfaite. La conception des amorces et des sondes, en utilisant un large panel représentatif de la diversité nous a donc permis d'avoir un pourcentage de discordance, pour les échantillons quantifiés, assez faible. Nos résultats sont en accord avec d'autres études de comparaison dans lesquelles des discordances ont été rapportées pour 16 à 30% des échantillons [80].

Le diagramme de dispersion et la représentation de Bland Altman (n=183) ont montré une très bonne corrélation de quantification entre la qRT-PCR INTM et la méthode commerciale Abbott. Nous avons également mis en évidence une légère quantification plus élevée par la qRT-PCR INTM dans les charges virales hautes. La représentation de Bland Altman montrait une moyenne des différences similaire avec seulement +0,11 log₁₀ copies/mL en faveur de la qRT-PCR INTM. Nos résultats sont cohérents avec plusieurs études de comparaison de quantification VIH-1/M entre la technique Abbott et de nouvelles techniques commerciales, telles que Hologic ou Cepheid [83, 99] qui montrent également une quantification plus faible en Abbott dans les fortes charges virales.

Les échantillons ayant des résultats de charge virale non attendus (n=35), ont été analysés par séquençage pour essayer de mettre en évidence un impact mutationnel. Deux mutations ont été retrouvées à plusieurs reprises : la mutation G19A pour quatre souches, et la mutation W18C pour quatre autres souches, deux souches supplémentaires avaient ces deux mutations. D'autres mutations ont également été mises en évidence, mais pour une seule souche à chaque fois. Ainsi, il est difficile de conclure sur l'impact d'une substitution de nucléotide avec les résultats obtenus. Ces analyses n'ont été réalisées que pour les échantillons discordants ; il est possible que ces mêmes mutations soient aussi présentes pour les échantillons non discordants. Nous pouvons juste évoquer une tendance à un risque

de sous-quantification, lorsque sont présentes la mutation G19A au niveau du site de fixation de l'amorce sens et/ou la mutation W18C au niveau du site de fixation de la sonde.

Enfin, une des limites de cette étude est l'utilisation de plusieurs techniques de référence Abbott, Hologic et Cepheid [93, 100]. Les essais de comparaison de ces techniques entre elles, montrant de bonnes corrélations, les changements d'automate n'ont pas eu d'impact sur l'interprétation des résultats lors des différents étapes de la mise au point de la qRT-PCR INTM.

E. Conclusion

En conclusion, nous avons mis au point un nouvel outil de quantification spécifique du VIH-1 de groupe M qui présente de bonnes performances analytiques. Cependant, le seuil de quantification de notre technique à 100 copies/mL ne permet pas de suivre l'indétectabilité de la charge virale, selon les recommandations actuelles. Mais la qRT-PCR INTM permettra de mesurer la réplication au diagnostic de la co-infection (M+/-O+/-MO) et de suivre la décroissance de la charge des différentes espèces. Par la suite, l'indétectabilité des différentes formes virales pourrait être contrôlée par une technique commerciale non spécifique de groupe, plus sensible. A l'inverse, en cas de charge virale devenue détectable avec les techniques commerciales, une quantification en parallèle avec les méthodes spécifiques de groupes permettrait d'identifier la ou les forme(s) responsable(s) de l'échec virologique et qui réplique(nt). Une adaptation du traitement anti-retroviral pourrait alors être envisagée.

Quant aux performances cliniques, elles sont très bonnes, proche de techniques commerciales. En effet, peu de discordance et de dispersion des valeurs de charges virales des différents échantillons testés, ont été mises en évidence.

Les différents essais réalisés nous ont permis de bien définir les avantages et inconvénients de cet outil, ainsi que ses limites. La qRT-PCR INTM sera donc très utile pour notre problématique de co-infection M+O ou d'infection par un recombinant MO et sa(es) forme(s) parentale(s), pour suivre les niveaux de charges virales de ces différentes populations et ainsi mieux comprendre la co-évolution répllicative.

En perspective, l'harmonisation des protocoles de la qRT-PCR INTO et de la qRT-PCR INTM permettrait un gain de temps dans le rendu des résultats (retard induit par la réalisation de plusieurs qRT-PCR successives) et faciliterait la prise en charge des prélèvements. Cependant des difficultés sont à surmonter telles que la mise en place du CI dans la qRT-PCR INTO, le choix du volume d'échantillon à utiliser en fonction du seuil de quantification que l'on veut fixer et le volume d'extrait à sélectionner.

III. Références bibliographiques

1. Control CfD: **Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1981, **30**(25):305-308.
2. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C *et al*: **Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).** 1983. *Rev Invest Clin* 2004, **56**(2):126-129.
3. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C *et al*: **Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS.** *Science* 1986, **233**(4761):343-346.
4. Huraux J-M, Nicolas J-C, Agut H, Peigue-Lafeuille H: **Traité de virologie.** Paris: Estem; 2003.
5. Cassan E, Arigon-Chifolleau AM, Mesnard JM, Gross A, Gascuel O: **Concomitant emergence of the antisense protein gene of HIV-1 and of the pandemic.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016, **113**(41):11537-11542.
6. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C *et al*: **HIV-1 nomenclature proposal.** *Science* 2000, **288**(5463):55-56.
7. Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM: **Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications.** *J Virol* 2007, **81**(19):10209-10219.
8. Lihana RW, Ssemwanga D, Abimiku A, Ndembu N: **Update on HIV-1 diversity in Africa: a decade in review.** *AIDS Rev* 2012, **14**(2):83-100.
9. <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>
10. Howard TM, Rasheed S: **Genomic structure and nucleotide sequence analysis of a new HIV type 1 subtype A strain from Nigeria.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996, **12**(15):1413-1425.
11. Carr JK, Salminen MO, Albert J, Sanders-Buell E, Gotte D, Birx DL, McCutchan FE: **Full genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtypes G and A/G intersubtype recombinants.** *Virology* 1998, **247**(1):22-31.
12. Lee CN, Chen MY, Lin HS, Lee MC, Luo CC, Twu SJ, Lin RY, Chuang CY: **HIV type 1 env subtype A variants in Taiwan.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998, **14**(9):807-809.
13. De Leys R, Vanderborght B, Vanden Haesevelde M, Heyndrickx L, van Geel A, Wauters C, Bernaerts R, Saman E, Nijs P, Willems B *et al*: **Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin.** *J Virol* 1990, **64**(3):1207-1216.
14. Mourez T, Simon F, Plantier JC: **Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1.** *Clin Microbiol Rev* 2013, **26**(3):448-461.
15. Roques P, Robertson DL, Souquiere S, Damond F, Ayoub A, Farfara I, Depienne C, Nerrienet E, Dormont D, Brun-Vezinet F *et al*: **Phylogenetic analysis of 49 newly derived HIV-1 group O strains: high viral diversity but no group M-like subtype structure.** *Virology* 2002, **302**(2):259-273.
16. Leoz M, Depatureaux A, Vessiere A, Roquebert B, Damond F, Rousset D, Roques P, Simon F, Plantier JC: **Integrase polymorphism and HIV-1 group O diversity.** *AIDS* 2008, **22**(10):1239-1243.
17. Leoz M, Feyertag F, Kfutwah A, Mauclere P, Lachenal G, Damond F, De Oliveira F, Lemee V, Simon F, Robertson DL *et al*: **The Two-Phase Emergence of Non Pandemic HIV-1 Group O in Cameroon.** *PLoS Pathog* 2015, **11**(8):e1005029.
18. Vessière AR, Dominique MD; Kfutwah, Anfumbom; Leoz, Marie; Depatureaux, Agnès; Simon, François; Plantier, Jean-Christophe.: **Diagnosis and Monitoring of HIV-1 Group O-Infected Patients in Cameroun.** *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2010, **53**(1):107-110.

19. Ayouba A, Mauciere P, Martin PM, Cunin P, Mfoupouendoun J, Njinku B, Souquieres S, Simon F: **HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998.** *Emerg Infect Dis* 2001, **7**(3):466-467.
20. Villabona-Arenas CJ, Domyeum J, Mouacha F, Butel C, Delaporte E, Peeters M, Mpoudi-Ngole E, Aghokeng AF: **HIV-1 group O infection in Cameroon from 2006 to 2013: Prevalence, genetic diversity, evolution and public health challenges.** *Infect Genet Evol* 2015, **36**:210-216.
21. Peeters M, Gaye A, Mboup S, Badombena W, Bassabi K, Prince-David M, Develoux M, Liegeois F, van der Groen G, Saman E *et al*: **Presence of HIV-1 group O infection in West Africa.** *AIDS* 1996, **10**(3):343-344.
22. Peeters M, Gueye A, Mboup S, Bibollet-Ruche F, Ekaza E, Mulanga C, Ouedrigo R, Gandji R, Mpele P, Dibanga G *et al*: **Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa.** *AIDS* 1997, **11**(4):493-498.
23. Hampl H, Sawitzky D, Stoffler-Meilicke M, Groh A, Schmitt M, Eberle J, Gurtler L: **First case of HIV-1 subtype O infection in Germany.** *Infection* 1995, **23**(6):369-370.
24. Soriano V, Gutierrez M, Garcia-Lerma G, Aguilera O, Mas A, Bravo R, Perez-Labad ML, Baquero M, Gonzalez-Lahoz J: **First case of HIV-1 group O infection in Spain.** *Vox Sang* 1996, **71**(1):66.
25. Jonassen TO, Stene-Johansen K, Berg ES, Hungnes O, Lindboe CF, Froland SS, Grinde B: **Sequence analysis of HIV-1 group O from Norwegian patients infected in the 1960s.** *Virology* 1997, **231**(1):43-47.
26. Rayfield MA, Sullivan P, Banda CI, Britvan L, Otten RA, Pau CP, Pieniazek D, Subbarao S, Simon P, Schable CA *et al*: **HIV-1 group O virus identified for the first time in the United States.** *Emerg Infect Dis* 1996, **2**(3):209-212.
27. Marie Leoz FDO, Jean-Christophe Plantier: **Origine, diffusion et évolution des VIH-1 de groupe O** *Virologie* 2017, **21**(1):27-38.
28. Simon F, Mauciere P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barre-Sinoussi F, Brun-Vezinet F: **Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O.** *Nat Med* 1998, **4**(9):1032-1037.
29. Delaugerre C, De Oliveira F, Lascoux-Combe C, Plantier JC, Simon F: **HIV-1 group N: travelling beyond Cameroon.** *Lancet* 2011, **378**(9806):1894.
30. Vallari A, Bodelle P, Ngansop C, Makamche F, Ndembi N, Mbanya D, Kaptue L, Gurtler LG, McArthur CP, Devare SG *et al*: **Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010, **26**(1):109-115.
31. Yamaguchi J, Coffey R, Vallari A, Ngansop C, Mbanya D, Ndembi N, Kaptue L, Gurtler LG, Bodelle P, Schochetman G *et al*: **Identification of HIV type 1 group N infections in a husband and wife in Cameroon: viral genome sequences provide evidence for horizontal transmission.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006, **22**(1):83-92.
32. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, Damond F, Robertson DL, Simon F: **A new human immunodeficiency virus derived from gorillas.** *Nat Med* 2009, **15**(8):871-872.
33. Vallari A, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, Makamche F, Mbanya D, Kaptue L, Ndembi N, Gurtler L *et al*: **Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon.** *Journal of virology* 2011, **85**(3):1403-1407.
34. Van Heuverswyn F, Peeters M: **The origins of HIV and implications for the global epidemic.** *Curr Infect Dis Rep* 2007, **9**(4):338-346.
35. Marx PA, Li Y, Lerche NW, Sutjipto S, Gettie A, Yee JA, Brotman BH, Prince AM, Hanson A, Webster RG *et al*: **Isolation of a simian immunodeficiency virus related to human immunodeficiency virus type 2 from a west African pet sooty mangabey.** *J Virol* 1991, **65**(8):4480-4485.

36. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM *et al*: **Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes***. *Nature* 1999, **397**(6718):436-441.
37. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Chen Y, Wain LV, Liegeois F *et al*: **Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1**. *Science* 2006, **313**(5786):523-526.
38. Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Neel C, Lafay B, Keele BF, Shaw KS, Takehisa J, Kraus MH, Loul S *et al*: **Genetic diversity and phylogeographic clustering of SIVcpzPtt in wild chimpanzees in Cameroon**. *Virology* 2007, **368**(1):155-171.
39. D'Arc M, Ayoub A, Esteban A, Learn GH, Boue V, Liegeois F, Etienne L, Tagg N, Leendertz FH, Boesch C *et al*: **Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, **112**(11):E1343-1352.
40. Aurélie Vessière CD, Jean-Christophe Plantier, François Simon: **Passages inter-espèces des virus de l'immunodéficience humaine et simienne chez les primates**. *Revue Francophone des Laboratoires* 2010, **2010**(423):43-53.
41. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M: **Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection**. *Nature* 1995, **373**(6510):123-126.
42. Hu WS, Hughes SH: **HIV-1 reverse transcription**. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, **2**(10).
43. E Simon-Lorière RG, M Negroni **Caractéristiques mécanistiques de la recombinaison chez le virus de l'immunodéficience humaine** *Virologie* 2006, **10**(6):431-442.
44. Baird HA, Gao Y, Galetto R, Lalonde M, Anthony RM, Giacomoni V, Abreha M, Destefano JJ, Negroni M, Arts EJ: **Influence of sequence identity and unique breakpoints on the frequency of intersubtype HIV-1 recombination**. *Retrovirology* 2006, **3**:91.
45. Jun Fan MN, David L. Robertson: **The distribution of HIV-1 recombination breakpoints**, vol. 7; 2007.
46. Baird HA, Galetto R, Gao Y, Simon-Lorieri E, Abreha M, Archer J, Fan J, Robertson DL, Arts EJ, Negroni M: **Sequence determinants of breakpoint location during HIV-1 intersubtype recombination**. *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(18):5203-5216.
47. Archer J, Pinney JW, Fan J, Simon-Lorieri E, Arts EJ, Negroni M, Robertson DL: **Identifying the important HIV-1 recombination breakpoints**. *PLoS Comput Biol* 2008, **4**(9):e1000178.
48. Simon-Lorieri E, Galetto R, Hamoudi M, Archer J, Lefeuvre P, Martin DP, Robertson DL, Negroni M: **Molecular mechanisms of recombination restriction in the envelope gene of the human immunodeficiency virus**. *PLoS Pathog* 2009, **5**(5):e1000418.
49. Heyndrickx L, Alary M, Janssens W, Davo N, van der Groen G: **HIV-1 group O and group M dual infection in Benin**. *Lancet* 1996, **347**(9005):902-903.
50. Takehisa J, Zekeng L, Ido E, Mboudjeka I, Moriyama H, Miura T, Yamashita M, Gurtler LG, Hayami M, Kaptue L: **Various types of HIV mixed infections in Cameroon**. *Virology* 1998, **245**(1):1-10.
51. Vergne L, Bourgeois A, Mpoudi-Ngole E, Mougnotou R, Mbuagbaw J, Liegeois F, Laurent C, Butel C, Zekeng L, Delaporte E *et al*: **Biological and genetic characteristics of HIV infections in Cameroon reveals dual group M and O infections and a correlation between SI-inducing phenotype of the predominant CRF02_AG variant and disease stage**. *Virology* 2003, **310**(2):254-266.
52. Brand D, Beby-Defaux A, Mace M, Brunet S, Moreau A, Godet C, Jais X, Cazein F, Semaille C, Barin F: **First identification of HIV-1 groups M and O dual infections in Europe**. *AIDS* 2004, **18**(18):2425-2428.
53. De Oliveira F, Mourez T, Vessiere A, Ngoupo PA, Alessandri-Gradt E, Simon F, Rousset D, Plantier JC: **Multiple HIV-1/M + HIV-1/O dual infections and new HIV-1/MO inter-group recombinant forms detected in Cameroon**. *Retrovirology* 2017, **14**(1):1.
54. De Oliveira F, Cappy P, Lemee V, Moisan A, Pronier C, Bocket L, Bouvier-Alias M, Chaix ML, Gault E, Morvan O *et al*: **Detection of numerous HIV-1/MO recombinants in France**. *AIDS* 2018.

55. Plantier JC, Lemee V, Dorval I, Gueudin M, Braun J, Hutin P, Ruffault A, Simon F: **HIV-1 group M superinfection in an HIV-1 group O-infected patient.** *AIDS* 2004, **18**(18):2444-2446.
56. Peeters M, Liegeois F, Torimiro N, Bourgeois A, Mpoudi E, Vergne L, Saman E, Delaporte E, Saragosti S: **Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient.** *J Virol* 1999, **73**(9):7368-7375.
57. Takehisa J, Zekeng L, Ido E, Yamaguchi-Kabata Y, Mboudjeka I, Harada Y, Miura T, Kaptu L, Hayami M: **Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in cameroon.** *J Virol* 1999, **73**(8):6810-6820.
58. Yamaguchi J, Bodelle P, Vallari AS, Coffey R, McArthur CP, Schochetman G, Devare SG, Brennan CA: **HIV infections in northwestern Cameroon: identification of HIV type 1 group O and dual HIV type 1 group M and group O infections.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004, **20**(9):944-957.
59. Ngoupo PA, Sadeuh-Mba SA, De Oliveira F, Ngono V, Ngono L, Tchendjou P, Penlap V, Mourez T, Njouom R, Kfutwah A *et al*: **First evidence of transmission of an HIV-1 M/O intergroup recombinant virus.** *AIDS* 2016, **30**(1):1-8.
60. Vessiere A, Leoz M, Brodard V, Strady C, Lemee V, Depatureaux A, Simon F, Plantier JC: **First evidence of a HIV-1 M/O recombinant form circulating outside Cameroon.** *AIDS* 2010, **24**(7):1079-1082.
61. Ekouevi DK, Balestre E, Coffie PA, Minta D, Messou E, Sawadogo A, Minga A, Sow PS, Bissagnene E, Eholie SP *et al*: **Characteristics of HIV-2 and HIV-1/HIV-2 Dually Seropositive Adults in West Africa Presenting for Care and Antiretroviral Therapy: The IeDEA-West Africa HIV-2 Cohort Study.** *PLoS One* 2013, **8**(6):e66135.
62. Esbjornsson J, Mansson F, Kvist A, Isberg PE, Biague AJ, da Silva ZJ, Jansson M, Fenyo EM, Norrgren H, Medstrand P: **Increased survival among HIV-1 and HIV-2 dual-infected individuals compared to HIV-1 single-infected individuals.** *AIDS* 2014, **28**(7):949-957.
63. HAS: **Dépistage de l'infection par le VIH en France - Stratégies et dispositif de dépistage.** 2009.
64. Plantier JC, Djemai M, Lemee V, Reggiani A, Leoz M, Burc L, Vessiere A, Rousset D, Poveda JD, Henquell C *et al*: **Census and analysis of persistent false-negative results in serological diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 group O infections.** *J Clin Microbiol* 2009, **47**(9):2906-2911.
65. Simon F, Ly TD, Baillou-Beaufils A, Fauveau V, De Saint-Martin J, Loussert-Ajaka I, Chaix ML, Saragosti S, Courouce AM, Ingrand D *et al*: **Sensitivity of screening kits for anti-HIV-1 subtype O antibodies.** *AIDS* 1994, **8**(11):1628-1629.
66. Elyse Poitras AH: **La PCR en temps réel : principes et applications.** *Reviews in Biology and Biotechnology* 2002, **2**(2):2-11.
67. Ayyadevara S, Thaden JJ, Shmookler Reis RJ: **Discrimination of primer 3'-nucleotide mismatch by taq DNA polymerase during polymerase chain reaction.** *Anal Biochem* 2000, **284**(1):11-18.
68. Huang MM, Arnheim N, Goodman MF: **Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR.** *Nucleic Acids Res* 1992, **20**(17):4567-4573.
69. Kwok S, Kellogg DE, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C, Sninsky JJ: **Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies.** *Nucleic Acids Res* 1990, **18**(4):999-1005.
70. Joëlle Brodeur MT: **Projet bleu.** In: *Biologie moléculaire.* Edited by CCDMD; 2006.
71. Naef F, Lim DA, Patil N, Magnasco M: **DNA hybridization to mismatched templates: a chip study.** *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2002, **65**(4 Pt 1):040902.
72. Binder H, Preibisch S: **Specific and nonspecific hybridization of oligonucleotide probes on microarrays.** *Biophys J* 2005, **89**(1):337-352.

73. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.** *Biotechnology (N Y)* 1993, **11**(9):1026-1030.
74. Tse C, Capeau J: **[Real time PCR methodology for quantification of nucleic acids].** *Ann Biol Clin (Paris)* 2003, **61**(3):279-293.
75. S. Collot SA, F. Denis, S. Ranger-Rogez: **Quantification par PCR en temps réel, technologie TaqMan et applications en virologie** *Virologie* 2001, **5**(6):39-48.
76. Rouet F, Liegeois F, Mouinga-Ondeme A, Kania D, Viljoen J, Wambua S, Ngo-Giang-Huong N, Menan H, Peeters M, Nerrienet E: **Current challenges to viral load testing in the context of emerging genetic diversity of HIV-1.** *Expert Opin Med Diagn* 2011, **5**(3):183-202.
77. Swanson P, de Mendoza C, Joshi Y, Golden A, Hodinka RL, Soriano V, Devare SG, Hackett J, Jr.: **Impact of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genetic diversity on performance of four commercial viral load assays: LCx HIV RNA Quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5, VERSANT HIV-1 RNA 3.0, and NucliSens HIV-1 QT.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(8):3860-3868.
78. Swanson P, Soriano V, Devare SG, Hackett J, Jr.: **Comparative performance of three viral load assays on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates representing group M (subtypes A to G) and group O: LCx HIV RNA quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR version 1.5, and Quantiplex HIV-1 RNA version 3.0.** *J Clin Microbiol* 2001, **39**(3):862-870.
79. Mourez T, Delaugerre C, Vray M, Lemee V, Simon F, Plantier JC: **Comparison of the bioMerieux NucliSENS EasyQ HIV-1 v2.0-HIV-1 RNA quantification assay versus Abbott RealTime HIV-1 and Roche Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 on current epidemic HIV-1 variants.** *J Clin Virol* 2015, **71**:76-81.
80. Braun P, Delgado R, Drago M, Fanti D, Fleury H, Hofmann J, Izopet J, Kuhn S, Lombardi A, Mancon A *et al*: **A European multicentre study on the comparison of HIV-1 viral loads between VERIS HIV-1 Assay and Roche COBAS(R) TAQMAN(R) HIV-1 test, Abbott RealTime HIV-1 Assay, and Siemens VERSANT HIV-1 Assay.** *J Clin Virol* 2017, **92**:75-82.
81. Pas S, Rossen JW, Schoener D, Thamke D, Pettersson A, Babel R, Schutten M: **Performance evaluation of the new Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test version 2.0 for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA.** *J Clin Microbiol* 2010, **48**(4):1195-1200.
82. Jordan JA, Plantier JC, Templeton K, Wu AH: **Multi-site clinical evaluation of the Xpert((R)) HIV-1 viral load assay.** *J Clin Virol* 2016, **80**:27-32.
83. Gueudin M, Baron A, Alessandri-Gradt E, Lemee V, Mourez T, Etienne M, Plantier JC: **Performance Evaluation of the New HIV-1 Quantification Assay, Xpert HIV-1 Viral Load, on a Wide Panel of HIV-1 Variants.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2016, **72**(5):521-526.
84. Ceffa S, Luhanga R, Andreotti M, Brambilla D, Erba F, Jere H, Mancinelli S, Giuliano M, Palombi L, Marazzi MC: **Comparison of the Cepheid GeneXpert and Abbott M2000 HIV-1 real time molecular assays for monitoring HIV-1 viral load and detecting HIV-1 infection.** *J Virol Methods* 2016, **229**:35-39.
85. Xu S, Song A, Nie J, Li X, Wang Y: **Performance of NucliSens HIV-1 EasyQ Version 2.0 compared with six commercially available quantitative nucleic acid assays for detection of HIV-1 in China.** *Mol Diagn Ther* 2010, **14**(5):305-316.
86. Mourez T, Delaugerre C, Vray M, Lemee V, Simon F, Plantier JC: **Comparison of the bioMerieux NucliSENS EasyQ HIV-1 v2.0-HIV-1 RNA quantification assay versus Abbott RealTime HIV-1 and Roche Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 on current epidemic HIV-1 variants.** *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2015, **71**:76-81.
87. Nair SV, Kim HC, Fortunko J, Foote T, Peling T, Tran C, Nugent CT, Joo S, Kang Y, Wilkins B *et al*: **Aptima HIV-1 Quant Dx--A fully automated assay for both diagnosis and quantification of HIV-1.** *J Clin Virol* 2016, **77**:46-54.

88. Manak MM, Hack HR, Nair SV, Worlock A, Malia JA, Peel SA, Jagodzinski LL: **Evaluation of Hologic Aptima HIV-1 Quant Dx Assay on the Panther System on HIV Subtypes.** *J Clin Microbiol* 2016, **54**(10):2575-2581.
89. Avettand-Fenoel V, Damond F, Gueudin M, Matheron S, Melard A, Collin G, Descamps D, Chaix ML, Rouzioux C, Plantier JC: **New sensitive one-step real-time duplex PCR method for group A and B HIV-2 RNA load.** *J Clin Microbiol* 2014, **52**(8):3017-3022.
90. Gueudin M, Plantier JC, Damond F, Roques P, Mauciere P, Simon F: **Plasma viral RNA assay in HIV-1 group O infection by real-time PCR.** *Journal of virological methods* 2003, **113**(1):43-49.
91. Gueudin M, Lemee V, Ferre V, Beby-Defaux A, Pathe JP, Guist'hau O, Braun J, Simon F, Plantier JC: **Virologic diagnosis and follow-up of children born to mothers infected by HIV-1 group O.** *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2004, **36**(1):639-641.
92. Gueudin M, Leoz M, Lemee V, De Oliveira F, Vessiere A, Kfutwah A, Plantier JC: **A new real-time quantitative PCR for diagnosis and monitoring of HIV-1 group O infection.** *J Clin Microbiol* 2012, **50**(3):831-836.
93. May S, Adamska E, Tang JW: **Evaluating the aptima HIV-1 quant Dx, HCV quant Dx and HBV quant assays against the Abbott HIV-1, HCV and HBV RealTime assays.** *J Clin Virol* 2018, **106**:7-10.
94. Moisan A., De Oliveira F., Cappy P, Ngoupo PA, Njouom R, JC. P: **Evolution of HIV-1 groups M and O : genetic comparative analysis of 19 HIV-1/MO inter-group recombinant forms.** In: *9th IAS Conference on HIV Science: 23-26 July 2017 2017; Paris, France.*
95. Caron J, Moisan A, De Oliveira F, Plantier J-C: **Analyse et caractérisation des régions LTR du génome d'un VIH-1 recombinant inter-groupes M et O.** In: *JNRB; Rouen. 2017.*
96. Moisan A, Caron J, De Oliveira F, Plantier J-C: **Analyses des régions LTR du génome d'un VIH-1 recombinant inter-groupes M et O : étude de l'émergence des points de cassure et caractérisation des différentes populations.** In: *JNRB; Rouen. 2018.*
97. <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>
98. **Comité Qualité de la Société Française de Microbiologie QUAMIC;** 2017.
99. Ehret R, Schütze M, Moritz A, Obermeier M: **Hologic Aptima HIV-1 Quant Dx Assay Compared to Abbott RealTime in B and non-B Subtypes in daily routine testing.** In: *Medical Center for Infectious Diseases; Berlin. 2015.*
100. Amendola A, Pisciotta M, Aleo L, Ferraioli V, Angeletti C, Capobianchi MR: **Evaluation of the Aptima((R)) HIV-1 Quant Dx assay for HIV-1 RNA viral load detection and quantitation in plasma of HIV-1-infected individuals: A comparison with Abbott RealTime HIV-1 assay.** *J Med Virol* 2016, **88**(9):1535-1544.

SERMENT DE GALIEN

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



GICQUEL Albane

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

Th. D. Pharm., Rouen, 2019, 79 p.

RESUME

Les propriétés intrinsèques du VIH, comme son fort taux de réplication et la faible fidélité de sa transcriptase inverse, sont responsables de sa forte diversité génétique, conduisant à la distinction en VIH de type 1, divisé en 4 groupes (VIH-1/M, /N, /O, et /P), et de type 2. Des phénomènes de recombinaison entre sous-types et groupes du VIH-1 permettent la genèse de virus recombinants. Cette recombinaison, selon sa localisation dans le génome, peut avoir un impact sur la quantification de l'ARN viral plasmatique. Dans notre contexte d'étude de co-infection par des VIH-1/M+O et d'infection par des recombinants VIH-1/MO, des méthodes de quantification spécifiques de groupes sont utiles pour distinguer les espèces virales répliquatives. L'objectif de ce travail était donc de mettre au point une qRT-PCR spécifique du VIH-1/M, amplifiant une région de l'intégrase. La spécificité de notre technique a été analysée sur 30 surnageants de VIH-1/O. Ses performances cliniques ont été étudiées sur 200 échantillons de VIH-1/M. Son seuil de quantification, sa répétabilité et sa reproductibilité ont également été déterminés. Aucun VIH-1/O n'a été amplifié. Le seuil de quantification a été établi à 100 copies/mL et les répétabilité et reproductibilité obtenues étaient très bonnes. La sensibilité clinique a montré une bonne corrélation entre la qRT-PCRINTM et la technique de référence non spécifique de groupe Abbott ($r^2=0,905$), avec néanmoins une légère quantification plus élevée par la qRT-PCR INTM dans les charges virales hautes. 8% des échantillons n'ont pas été quantifiés avec notre technique et 9,8% présentaient une discordance ($>0,5\log_{10}$ copies/mL) entre les 2 techniques. Le séquençage dans la région de l'intégrase des échantillons discordants a permis seulement d'évoquer une tendance à un risque de sous-quantification, lorsque sont présentes la mutation G19A au niveau du site de fixation de l'amorce sens et/ou la mutation W18C au niveau du site de fixation de la sonde. Le développement de cette qRT-PCRINTM offre donc un outil supplémentaire pour le diagnostic et le suivi des co-infections VIH-1/M+O et des infections par un recombinant MO associé à une ou aux deux formes parentales.

MOTS CLES : VIH– co-infection – recombinaison inter-groupes M et O – quantification (qRT-PCR)

JURY

Président : Mme PESTEL-CARON Martine, Professeur des universités, Rouen

Membres : Mme DAMOND Florence, Praticien hospitalier, Paris

Mme MAILLARD Anne, Praticien hospitalier, Rennes

Mme MOISAN Alice, Assistante hospitalo-universitaire, Rouen

Mr PLANTIER Jean-Christophe, Professeur des universités, Rouen

DATE DE SOUTENANCE : 9 avril 2019