

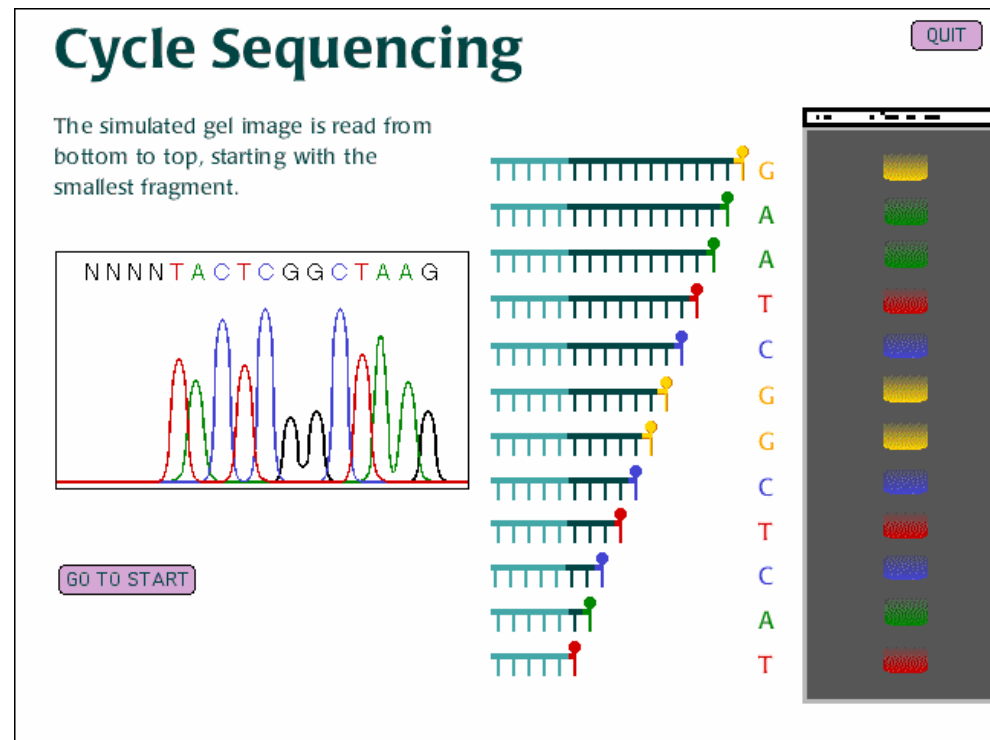
**Détection des variants minoritaires  
résistants aux ARV  
Signification clinique?**

**Dr Bernard Masquelier**

*Journée AC11 ANRS, 2008*

# Introduction: problème posé /méthodes de détection (1)

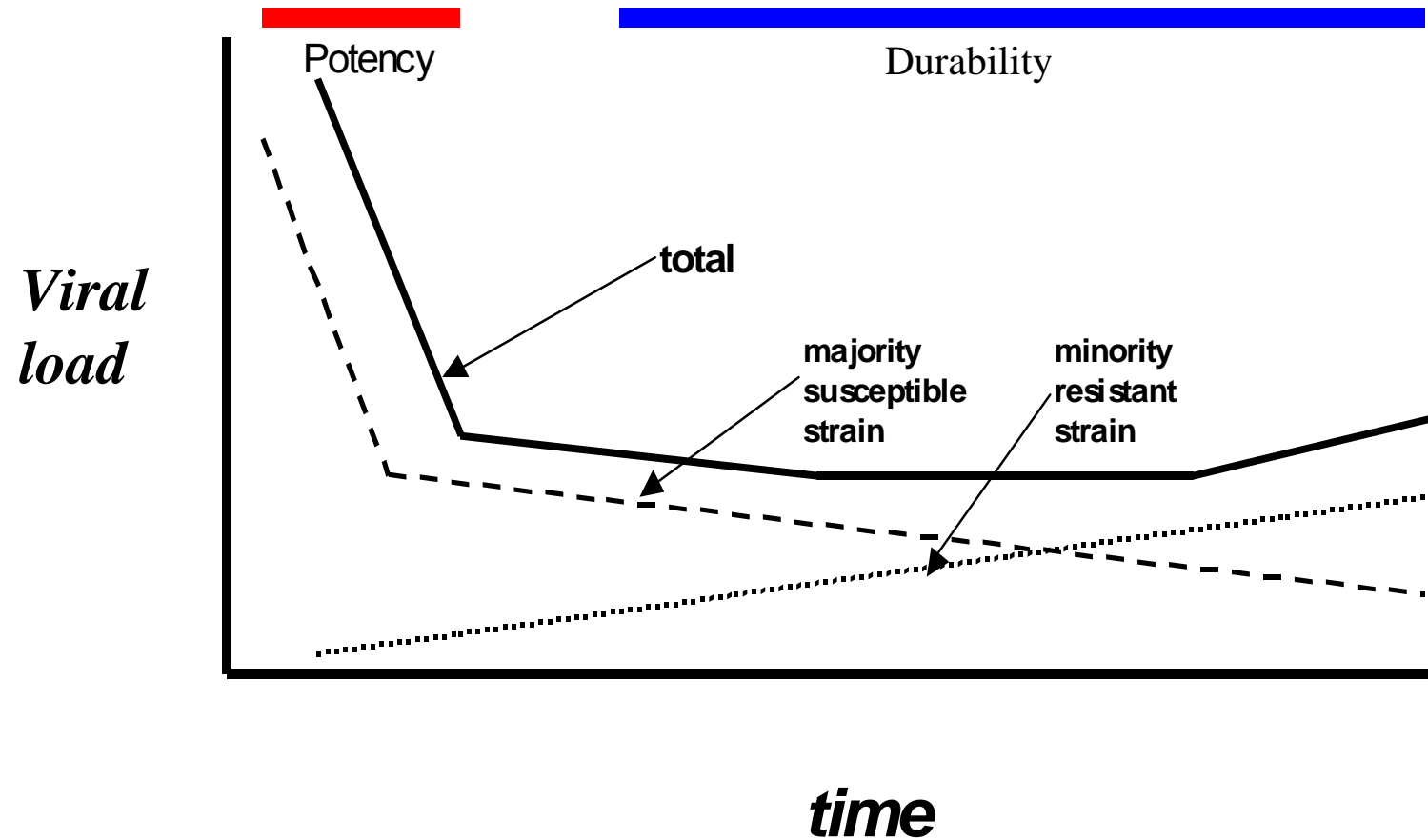
- Sous-populations minoritaires: seuil d'environ 20% pour la détection en séquençage conventionnel (Sanger) de la population globale



# Introduction: problème posé /méthodes de détection (2)

- Haute cinétique de réplication du VIH et mauvaise correction des erreurs de la TI
- ARV: changements de traitement, arrêts de traitement, désavantage de certaines mutations de résistance pour la capacité répliative
- Grand nombre de variants constituant une quasi-espèce, dont certains variants vont être représentés sous forme minoritaire
- Possibilité d'un variant minoritaire responsable d'échappement ultérieur au traitement?

# HOW MUCH CAN RESISTANCE TESTING ACTUALLY TELL US?

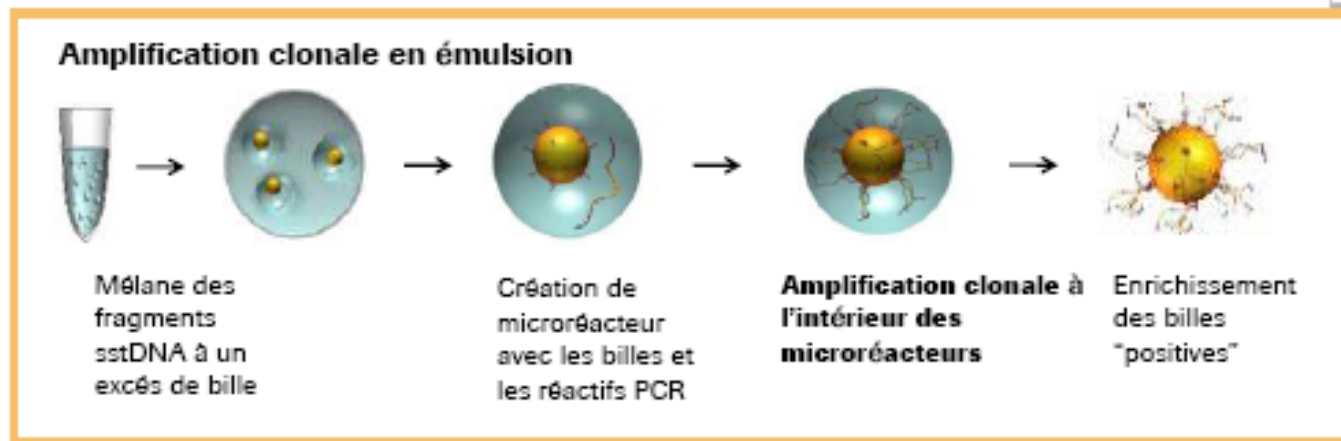


***-FIRST PHASE VIRAL DECLINE AS AN  
"IN VIVO" PHENOTYPE***

# Introduction: problème posé /méthodes de détection (3)

- Clonage: que pour recherche (nombre de séquences +++)
- Single Genome Sequencing: que pour recherche (dilution, nbre de séquences)
- PCR Spécifique d'allèle: assez largement utilisé mais nécessité standardisation et ne couvre que quelques mutations; que pour recherche...

- Ultradeep Sequencing: amplification clonale et séquençage par pyroséquençage



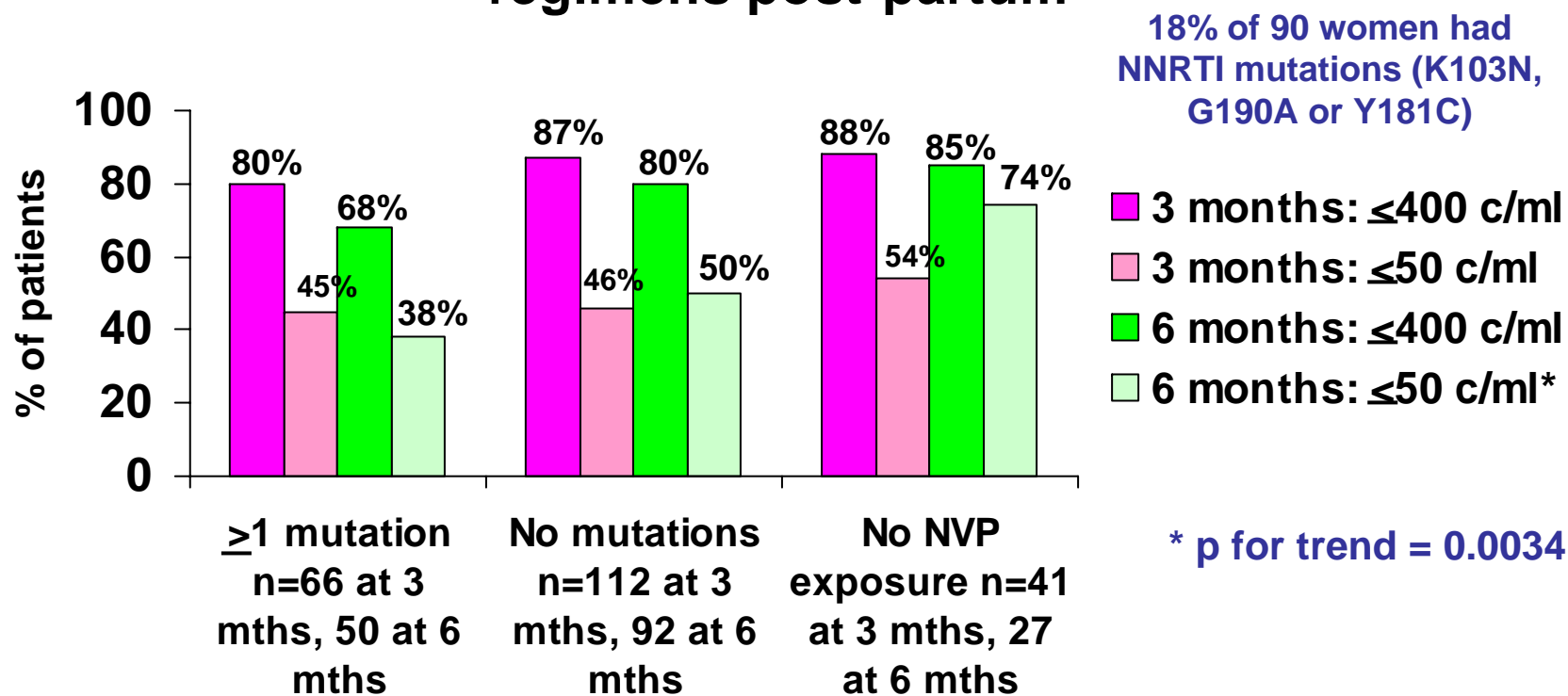
- Sensibilité 1% de la population majoritaire, développé pour RT et Protéase
- €€€€€€€

# Signification clinique: PTME

- Prévalence des mutations de résistance à la NVP après PTME: largement sous estimée par le séquençage usuel (Troyer ARHR 2008; Arrivé Int J Epidemiol. 2007; Flys JID 2007)
- Variants minoritaires R à NVP diminuaient de 52% at 6 semaines à 4% à 12 mois post partum dans une cohorte Sud Africaine

# NNRTI mutations from single dose NVP affect subsequent NNRTI therapy

## Viral load response to NNRTI-containing regimens post-partum



Later initiation of therapy (>6 months after single dose NVP exposure) associated with improved virological response

# Signification clinique: transmission et réponse au traitement

## **Transmission of minority-resistant variants and response to first-line antiretroviral therapy**

**O Peuchant, R Thiébaud, S Capdepon, V Lavignolle,  
P Morlat, D Neau, F Dabis, H Fleury, B Masquelier  
and the ANRS CO3 Aquitaine Cohort**

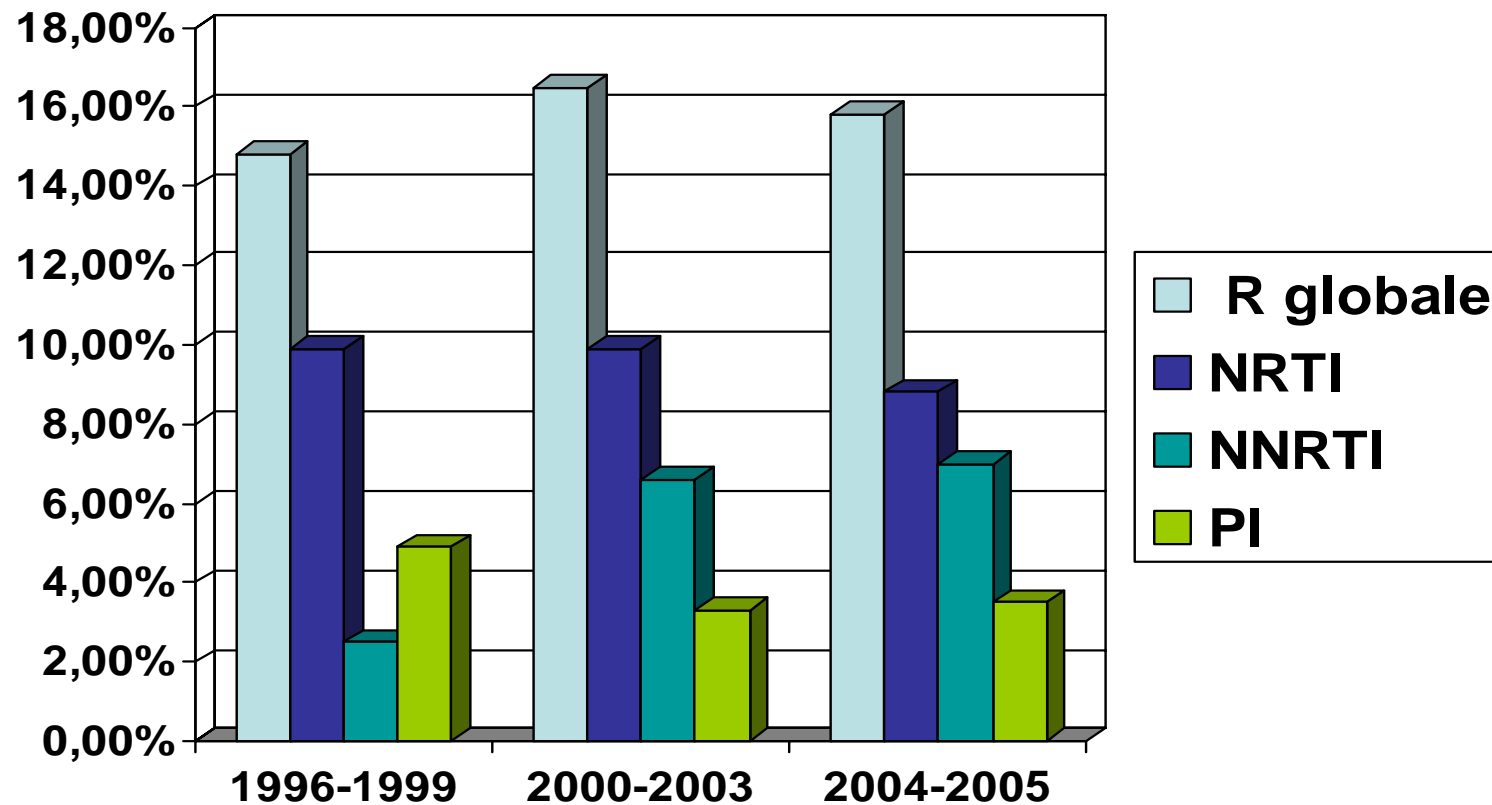
**AIDS 2008, *in press***

# Introduction (1)

- ❖ La Cohorte Aquitaine a inclu des patients infectés par le VIH et suivis dans les hôpitaux de cette région du Sud-Ouest de la France depuis 1987.
- ❖ Etude de la TR dans cette cohorte:
- ❖ Patients infectés entre 1996 et 2005 et avec un génotype RT et protéase disponible moins de 18 mois après la séroconversion et avant tout traitement ARV.
- ❖ Étude de la prévalence de la TR chez 229 patients, en séquençant la population virale plasmatique globale et en utilisant l'algorithme ANRS v13 pour définir la résistance génotypique.

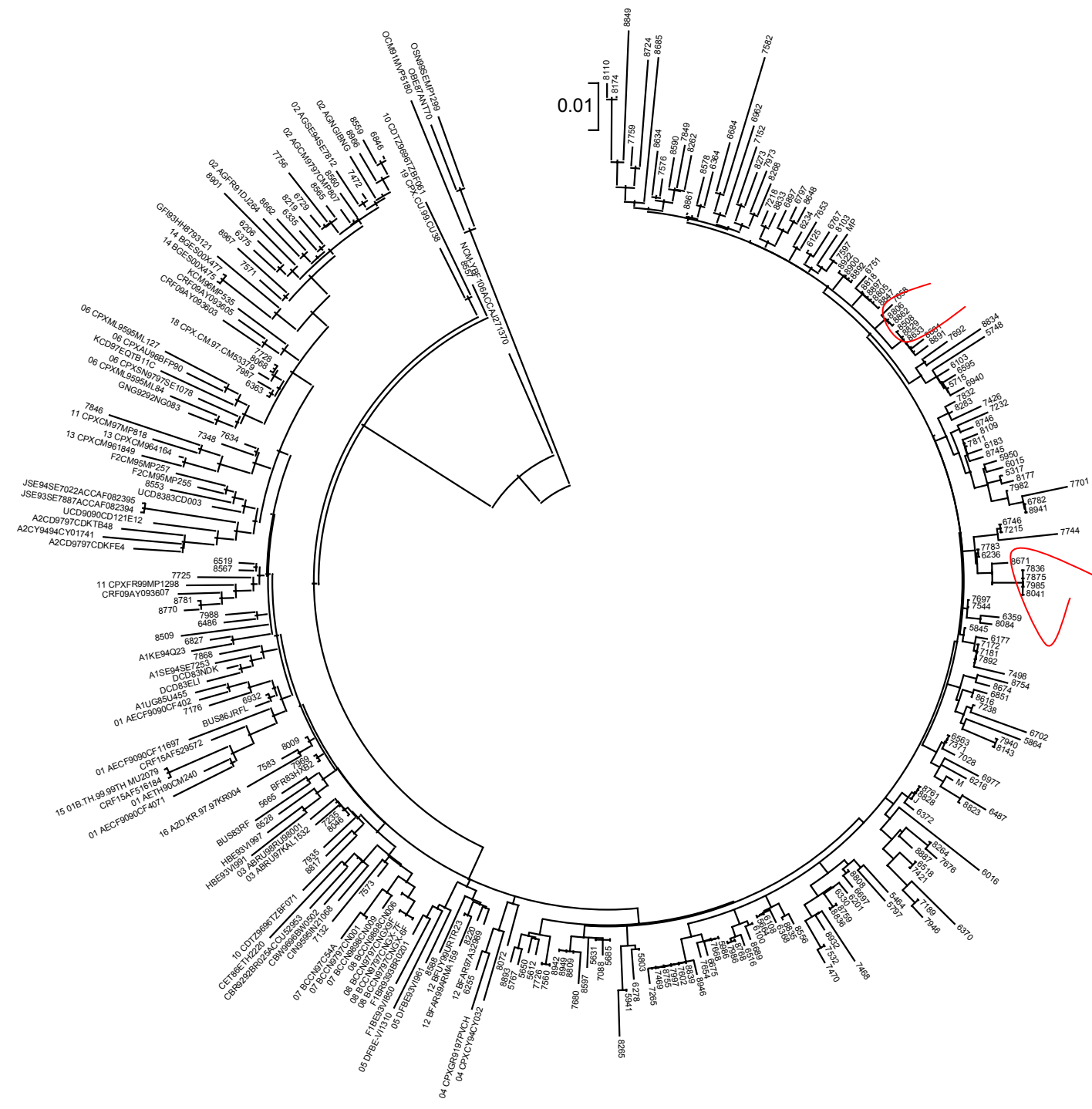
# Evolution de la prévalence des variants résistants, Cohorte Aquitaine, 1996-2005

prévalence globale 15.7% (n =229 patients)



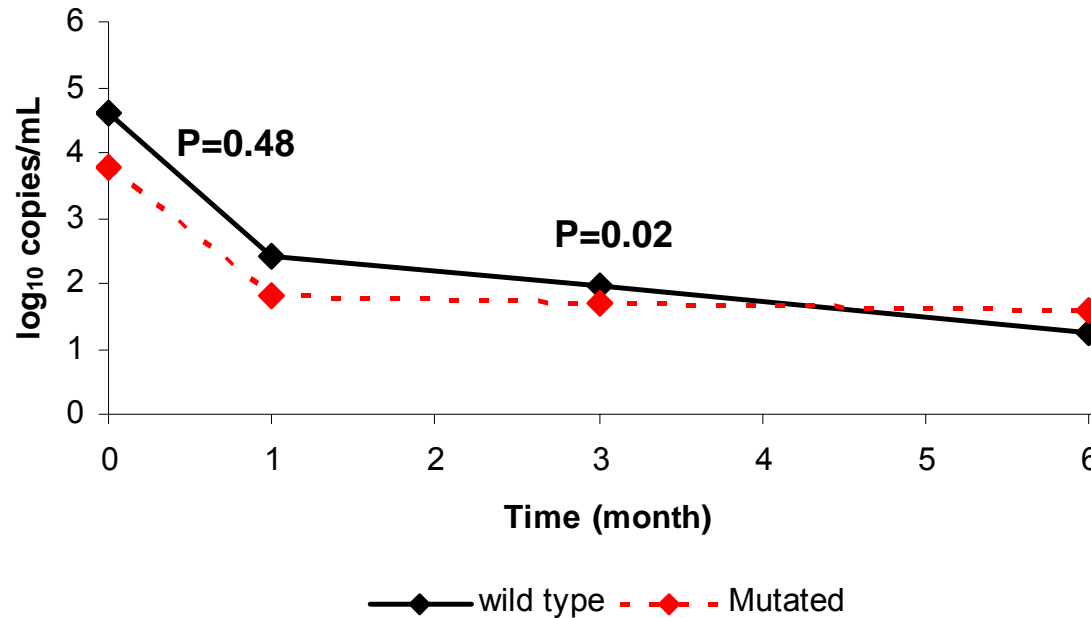
## Caractéristiques des patients (N=229)

	N (%)
Exposure category	
Sex between men	149 (65.1)
Sex between men and women	69 (30.1)
Injecting drug use	5 (2.2)
Other/unknown	6 (2.6)
Sex	
Male	191 (83.4)
Female	38 (16.6)
Geographic origin	
France	208 (90.8)
Africa	21 (9.2)
HIV-1 subtype	
B	190 (83.3)
Non B	38 (16.7)
Median age, (years) (IQR)	32 (27-41)
Median CD4 count (cells/ $\mu$ l, IQR)	473 (332-638)
Median plasma HIV-1 RNA (Log <sub>10</sub> copies/ml, IQR)	4.6 (4.0-5.3)



- **Impact de la transmission de variants résistants sur la réponse au traitement?**
- 172 patients de notre cohorte ont reçu un traitement de première ligne avec une analyse génotypique avant traitement.
- 16 (9.3%) patients avaient un virus résistant à au moins une molécule du traitement prescrit.
- Nous avons étudié l'association entre la résistance et la CV plasmatique/ le taux de CD4 à l'initiation du traitement et au cours des 6 premiers mois.
- Modèle mixte linéaire par morceaux prenant en compte la censure à gauche des CV indétectables

# Influence des variants résistants majoritaires sur la réponse virologique

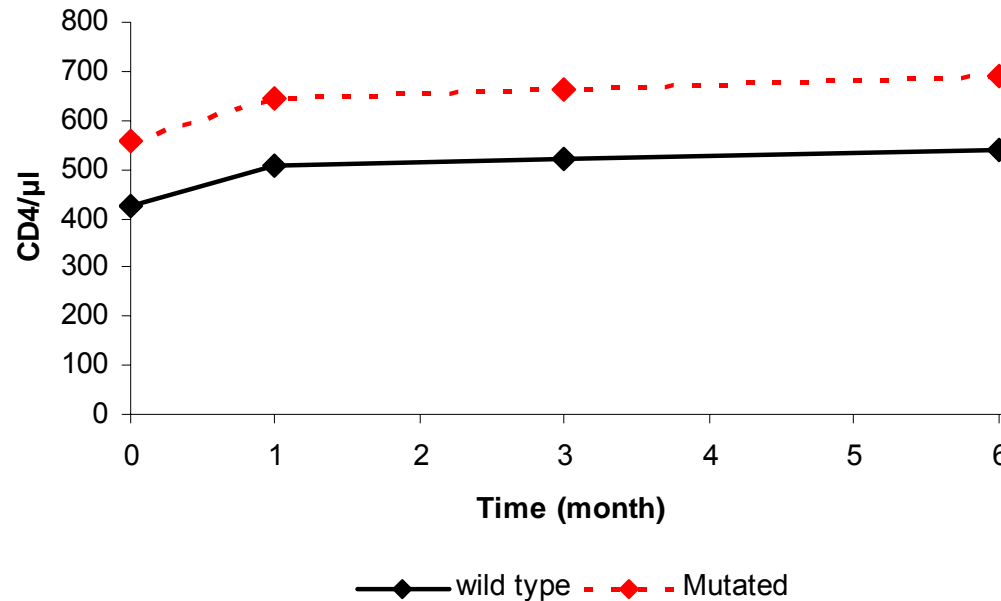


**CV de départ plus basse dans le groupe résistant que dans le groupe sensible**

**(3.76 log<sub>10</sub> vs 4.59 log<sub>10</sub>, p=0.002);**

**Décroissance de la CV plus accentuée après 1 mois dans le groupe sensible**

# Influence des variants résistants majoritaires sur l'évolution des CD4

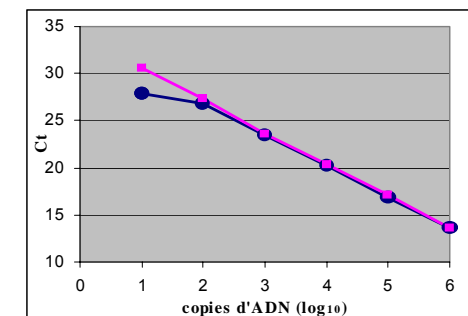
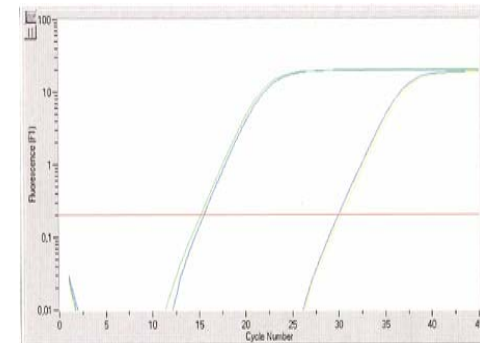
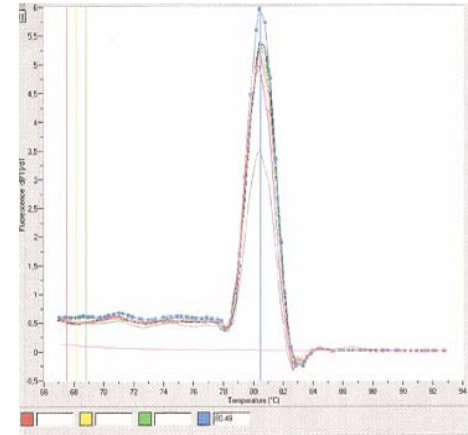


**CD4 de départ plus hauts dans le groupe résistant (557/ $\mu\text{l}$  vs 425/ $\mu\text{l}$  dans le groupe sauvage,  $p= 0.03$ )**

**Evolution parallèle par la suite**

# Détection des variants minoritaires

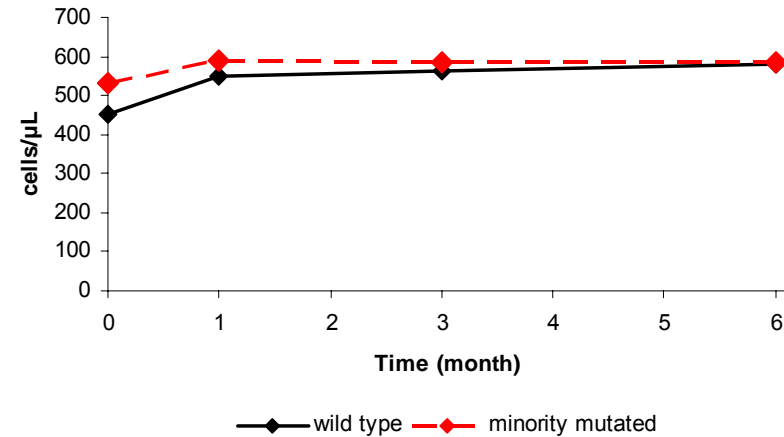
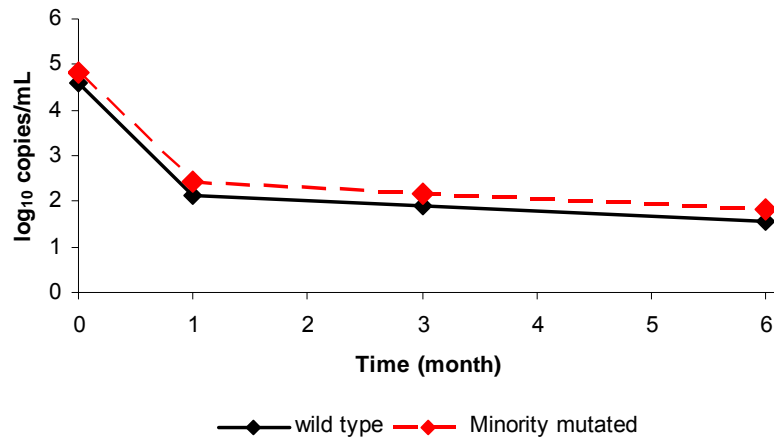
- Par PCR spécifique d'allèle en utilisant des amorces discriminantes pour la quantification des séquences sauvages ou mutées à des loci spécifiques;
- Discrimination: efficacité de la PCR diminuée de 8000 X en présence d'un désappariement;
- Sensibilité : détection d'un variant minoritaire représentant 0.5% de la population (20% par séquençage global)



## Signification clinique des variants minoritaires?

- Dans un sous-groupe de 73 patients récemment infectés traités par la suite par: 2-3 NRTI (n=21); NRTIs + NNRTI (n=14), ou NRTIs +IPs (n=38)
- Recherche de 3 mutations: K103N, M1384V dans la RT et L90M dans la Protéase, lorsqu'elles étaient absentes en séquençage et pouvaient avoir un impact sur le traitement
- Détection chez 21/73 (29%) des patients
- K103N: détectée chez 3/15 (20%) patients (de 2,5% à 7,1% de la population globale)
- M184V: détectée chez 19/77 (25%) patients (de 1,3% à 23,5% de la population globale)
- L90M: détectée chez 0/41 patients

# Absence d'influence des variants résistants minoritaires sur l'évolution viro-immunologique sous traitement



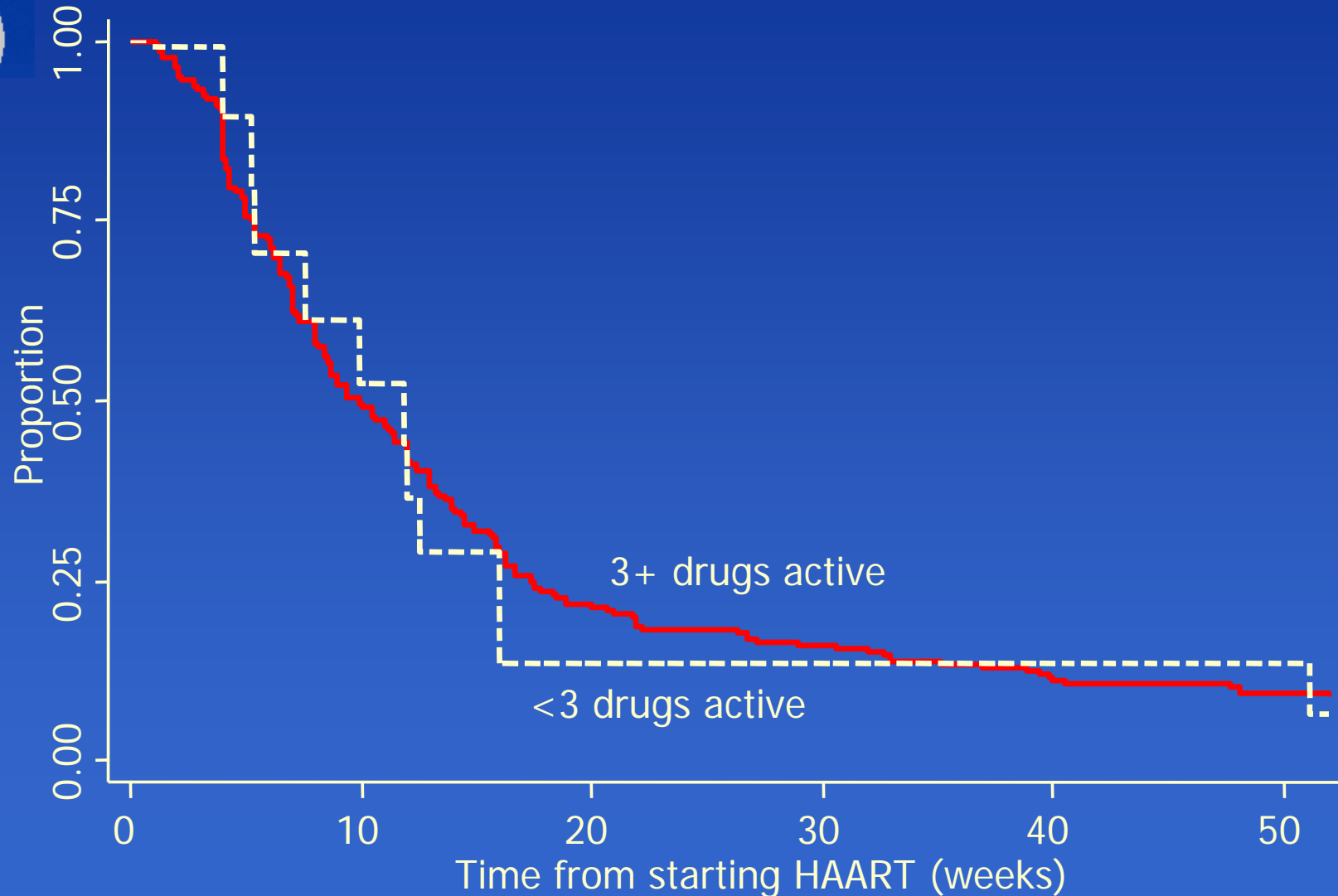
- Tendance vers des taux de CD4 de base plus élevés chez les patients avec des variants résistants minoritaires

## Discussion

- Nous avons montré que la réponse virologique pouvait être influencée, en utilisant un modèle sensible, par la transmission de variants résistants majoritaires chez des patients récemment infectés
- Cela confirme des données obtenues en primo-infection (*Chaix et al, XIV IHDRW*) et justifie le génotypage avant traitement
- Cependant, l'augmentation des CD4 était la même en présence de virus S et R, même si les taux de base étaient plus hauts avec les virus mutés (effet de la diminution de CR)



# Proportion with HIV RNA >500 copies/ml according to whether transmitted drug resistant HIV affected the number of active drugs in their HAART regimen



## Discussion (2)

- Nous avons pu détecter des variants minoritaires représentant de 0,5 à 20% de la population totale dans une proportion importante de patients
- Ces variants minoritaires *n'ont pas influencé* la réponse initiale au traitement;

## Discussion (3)

- La mutation la + fréquemment retrouvée parmi les variants minoritaires dans notre étude, M184V, a un impact majeur sur la CR virale, et ceci pourrait contrebalancer la diminution de sensibilité aux molécules
- D'autres données incluant d'autres mutations et un suivi plus long sont nécessaires pour évaluer la signification clinique des variants minoritaires
- Autres données??

# **Prevalence of Minority Quasispecies of Drug-Resistant HIV-1 in Patients with Primary HIV-1 Infection in Zurich in the Years 2002-2006**

**KJ Metzner, P Rauch, V von Wyl, H Kuster, H-J Stellbrink, J Böni, A Trkola, R Weber, and HF Günthard**

## Detection of the K103N and/or M184V mutation in patients with primary HIV-1 infection : Selective PCR

patient #	date [month/year]	viral load [HIV-1 RNA copies/ml plasma]	K103N mean $\pm$ SD	M184V mean $\pm$ SD	genotype [population sequencing]
10	12/02	11000	<d.l.	2.4 $\pm$ 1.1%	K103, M184
17	04/03	3560	<d.l.	1.0 $\pm$ 0.1%	K103, M184
18	04/03	55200	<d.l.	1.3 $\pm$ 0.1%	K103, M184
20	09/03	6040	0.91 $\pm$ 0.24%	1.0 $\pm$ 0.0%	K103, M184
24	11/03	1550	<d.l.	2.1 $\pm$ 0.2%	K103, M184
26	12/03	3620000	0.1 $\pm$ 0.02%	<d.l.	K103, M184
28	05/04	3335000	<d.l.	0.4 $\pm$ 0.0%	K103, M184
30	06/04	226000	0.83 $\pm$ 0.30%	8.3 $\pm$ 2.2%	K103, M184
32	06/04	87300	<d.l.	0.4 $\pm$ 0.0%	K103, M184
45	01/05	51100	<d.l.	0.4 $\pm$ 0.0%	K103, M184
53	09/05	2220000	3.76 $\pm$ 0.79%	<d.l.	K103, M184
55	09/05	60900	<d.l.	2.1 $\pm$ 1.0%	K103, M184
69	05/06	930000	<d.l.	0.4 $\pm$ 0.1%	K103, M184

74 pts en primo infection  
détECTION  
K103N : 4/74 pts (5.4%)  
M184V : 11/74 pts (14.9%)

Prévalence résistance  
17.9% (13/74) pts

*KJ Metzner XVI HDRW, Barbados 2007, abstract 40*

# CONCLUSIONS

- **The prevalence of minority quasispecies of K103N and M184V variants is high in patients with PHI from Zurich, thus, the transmission rate of drug-resistant viruses is probably underestimated based on population sequencing.**
- **However, detection of minority quasispecies of drug-resistant HIV-1 was not associated with therapeutic failure in those patients (9/13 boosted PI) within 0.8 to 4 years.**

## **The K65R Mutation is Rarely Detected as a Minority Quasispecies in Therapy-Naïve, Chronically HIV-1 Infected Persons**

- **194 pts recevant TDF + FTC en première ligne**
- **Génotype RT standard sauvage à baseline**
- **Détection K65R à baseline par PCR sélective**
  - **chez 4/194 (2.1%) pts**
  - **représentant 0.8%, 2.1%, 15.4% et 21.4% des génomes viraux plasmatiques respectivement**
- **Impact sur la réponse virologique à S24 chez ces 4pts?**
  - **3 pts en succès virologique (CV<40c/ml) à S24 sous TDF/FTC**
  - **1 pt en échec (non compliant)**

# CONCLUSIONS

- **The K65R mutation is very uncommon in therapy-naïve, chronically infected patients.**
- **The prevalence of the K65R mutation as a minority quasispecies before ART seems not to be associated with virological therapy failure in patients initiating ART with Truvada and a third agent.**

## Pour la prédictivité:

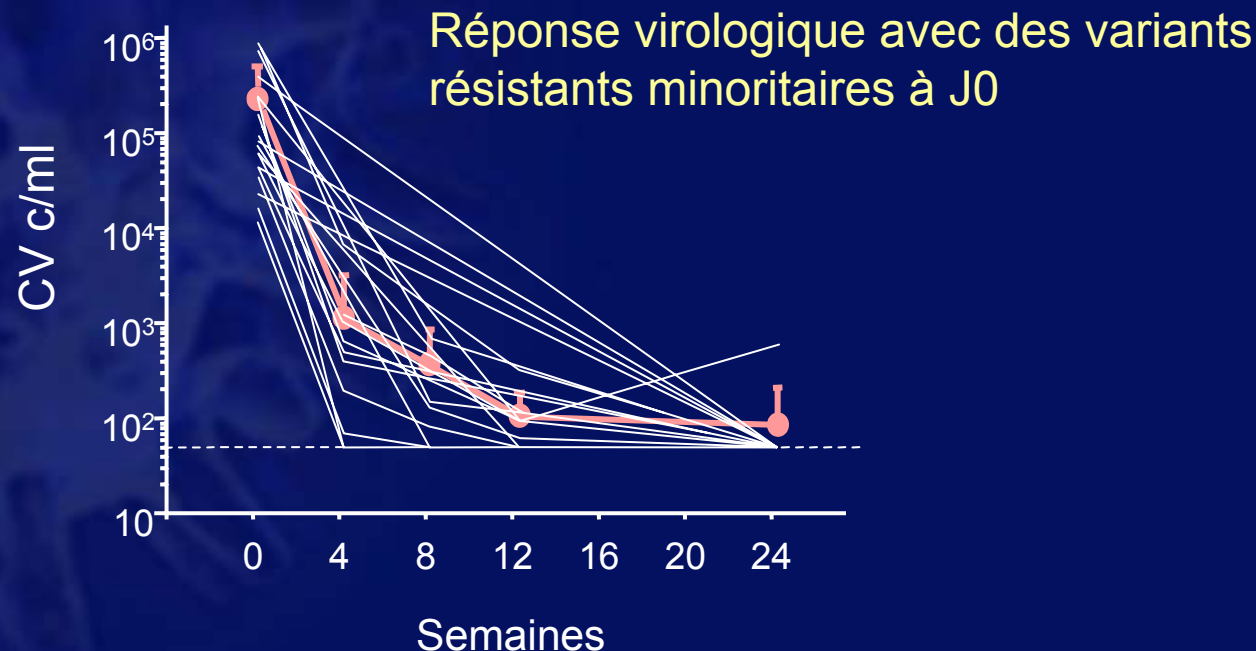
Mutation	Test standard	Test ultrasensible	Variation
L90M	8 %	11 %	+25 %
M41L	9 %	17 %	+70 %
K70R	9 %	14 %	+60 %
K103N	19 %	20 %	+5 %
Y181C	3 %	8 %	+260 %
M184V	8 %	10 %	+23 %
T215Y	17 %	20 %	+20 %
T215F	2 %	7 %	+340 %

Augmentation de la prédictivité du génotype sur la réponse virologique à un traitement de première ligne par EFV+ 3TC + AZT ou ABC

Johnson et al, CROI 2007, abstr 69 et 639

## Détection de variants minoritaires : signification clinique (1)

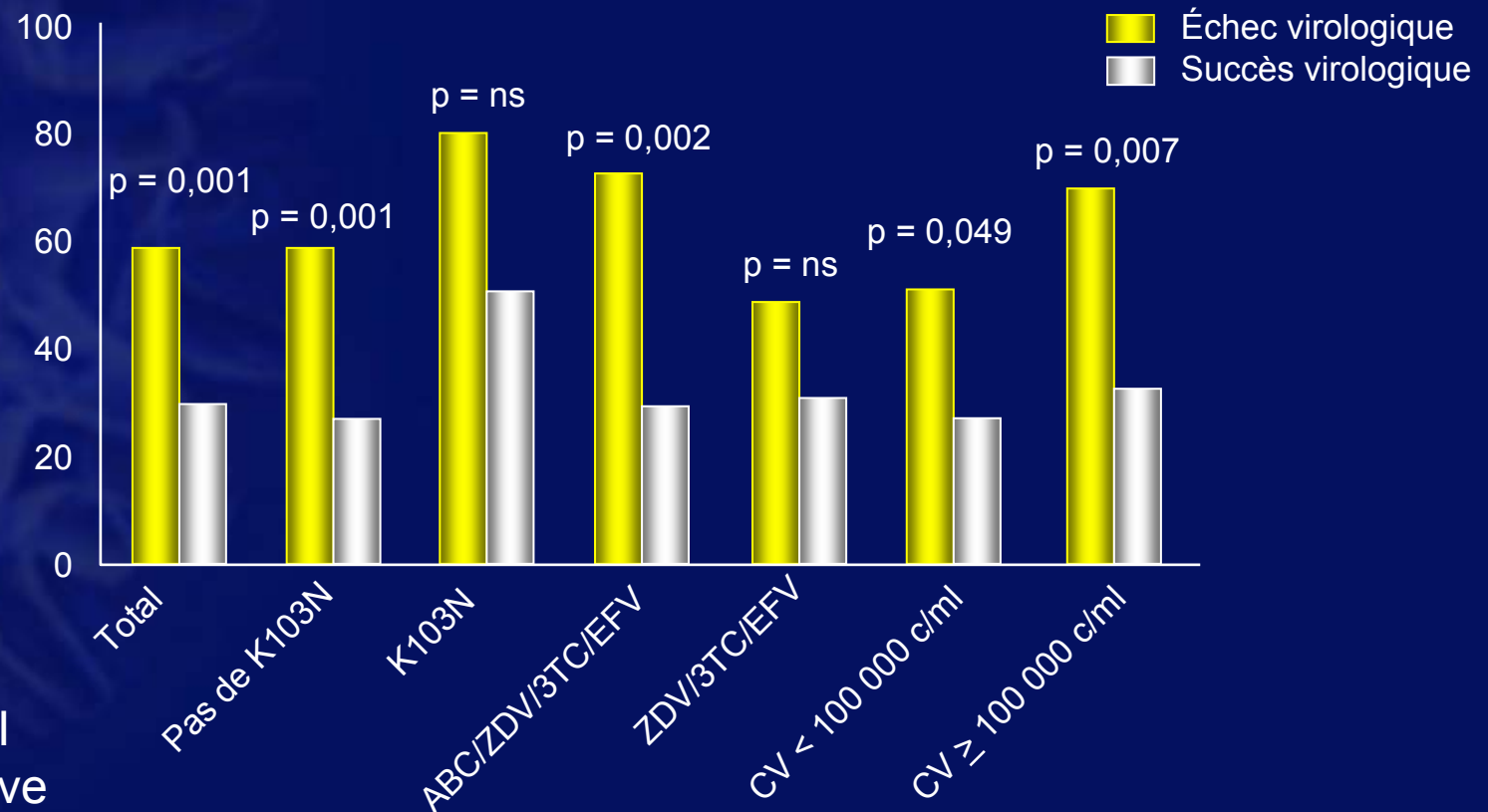
- Dans l'étude FIRST <sup>(1)</sup>, la détection des variants minoritaires par séquençage ultra sensible était prédictive de la réponse à un traitement initial
- En revanche, une autre étude <sup>(2)</sup> ne trouve pas de valeur prédictive à la détection de mutations minoritaires par PCR spécifique d'allèle avant un premier traitement ARV par TVD + IP/r ou INNTI



## Détection de variants minoritaires : signification clinique (2)

- Dans cette étude (ACTG 5095), la prévalence des mutants minoritaires Y181C est prédictive de la réponse virologique à un premier traitement par EFV

### Patients avec Y181C minoritaire (%)



Détection des mutations INNTI par PCR sélective

# Questions

- **Signification clinique à long terme des variants résistants minoritaires: nécessité d'études de cohortes plus importantes**
- **Accessibilité des techniques: évolution en cours**
- **Autres applications à prévoir; ex: prédiction du tropisme**

❖ **Laboratoire de Virologie CHU  
de Bordeaux**  
**/EA 2968 Université Bordeaux 2**

Bernard Masquelier  
Olivia Peuchant  
Patricia Pinson-Recordon  
Daniel Da Silva  
Guerric Anies  
Hervé JA Fleury

❖ **Laboratoire d'Immunologie, CHU  
de Bordeaux**  
Jean-Luc Taupin

❖ **Département de Maladies  
Infectieuses, CHU de  
Bordeaux**

Didier Neau  
Jean-Marie Ragnaud  
Philippe Morlat  
JL Pellegrin

❖ **INSERM U793, Université  
Bordeaux 2**

Rodolphe Thiébaud  
François Dabis

❖ **Cohorte Aquitaine**  
**ANRS CO3**



# Groupe Résistance ANRS AC11

## Coordination:

**B Masquelier**  
**V Calvez**

**ML Chaix**

**D Descamps**

**C Delaugerre**

**J Izopet**

**AG Marcelin**

**L Morand-Joubert**

**JC Plantier**

**A Ruffault**

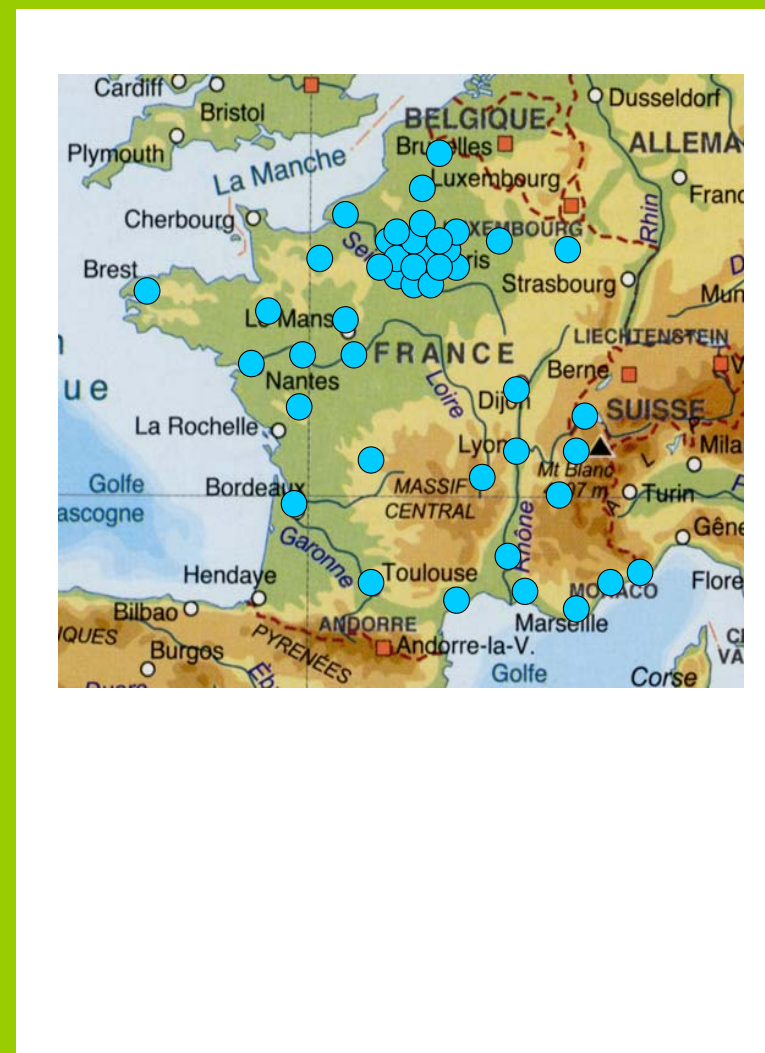
**C Tamalet**

**S Yerly**

**G Peytavin**

**P Flandre**

**D Costagliola**



# Sensitive Testing Demonstrates a High Prevalence of Transmitted Drug Resistance among Conventionally Genotyped Wildtype HIV-1 Infections

Jeffrey A. Johnson\*, Jin-Fen Li, Xierong Wei, Jonathan Lipscomb, Amanda Smith, and Walid Heneine  
Laboratory Branch, CDC, USA



## Clinical Samples from Newly-diagnosed Persons

- Study samples were from a cohort of 586 naïve persons collected in the US (LA and Chicago) between 2003-2005
- 20% had genotyped drug resistance mutations
- **205 *wildtype*** virus samples genotyped by conventional bulk sequencing (43% recent infection < 6 months)

# Real-time PCR Resistance Screening

34/205 (17%) wildtype virus samples had  $\geq 1$  mutation

	# Samples	Frequency
<b>L90M</b>	<b>7</b>	<b>3.5%</b>
<b>M41L</b>	<b>9</b>	<b>4.5%</b>
<b>K70R</b>	<b>10</b>	<b>5%</b>
<b>K103N</b>	<b>8</b>	<b>4%</b>
<b>Y181C</b>	<b>3</b>	<b>1.5%</b>
<b>M184V</b>	<b>2</b>	<b>1%</b>
<b>T215Y*</b>	<b>1</b>	<b>0.5%</b>
<b>T215F*</b>	<b>4</b>	<b>2%</b>

Low frequency mutations equally found in recently-infected persons (17%) and longer duration Infections (17%)



\*may include intermediates D, N, H, L, I or V

JA Johnson XVI HDRW, Barbados 2007, abstract 39

## CONCLUSIONS

- **The findings revealed previously-undetected mutations, including multi-drug resistance, in drug-naïve persons documented to have wildtype virus infections**
- **These findings confirm that conventional bulk sequencing underestimates transmitted drug resistance and underscores the importance of sensitive drug resistance testing**
- **These findings showed an increase of the prevalence of transmitted drug resistance in this cohort from 20% to 33% (+65%)**