

AC11 ANRS - Groupe HCV

J. Izopet - C. Payan

Paris

Province

Avicennes
Créteil
Cochin
Necker
Paul Brousse
Pitié
INTS

Amiens
Angers
Bordeaux
Brest
Clermont
Limoges
Marseille
Nantes
Rennes
Rouen
St Etienne
Strasbourg
Tours
Toulouse

Axes de travail

- ✓ **Standardisations de techniques**
 - mesure de l'ARN HCV par PCR en temps réel
 - détermination du génotype par séquençage de la région NS5B

- ✓ **Etude du polymorphisme des régions NS3 et NS5B du HCV**

- ✓ **Contrôles de qualité**

- ✓ **Réponse virologique & pharmacologie**

Séquençage de la région NS5B

- ✓ Intérêt
 - techniques de référence pour la caractérisation du génotype et du sous-type
 - permet de tracer l'origine d'une infection
- ✓ Protocole consensus validé

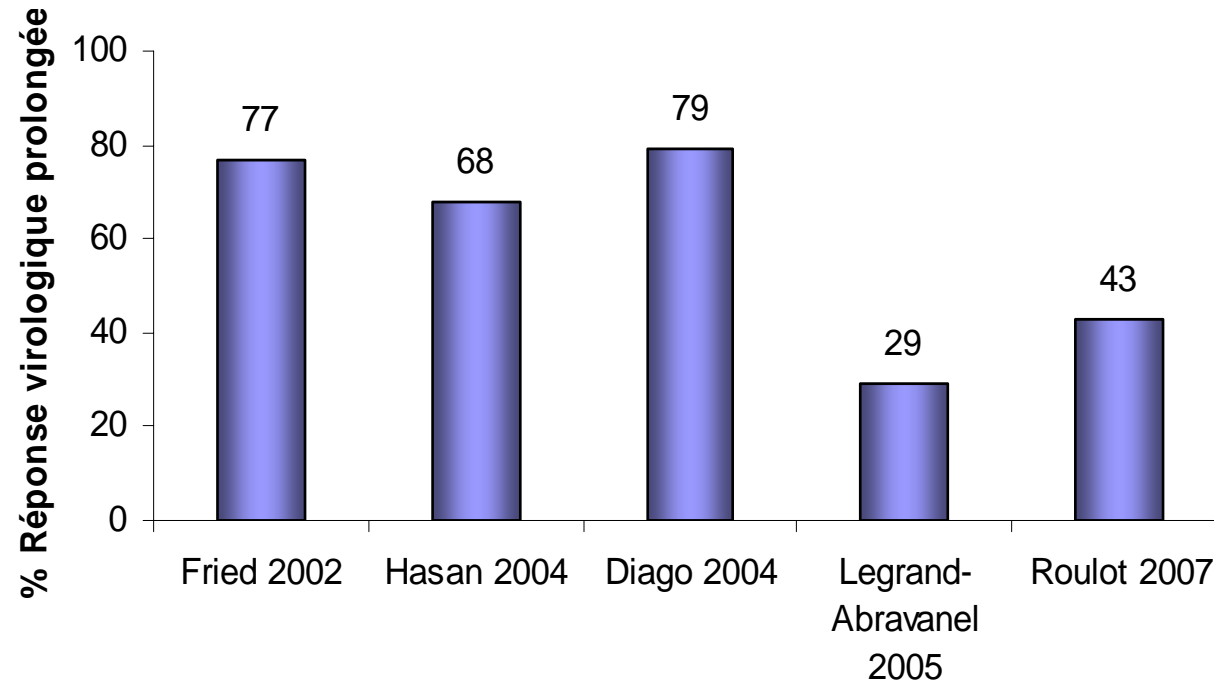
Sensibilité intrinsèque des génotypes non-2/3 à l'IFN pégylé + ribavirine

- ✓ Etude prospective
- ✓ Détermination du génotype par séquençage de la région NS5B
- ✓ Analyse de la réponse virale initiale et prolongée

Sensibilité HCV-1a vs HCV-1b ?

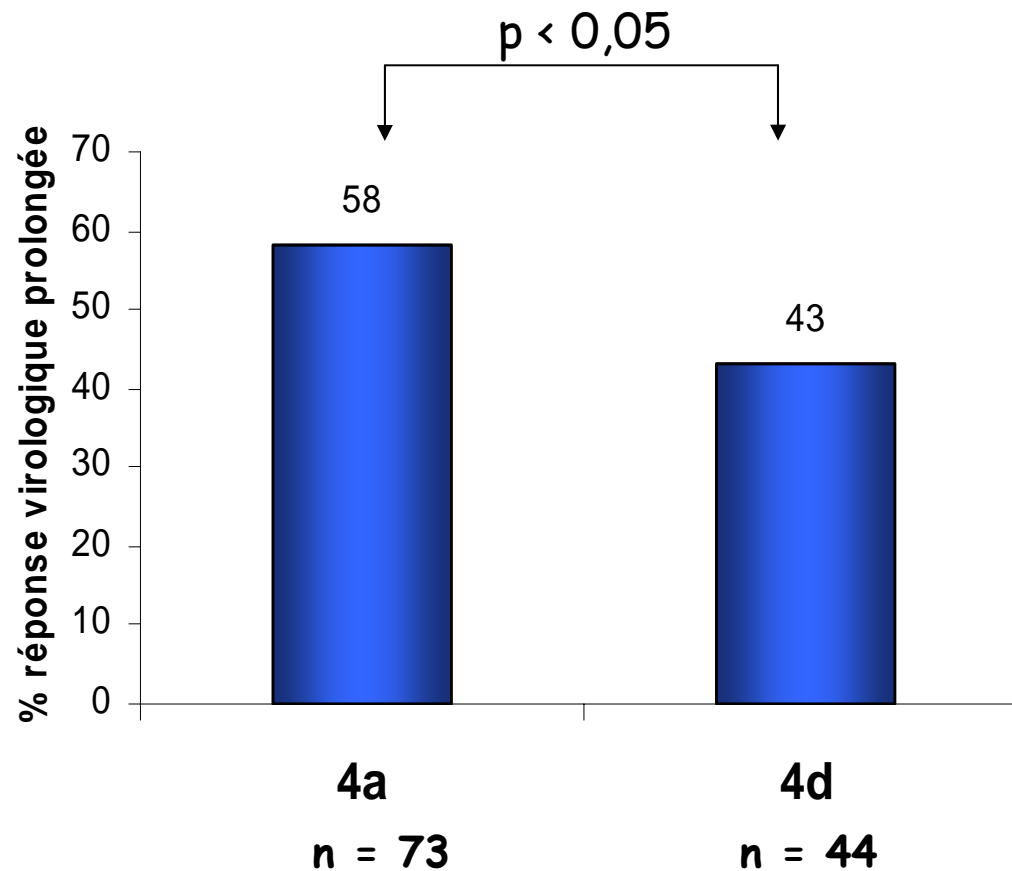
- ✓ Sous-typage fondé sur la région 5' non-codante dans tous les essais cliniques :
 - Hybridation inverse : LiPATM
 - Séquençage : TrugeneTM
- ✓ 20 - 30 % des échantillons mal classés

Sensibilité HCV-4 ?



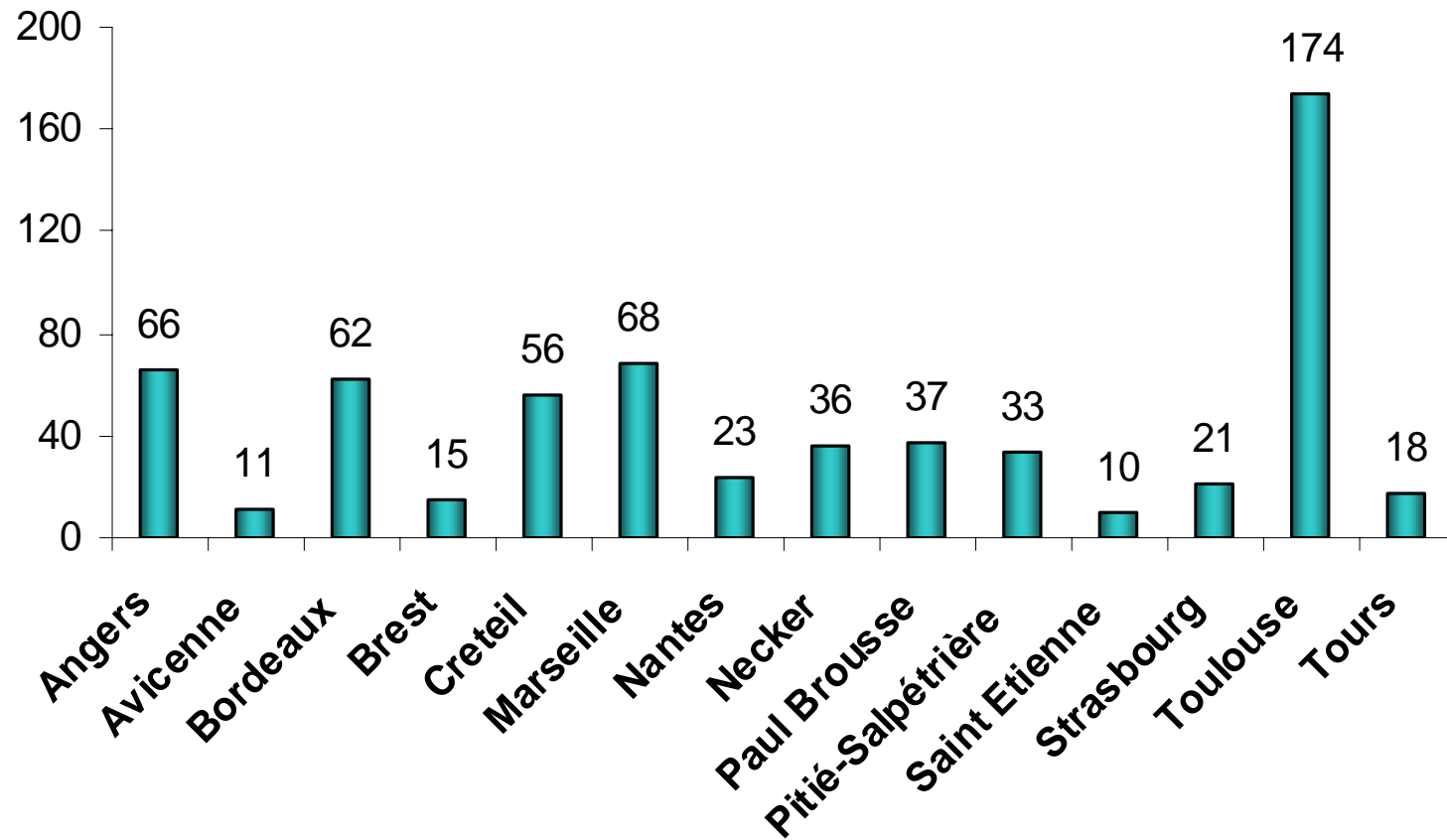
Peg-IFN + RBV

Différence de sensibilité du génotype 4 selon le sous-type ?



Roulot, J Viral Hepatitis 2007

Inclusions n = 630



Génotypage NS5B

Génotype 1

521/630



1a: 232

1b: 267

1c: 1

1d : 2

1e: 1

1l : 1

1 ind : 17

Génotype 4

95/630



4a: 37

4c : 7

4d: 30

4e : 1

4f : 6

4h : 1

4k: 5

4r: 1

4m: 1

4o: 1

4j: 1

Génotype 5

9/630



5a: 9

Génotype 6

5/630



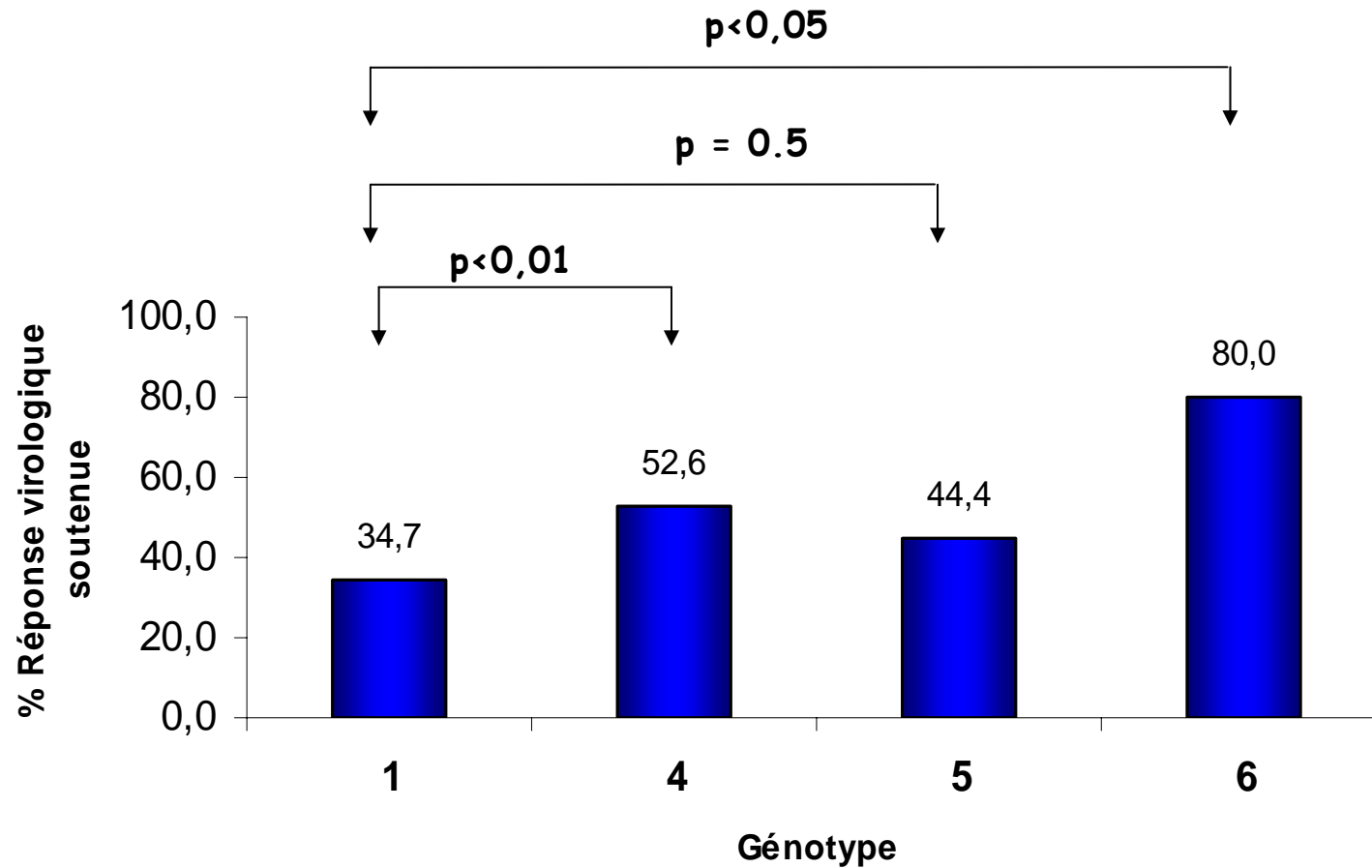
6a: 1

6e: 1

6q: 1

6 ind : 2

Réponse virologique prolongée



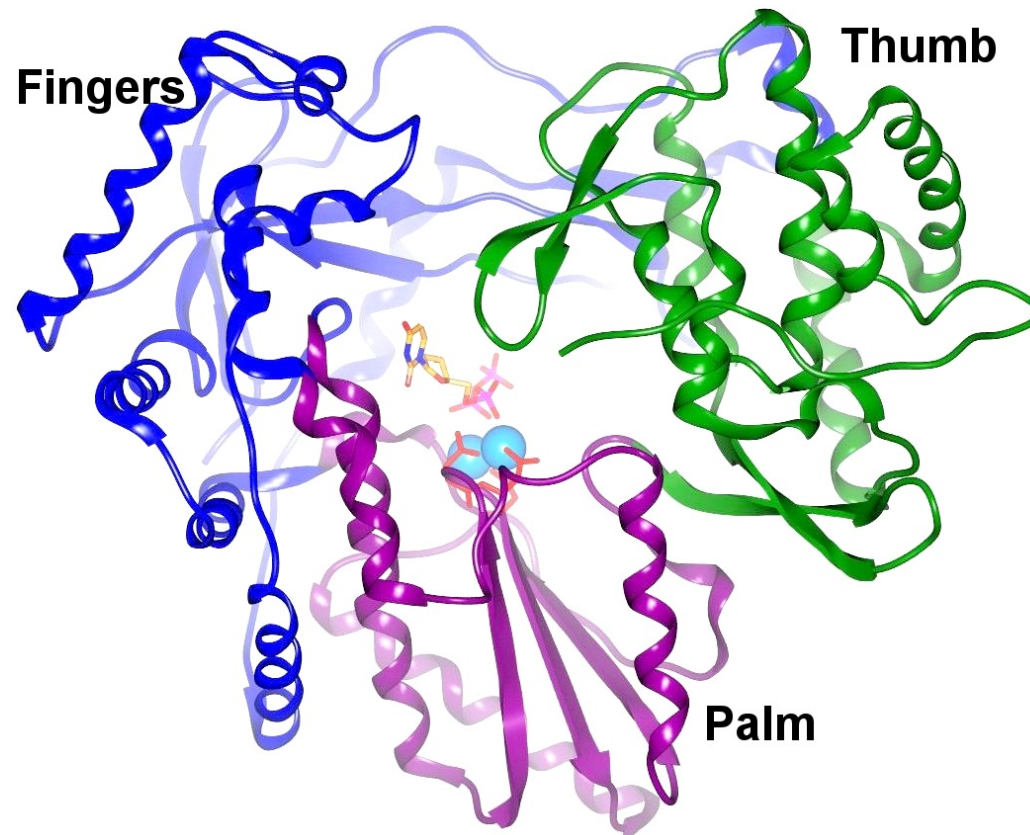
Réponse virologique prolongée

Génotype 1	34,7% (181/521)	Sous type 1a	30,6% (71/232)
		Sous type 1b	37,5% (100/267)
		Sous type 1c	100% (1/1)
		Sous type 1d	50% (1/2)
		Sous type 1e	100% (1/1)
		Sous type 1l	0% (0/1)
		sous type indéterminé	41,2 (7/17)
Génotype 5	44,4% (4/9)	Sous type 5a	44,4% (4/9)
Génotype 6	80% (4/5)	Sous type 6q	100% (1/1)
		Sous type 6e	100% (1/1)
		Non sous typés	100% (2/3)

Réponse virologique prolongée

Génotype 4	52,6% (50/95)	Sous type 4a	51,4 % (19/37)
		Sous type 4c	57,1 % (4/7)
		Sous type 4d	53,3 % (16/30)
		Sous type 4e	100% (1/1)
		Sous type 4f	33,3% (2/6)
		Sous type 4h	0% (0/1)
		Sous type 4k	60% (3/5)
		Sous type 4m	100% (1/1)
		Sous type 4o	100% (1/1)
		Sous type 4r	100% (1/1)
		Non sous typés	50% (2/4)

Structure de NS5B



NS5B:1800 nt
590 aa

Structure 3D en main droite

Inhibiteurs NS5B

Inhibiteurs Non Nucléosiques Site 1

Thumb II
Benzimidazoles

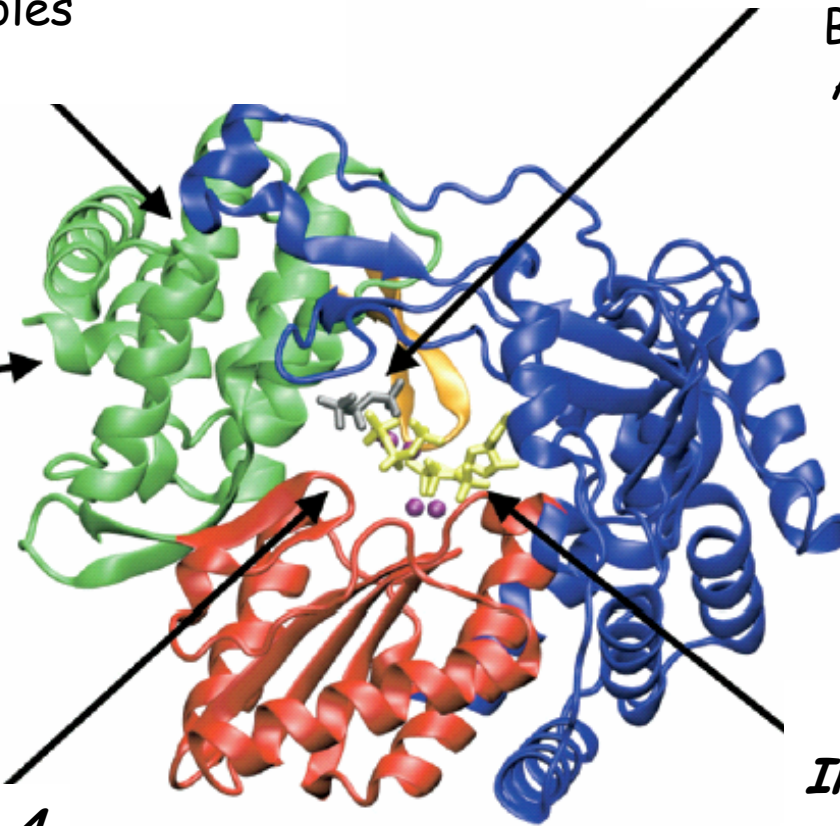
INN Site 3

Palm I
Benzothiazidines
Acylpyrrolidines

INN Site 2
Thumb I
Thiophènes
Pyranoindoles
Dihydroxypirones

INN Site 4
Palm II
Benzofuranes

Site catalytique
Inhibiteurs Nucléosiques
Valopicitabine
4'-azidocytidine



Classe des anti-viraux	Famille	Publications	Mutations répertoriées
Inhibiteurs non nucléosidiques	Benzimidazoles	Kukulj, j Biol Chem 2005 Tomei, J Virol, 2006	P495S/L, V499A
	Thiophènes	Le Pogam, J virol 2006	L419M, M423T, I482L
	Pyranoindoles	Howe et al, Antimicrobial agents Chem, 2006	L419M, M423V ou combinaisons :T19P, M71V, A338V, M423V, A442T
	Dihydropyrones	Shi et al , Antimicrobial Agents Chem 2007	M423T/V/I, M426T, I482S/T V494A
	Benzothiazidines	Nguyen et al, Antimicrobial Agents Chem, 2003, Mo et al, Antimicrobial Agents Chem 2005, Yang et al , Antimicrobial Agents Chem 2007	H95C, M414L/T, Y448H, S556G
	Acyl pyrrolidines	Pauwels J Virol 2007	P495L
	benzofuranes (HCV-796)	Pawlotsky gastroenterology 2007	C316Y/N
Inhibiteurs nucléosidiques	2'-C-methyl-ribonucléotides (Valopicitabine)	Le Pogam, Virology 2006, Murakami, Antimicrobial Agents Chem 2006 ;	S282T
	4'-azidocytidine (R1626 pro drogue de R1479)	Klumpp J Biol Chem 2006 ; Smith et al, Bioorganics med chemistry letters 2007	S96T, S96T / N142T

Polymorphisme génotype 1

- 92 patients génotype 1 (72 GT1a, 20 GT1b)
19 souches avec un polymorphisme

Benzothiazidines → 8%

Benzimidazoles → 2%

Benzofuranes → 2 %

Analogues nucléosidiques → 0%

- Analyses clonales pour 13 échantillons
(90 -100 clones)

Mutations INN chez 1 à 5 % clones

Protocole AC11-HCV pour NS5B

- **Amplification du gène NS5B**
 - Amorces spécifiques de génotype
 - RT-PCR seule
 - RT-PCR suivie de 2 hémi-nested PCR

- **Séquençage du gène NS5B : 1770 nucléotides**
 - 10 patients de génotype 1 (1a, 1b, 1h)
 - 15 patients de génotype 2 (2a, 2b, 2c, 2k, 2i)
 - 12 patients de génotype 3 (3a)
 - 11 patients de génotype 4 (4a, 4d, 4k)

Polymorphisme Génotype 1

AA Mutation	71	95	96	142	282	316	338	414	415	419	423	426	442	482	494	495	496	499	556	
	V	H	T	T	T	Y/N	V	L/T	F	M	V-T/I	T	T	S/T	A	L	P	P	A	G
1a-AF009606	V	H	S	N	S	C	A	M	F	L	M	M	A	I	V	P	P	A	S	
CAS-1a
CLE-1b	M	V	.	Y	V	.
TCH-1h	V	.	Y	T	.
AUD-1b	M	V	.	Y	.	.	.	T	.	A	.	.	.	V	G
DEB-1b	I	V	.	Y	.	.	.	T	V	.
DUM-1a	M
DUP-1b	N	V	.	Y	T	.
GIN-1a
GREN-1a
GROS-1a	I	A	T	.

Benzofuranes

Pyranoindoles

Dihydropyrones

Benzothiazidines

Polymorphisme Génotype 2

AA Mutation	71 V	95	96 T	142 T	282 T	316 Y	338 V	414 L/T	415	419 M	423 V-T/I	426 T	442 T	482	494 A	495	496	499	556 S
2a-D00944	I	H	S	N	S	C	A	Q	Y	I	M	M	N	L	A	P	P	A	
ROM-2a	V	S	.	.
BAI-2a
LAV-2b	V
DIA-2c	V	V
DOR-2c	V	V	X
CAS-2c	V	V	D
SOL-2c	V	V
CLO-2k	V	D
LAC-2k	V/D
LAV-2k	V	D	V
ROU-2k	D
GOU-2k	D
TAU-2i	V	L	.	.	D
PUJ-2i	V	L	.	.	D
ELA-2i	V	L	.	.	D

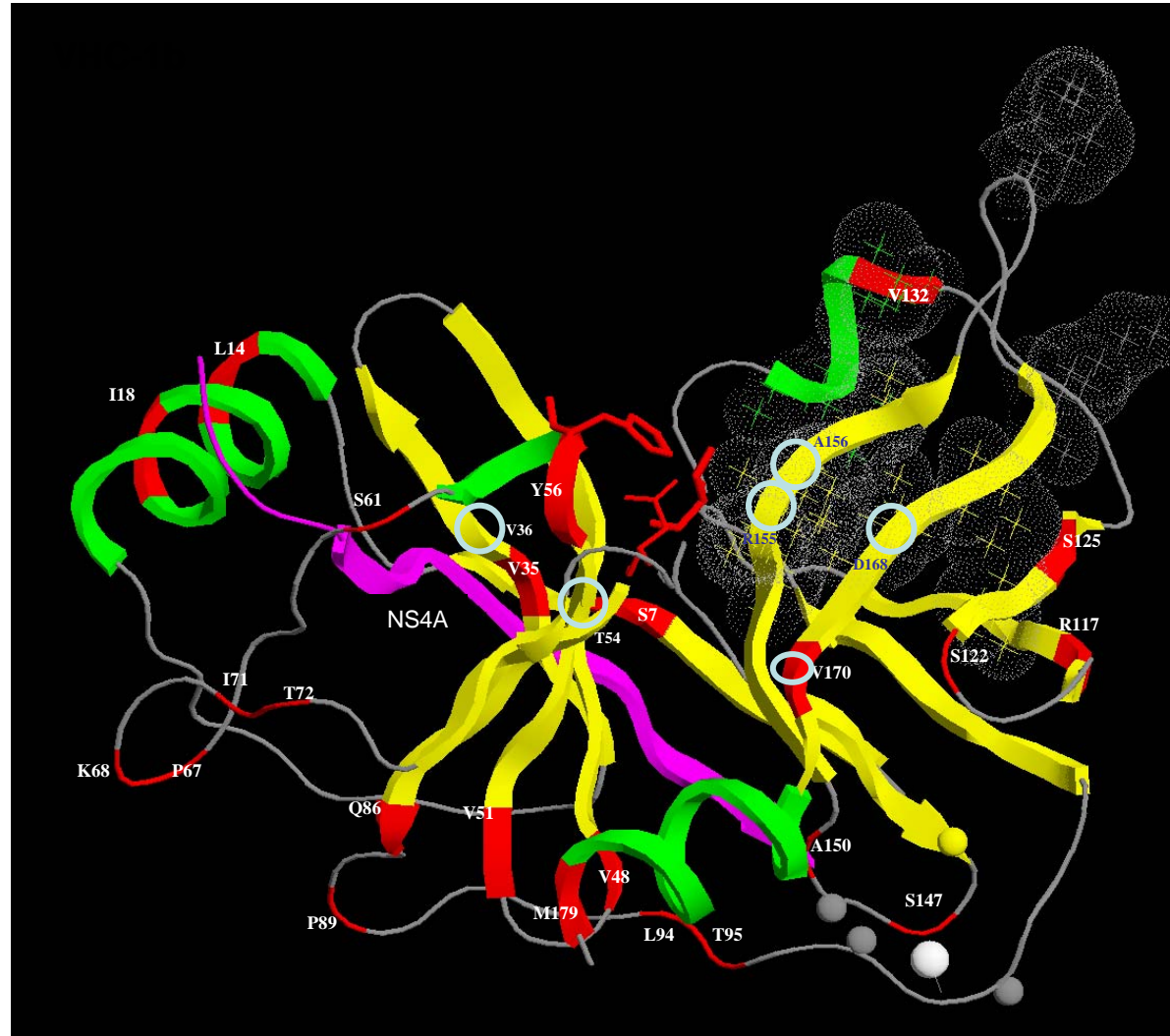
Pyranoindoles

Polymorphisme Génotype 4

Position AA Mutation en	19 P	71 V	95 H	96 T	142 T	282 T	316 Y	338 V	411 N	414 L/T	415 Y	419 M	423 V-T/I	426 T	442 T	448 Y	482 L	494 A	495 P	496 P	499 A
4a-Y11604	S	I	H	S	N	T	C	A	N	V	Y	I	M	M	A	Y	L	V	P	P	A
GD-4a	S
GHA-4a	S
ABRA-4a	S
CLA-4a	S
MOR-4a	S
NEVI-4a	S
VAL-4a	S
BRA-4d	T	S	.	.	.	I
GAR-4d	T	S	.	.	.	I
HAB-4d	T	S	.	.	.	I
FONO-4k	S	.	.	.	L

Valopicitabine

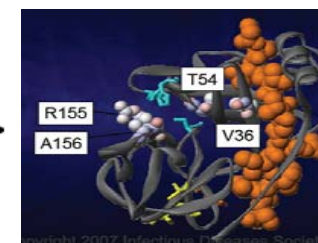
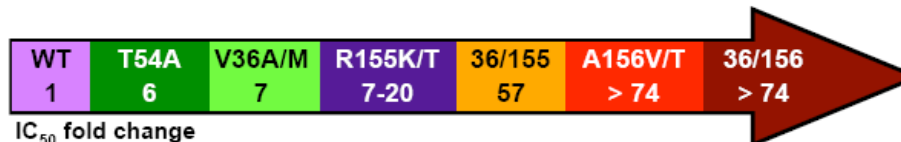
Sites polymorphes sur la structure 3D de la protéase NS3



Vallet et al, J Med Virol 2005

Essais pour le génotypage de résistance du VHC aux inhibiteurs de la protéase NS3

4 résidus NS3 impliqués dans la résistance au Télaprevir



- Design d'amorces NS3 pro (types 1, 2, 3, 4)
 - Couples externes et internes
 - Génotype spécifiques (dégénérées)
 - Sous-type spécifiques
 - RT-PCR One tube +/- nested PCR
 - essais PCR multiplex
 - Séquençage (amorces internes)

• Résultats :

-22 génotypes 1 amplifiés sur 25 testés



•13 sstypes 1b 11 + (85%)
 •11 1a 10+ (91%)
 •1 1c 1+ (100%)

Séquençage OK

-en cours (<50% amplification génotypes 2 et 3 !)

15 génotypes 2 (10 génotypes 2, 3 sstypes 2a, 2 sstype 2b)

16 génotypes 3 (4 génotypes 3, 10 sstypes 3a, 1 sstype 3b, 1 sstype 3c)

Optimisation du design des primers non-1 en cours, collaboration avec Virologie Rennes (Pr R.Colimon)

CQ ARN HCV 1^{er} tour 20 laboratoires

Panel de 15 échantillons

	bDNA	Monitor	Cobas TaqMan	Abbott RealTime
n	9	6	4	2
CV inter-labo	0,8-6,2%	0,8-10,9%	0,6-5,3%	0,1-15,1%

Faible variabilité inter-laboratoire pour une même technique
Différence inter-technique 0,3-2 log c/ml
Sous quantification de la technique bDNA

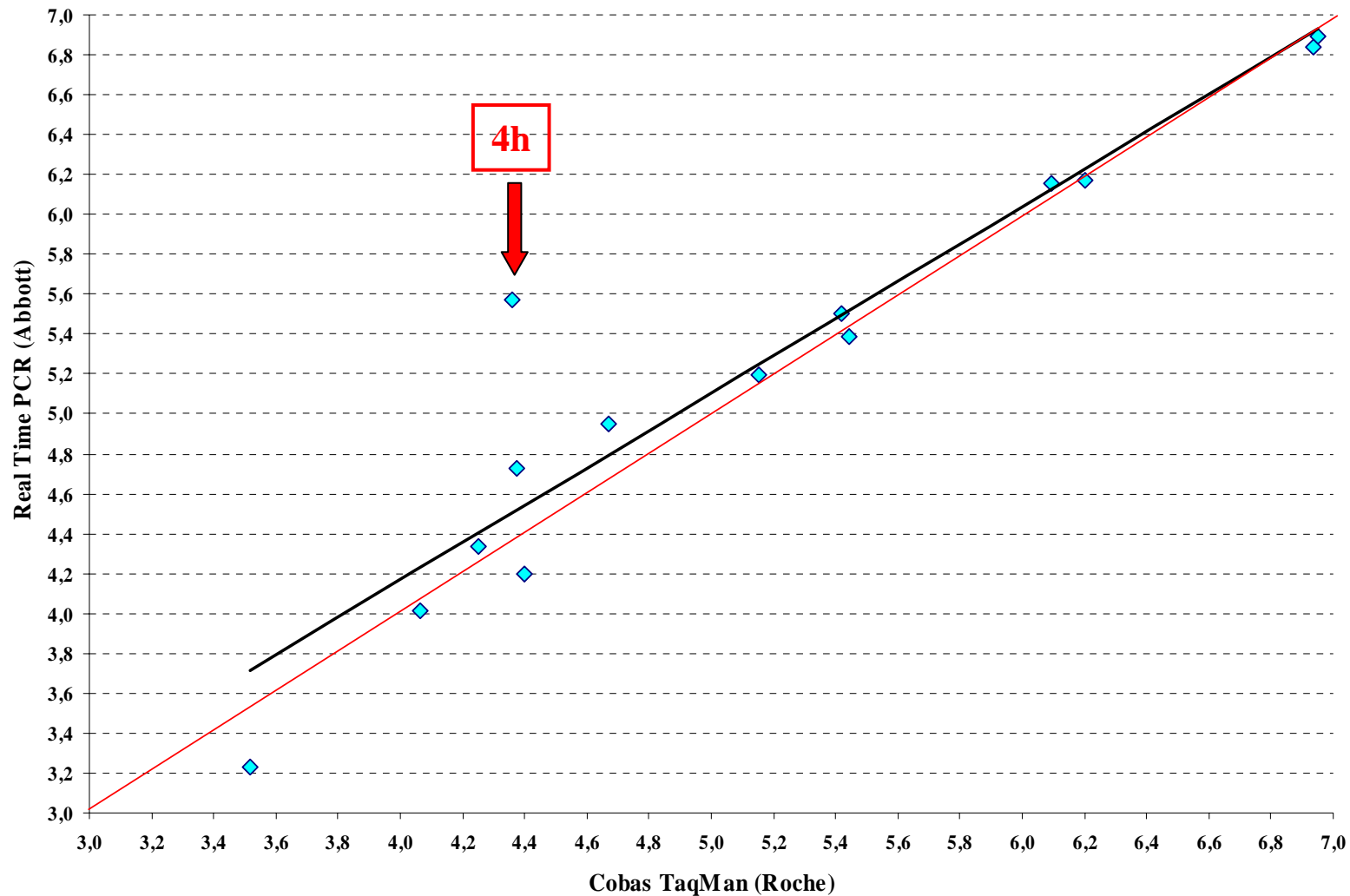
CQ charge virale HCV 2^{ème} tour *20 laboratoires*

Même panel de 15 échantillons

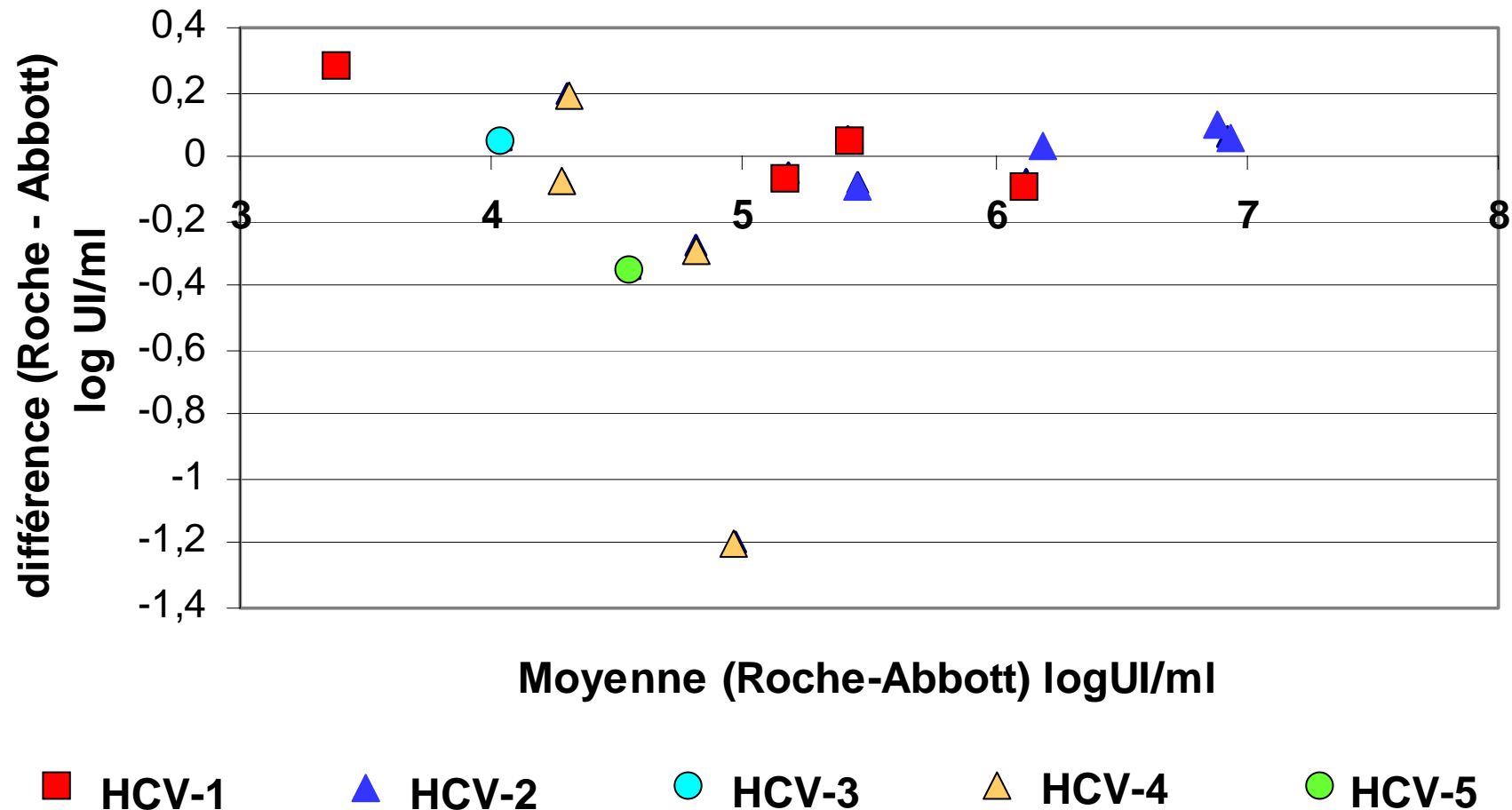
	Cobas TaqMan	Abbott RealTime
n	7	11
CV inter-labo	1- 4,8%	1- 6,6%

2^{ème} tour: corrélation Roche/Abbott

$R^2 = 0,89$



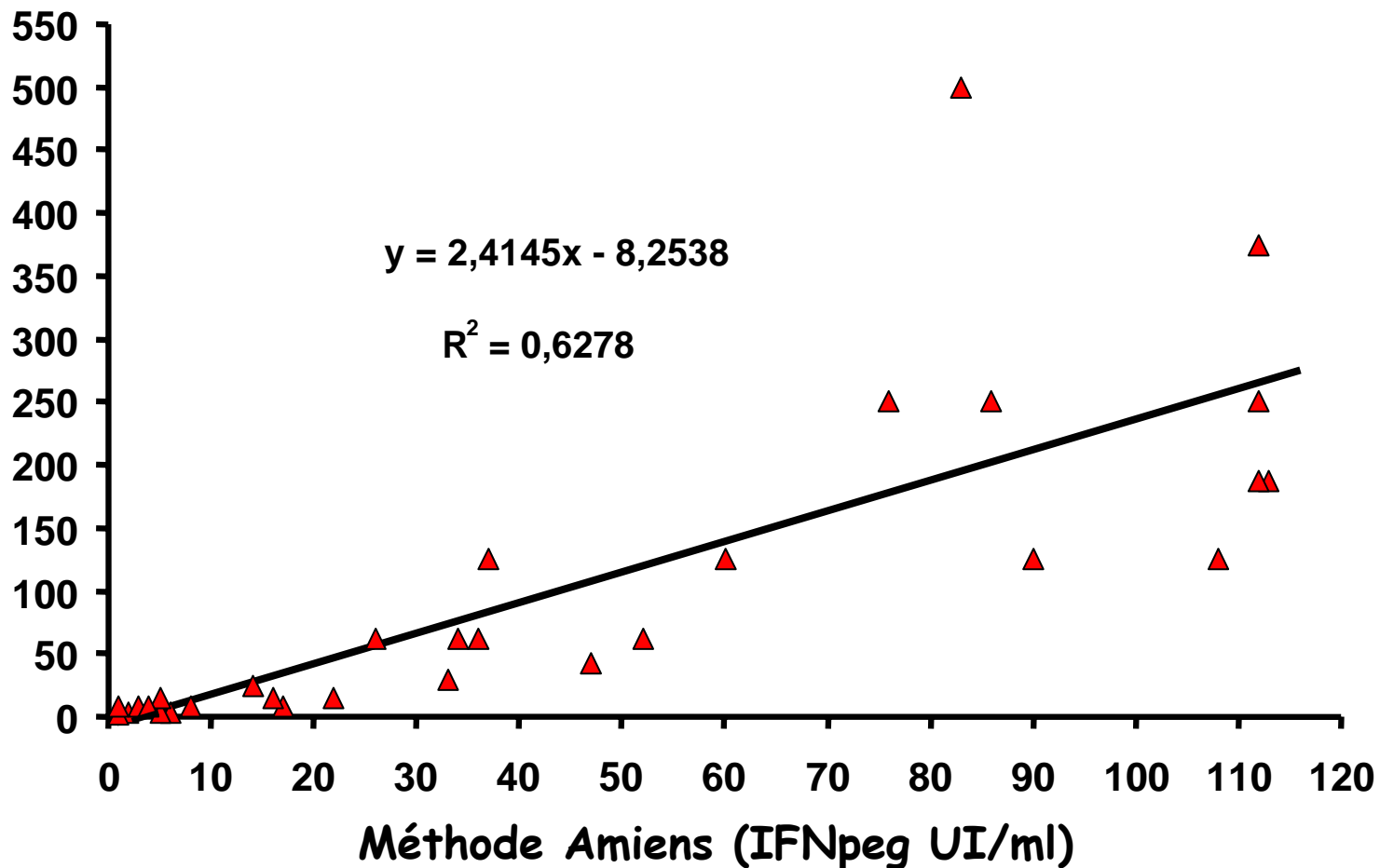
2^{ème} tour : Comparaison des moyennes Roche/Abbott



Moyenne des différences (Roche - Abbott) = - 0,1 log UI/ml

Dosage de l'Interféron alpha 2b pégylé Toulouse/Amiens (n=30)

Méthode Toulouse (IFNpeg UI/ml)



Impact des [RBV] et [PEG-IFN] sur la RVP des patients HIV-HCV ?

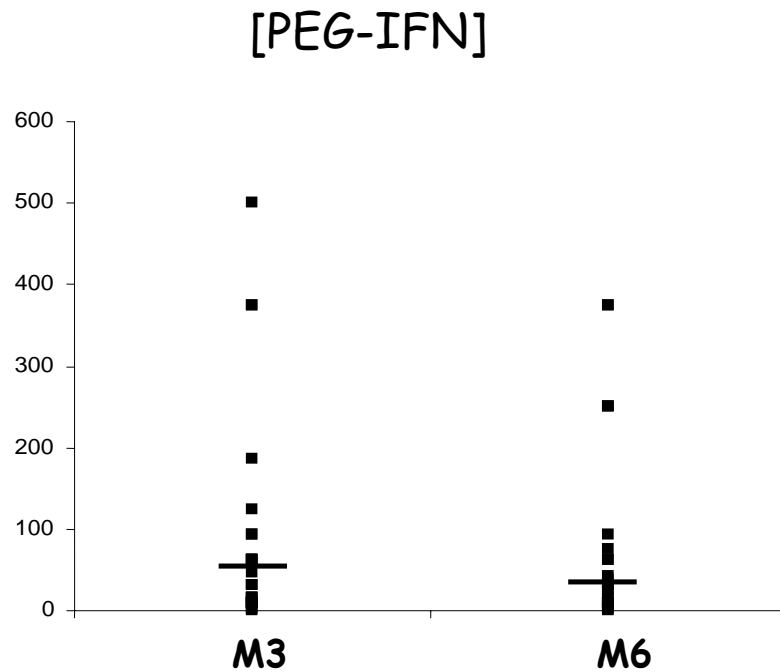
Etude de 35 patients co-infectés HIV-HCV

- Influence des paramètres pharmacologiques à M3 et M6 sur la RVP
 - [RBV]
 - [PEG-IFN]

- Influence du génotype HCV
 - Génotype 1-4 : 21 patients
 - Génotype 2-3 : 14 patients

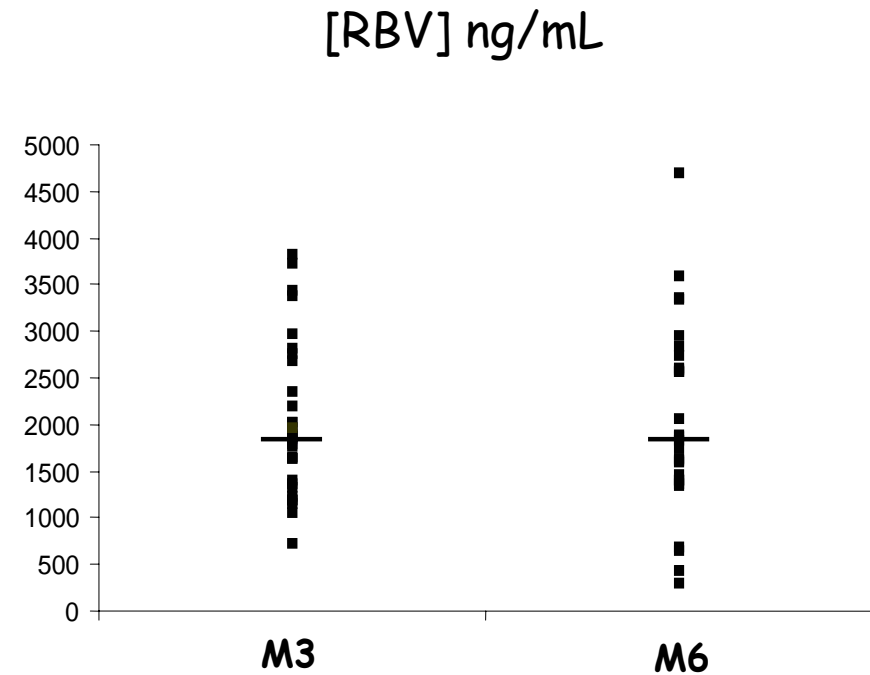
Paramètres pharmacologiques

Dosage biologique par mesure de l'inhibition de l'effet cytopathogène du VSV sur culture cellulaire



81 ± 116 UI/mL [0-500]
86 ± 113 UI/mL [0-375]

Dosage par méthode HPLC/détection UV



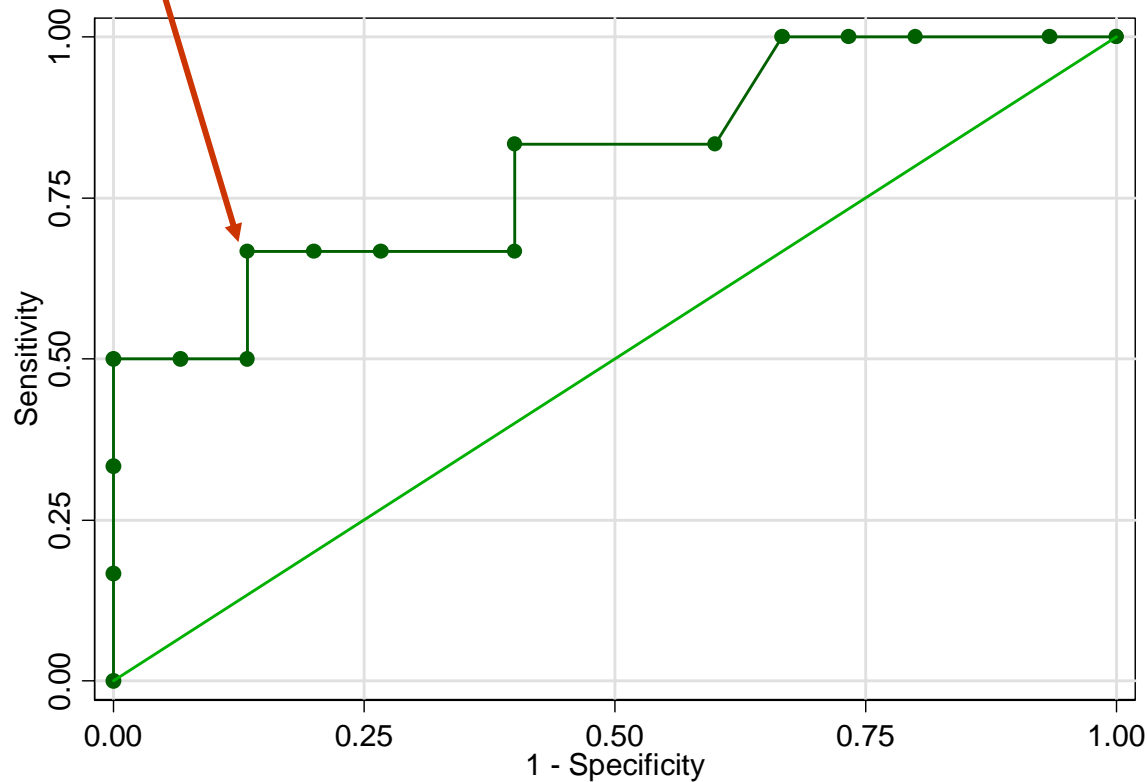
2,006 ± 780 ng/ml [717-3814]
2,034 ± 1,021 ng/mL [293-4,694]

Influence des [RBV] et de [PEG-IFN] sur la RVP

	Répondeurs	Non répondeurs	p
Concentrations moyennes de PEG-IFN (UI/mL)			
Tous génotypes	92 ± 164	75 ± 83	0.30
Concentrations moyennes de RBV (ng/mL)			
Tous génotypes	2 322 ± 926	1 833 ± 646	0.08
Génotypes 2-3	1 972	1 995	0.89
Génotypes 1-4	2 672	1 758	0.04

Influence des [RBV] génotypes 1-4 (n=21)

Seuil [RBV] = 2 300 ng/mL



Se = 67 %

Sp = 86 %

VPP = 50%

VPN = 70%

Aire courbe ROC = 0.8056

Projets financés par CSS7

- ✓ Duplication du domaine V3 NS5A (C Payan)
- ✓ Diversité du HCV-5 (C Henquell)
- ✓ Observatoire des glycoprotéines d'enveloppe du HCV (E Schvoerer)