



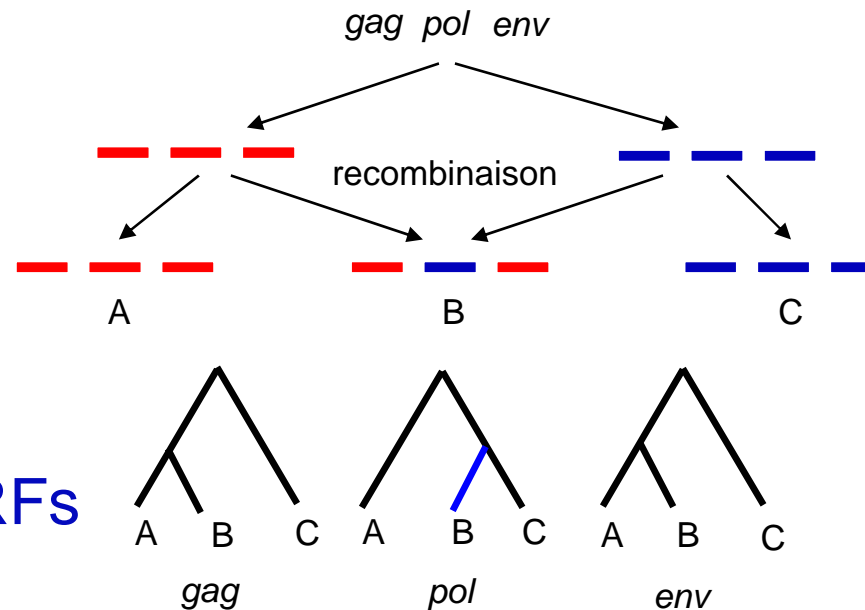
**Diversité génétique du VIH-1 et étude
des co-infections entre sous-type/CRF
dans une population de MSM au
Sénégal**

**Sous-étude de l'étude ANRS 11139
ELIHIOS**

Variabilité génétique du VIH-1

- Réplication virale élevée: 10^{10} virions/jour
- Fort taux de mutations: 1 substitution/génome/cycle
- Recombinaison élevée: 7 à 30 échanges/génome/cycle
- **Double infection**

↓
recombinant (s)
inter sous-types/CRFs



Problématique

- **MSM: groupe peu étudié avant 2000**
 - **Existence** d'une communauté homosexuelle en 2000
 - **Groupe vulnérable**
 - **Prévalence VIH**
 - **MSM : 22.4% en 2004 et 21.8% en 2007**
 - **TS: 20- 30%**
 - **Population générale: 0.7%**

Problématique

- **Diversité génétique**

- **Enquête de 2004**

- **40% de sous-type C dans gène *pol*** (*Diop-Ndiaye H, 2009*)

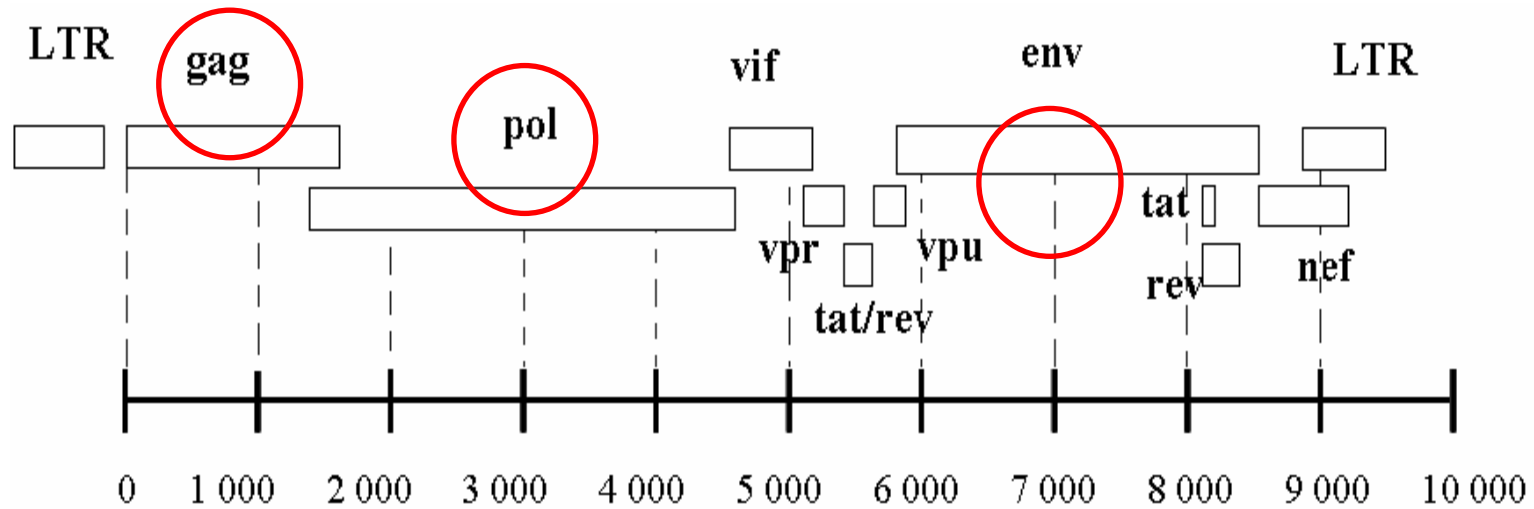
- **Population générale et TS**

- **70% CRF02_AG et 2,5% de C** (*Toure-Kane et al, 2000*)
- **64% CRF02_AG et 7% de C chez patients naïfs** (*Diop-Ndiaye H et al, 2010, in press*)
- **54% de CRF02_AG, 4% de C et ↗ A3, CRF09_cpx chez TS** (*Hamel et al, 2007*)

Objectifs

- Etudier la diversité génétique du VIH-1 chez les MSM au Sénégal au niveau de *gag, pol* et *env*
 - Etudier l'évolution de la diversité génétique au niveau du gène *pol*
- Documenter la prévalence des co-infections entre sous-types/CRFs par utilisation de la technique de MHA

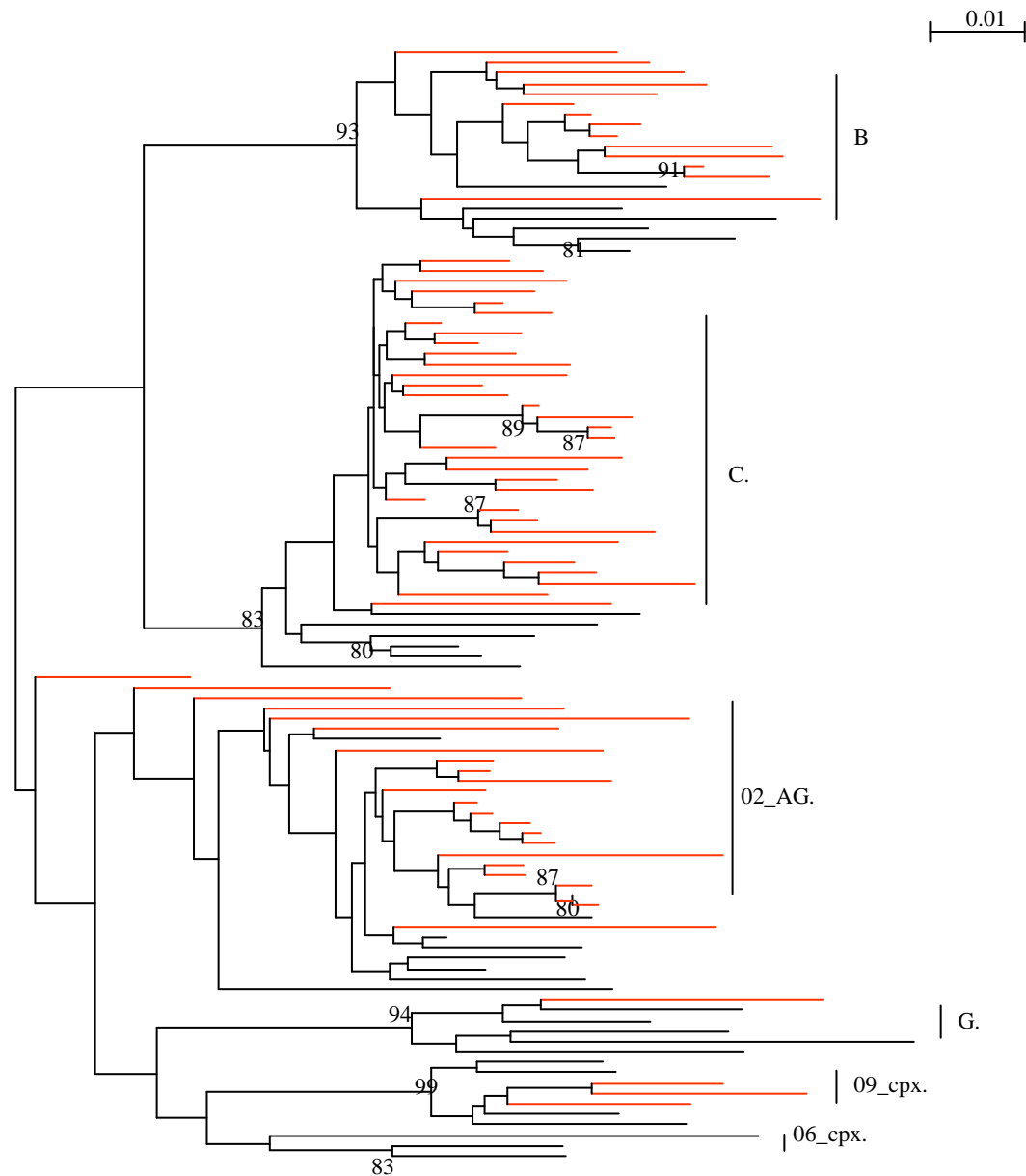
Diversité génétique



Méthodologie

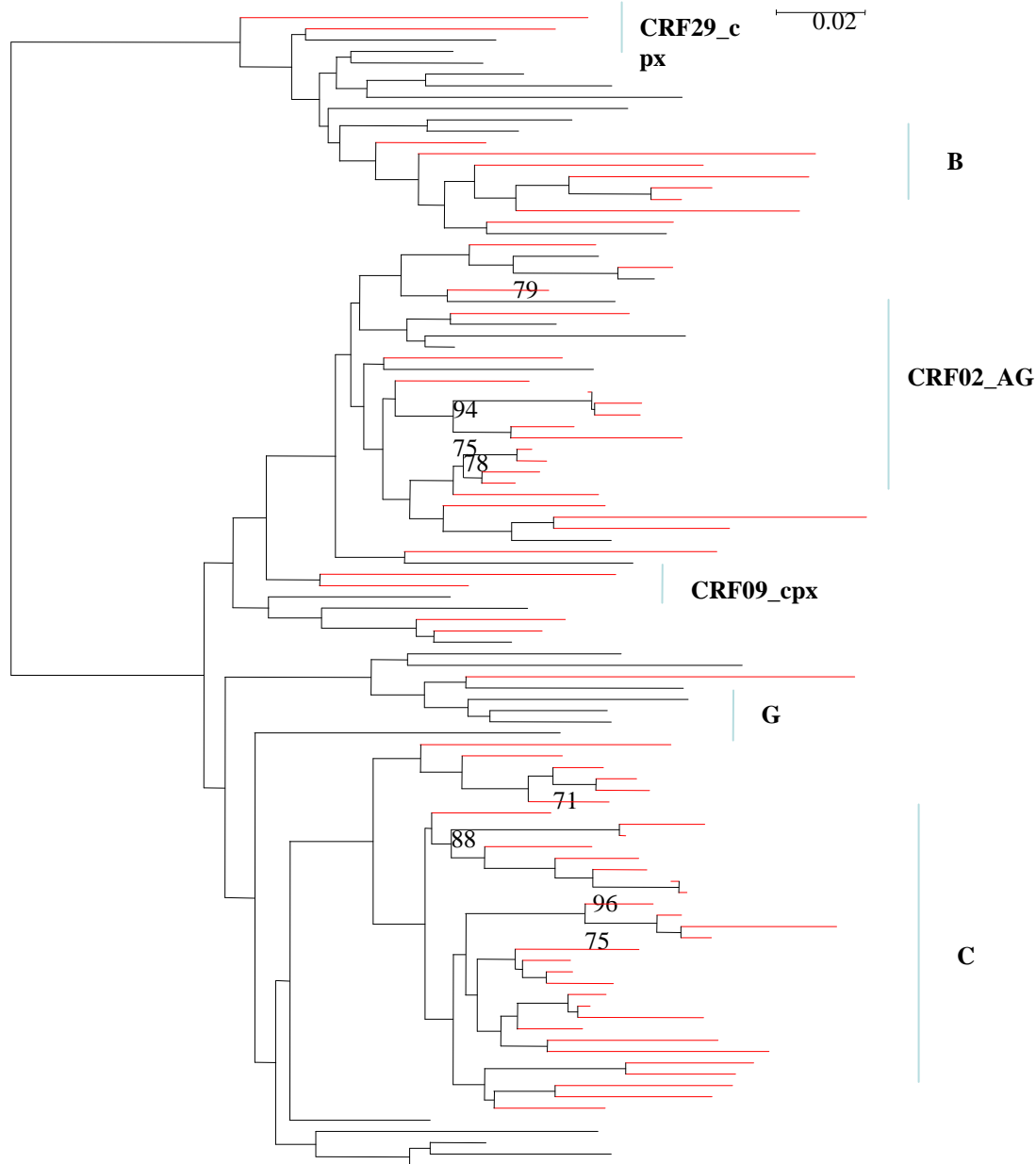
- **PBMC de MSM VIH-1 recrutés en 2007**
 - Extraction **ADN proviral** à partir PBMCs
 - Séquençage des gènes *gag*, *pol* et *env*
 - 78 amplifiés dans du gène *gag* (p24)
 - 60 amplifiés dans la région *pol* (Protéase-RT)
 - 69 dans la région V3-V5 du gène *env*
 - Analyse phylogénétique
 - Alignement avec Clustal X version 1.83 avec les représentants des différents sous-types et les CRF
 - **Recherche des recombinants** avec Simplot 2.6 pour fragments >1000pb (*pol*)
 - **Analyse de Clusters** sur PhyML 2.4.4 (*pol*)

Diversité gène *gag* (n=78)



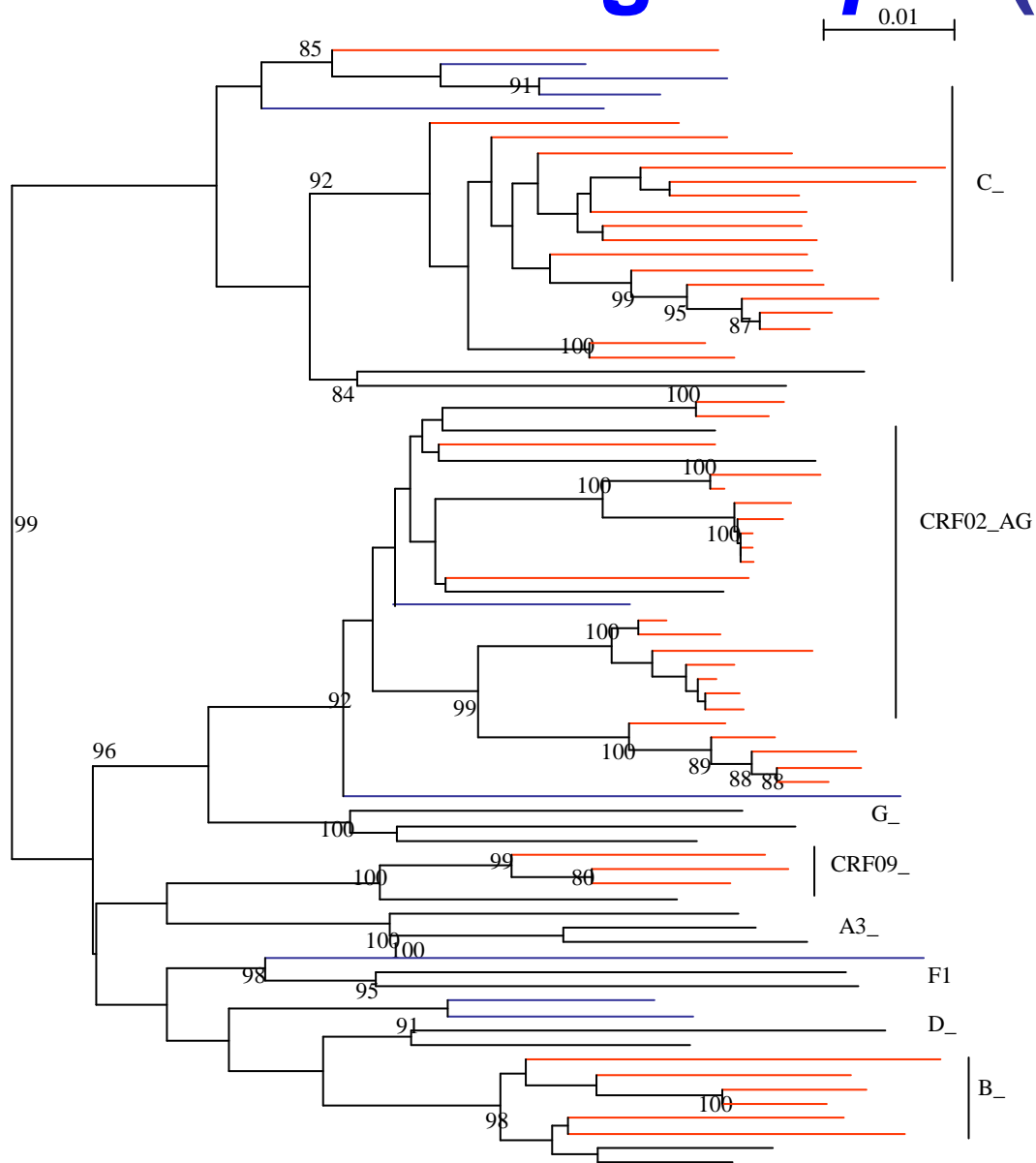
Sous-type	%
B	19,2
C	43,6
CRF02_AG	32,1
CRF09_cpx	3,85
G	1,3

Diversité gène *env* (n=69)



Sous-type	%
A	4,35%
B	13,04
C	50,7
CRF02_AG	26,1
CRF09_cpx	2,9
CRF29_cpx	1,45
G	1,45

Diversité gène *pol* (n=60)



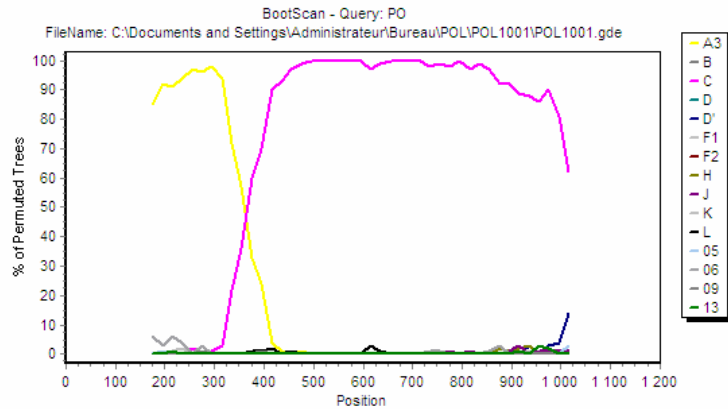
Sous-type	%
B	10
C	28,33
CRF02_AG	38.34
CRF09_cpx	3.33
URFs	20

• 12 (20%) URFs

- A3/C (n=3)
- 02/C (n=2)
- C/02 (n=1)
- 02/A3/02 (n=1)
- 02/A3/B (n=2)
- 09/U/09 (n=1)
- C/F1/D (n=1)
- 02/A3/02 /C (n=1)

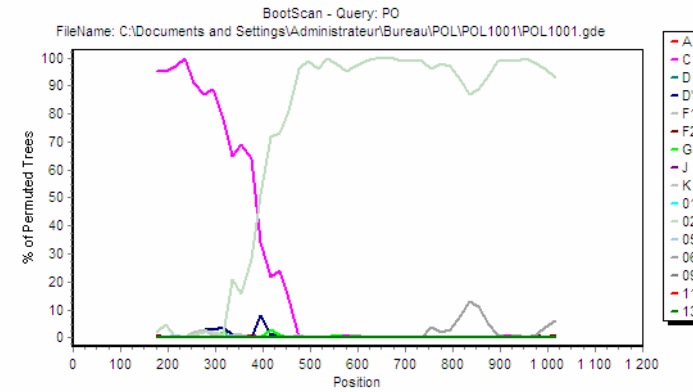
En rouge : séquence Sénégal En bleu: URFs

URFs dans *pol* (n=12)



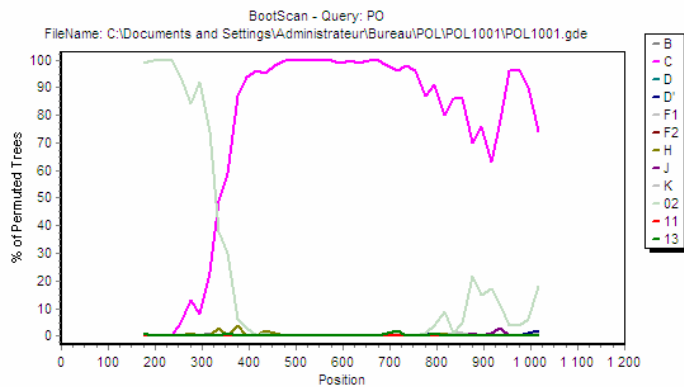
ndow: 350 bp, Step: 20 bp, GapStrip: On, Reps: 100, Kimura (2-parameter), T/t: 2.0, Neighbor-Joining

A3/C



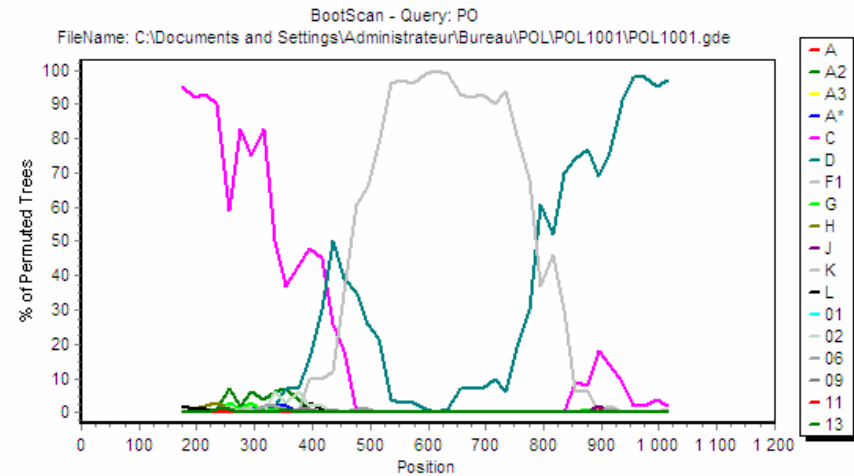
ndow: 350 bp, Step: 20 bp, GapStrip: On, Reps: 100, Kimura (2-parameter), T/t: 2.0, Neighbor-Joining

C/CRF02_AG



ndow: 350 bp, Step: 20 bp, GapStrip: On, Reps: 100, Kimura (2-parameter), T/t: 2.0, Neighbor-Joining

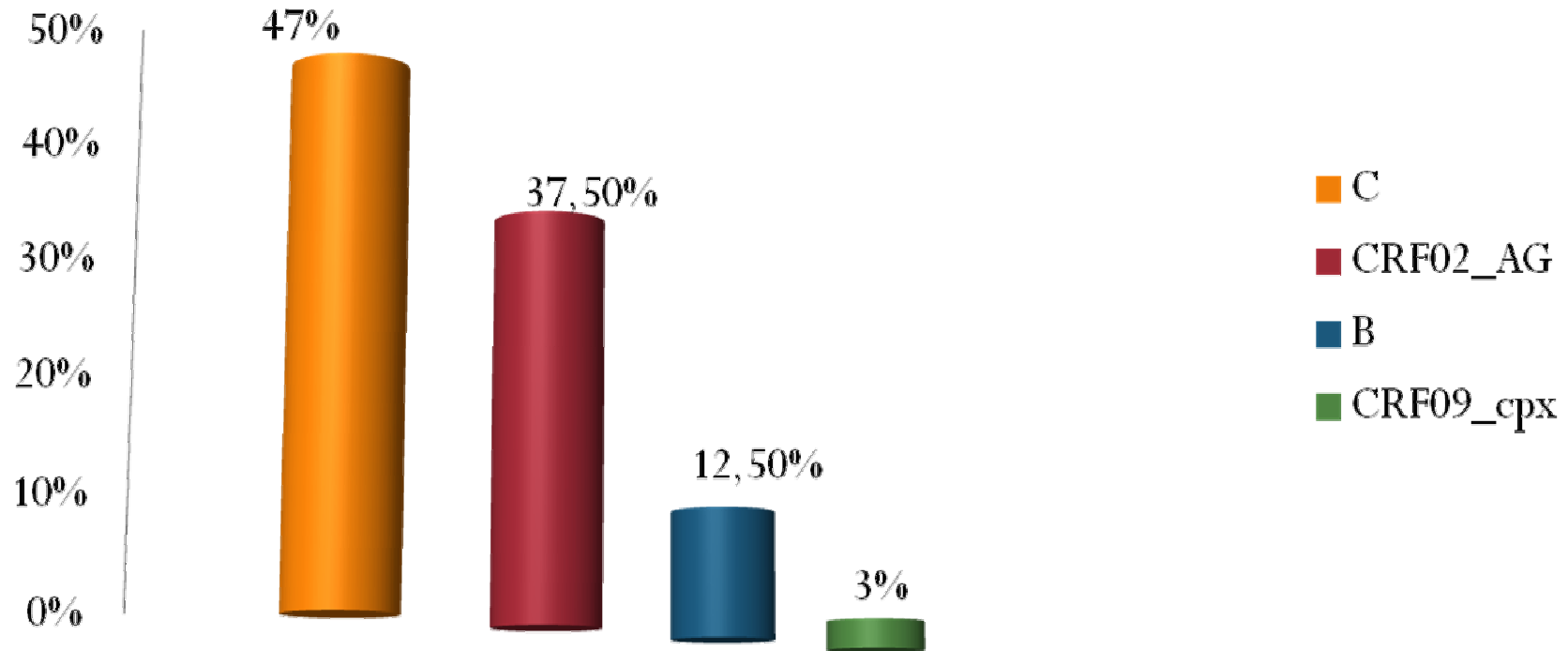
CRF02_AG/C



ndow: 350 bp, Step: 20 bp, GapStrip: On, Reps: 100, Kimura (2-parameter), T/t: 2.0, Neighbor-Joining

Recombinant (C/F1/D)

Diversité *gag/pol/env* (n=46)



32 (70%) concordants
et 14 (30%) discordants ou recombinants

Diversité *gag/pol/env* (n=46)

32 (70%) concordants et
14 (30%) discordants ou URFs

N	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>env</i>
1	B	B	CRF29
1	B	CRF02/A3/B	B
2	C	CRF02/C	C
2	C	A3/C	C
1	C	C/F1/D	C
1	C	CRF02/A3/CRF02/C	C
1	CRF02	CRF02	C
2	CRF02	CRF02	A
1	CRF02	C/CRF02	CRF02
1	CRF09	CRF09	CRF02
1	CRF09	CRF09	A

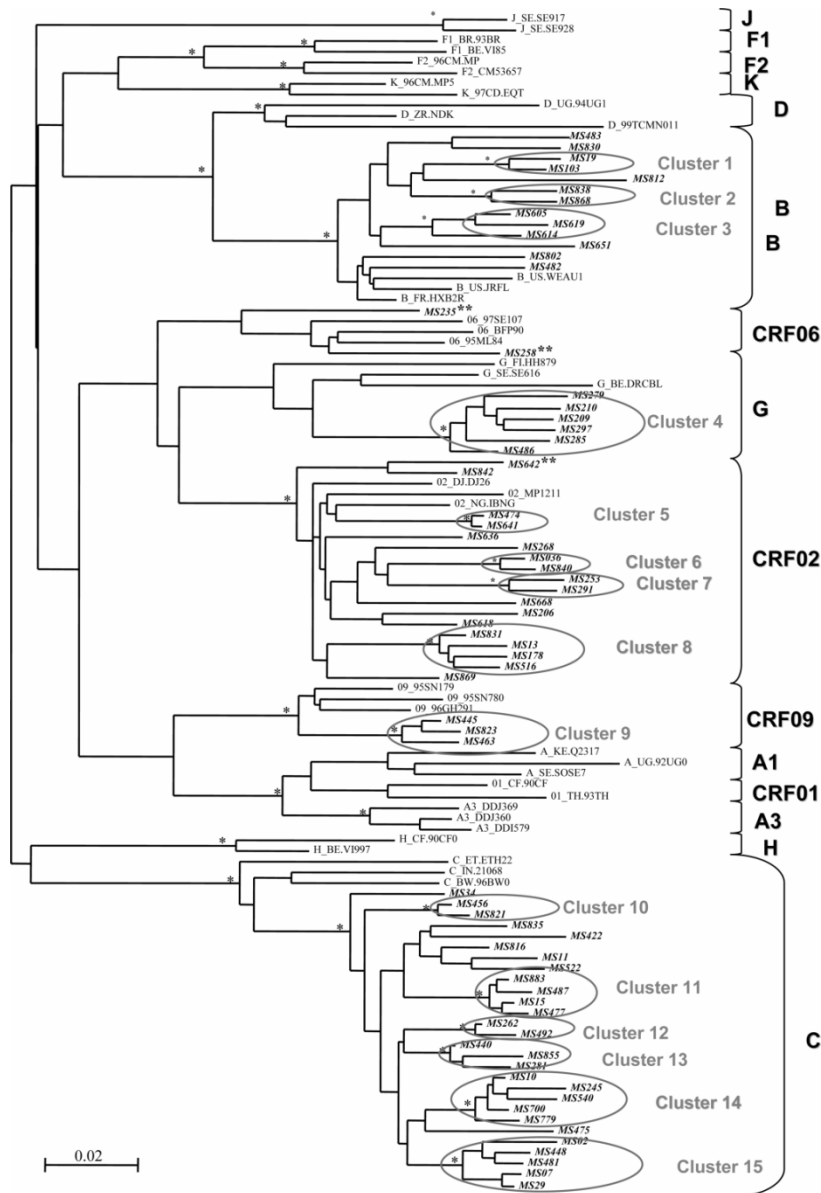
Diversité génétique

Evolution au niveau de *pol*

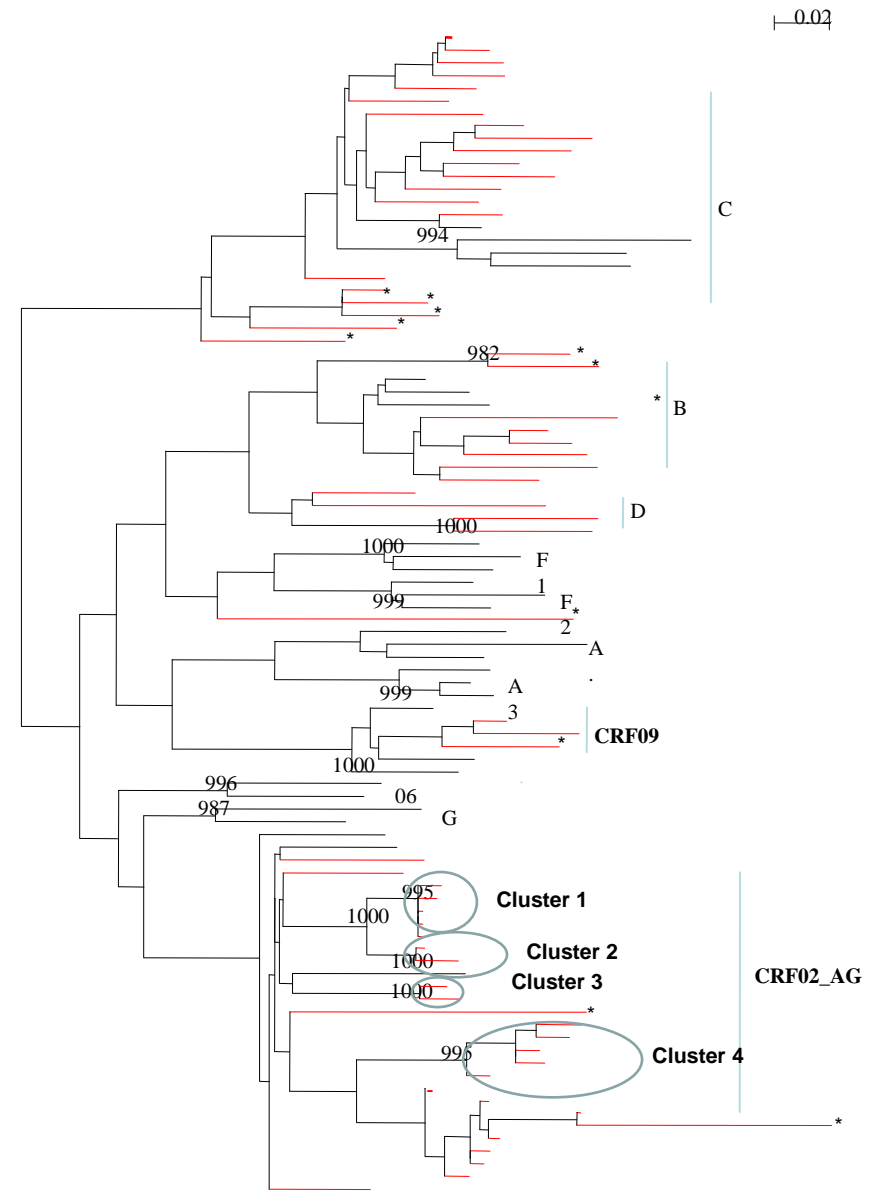
70 MSM en 2004 (<i>JAIDS 2009</i>)	60 MSM 2007
	CRF02/A3/B (2)
	A3/C (3)
G/CRF02 (1)	C/CRF02 (1)
CRF02/CRF06/CRF09 (1)	CRF02/C (2)
CRF02/CRF06/CRF02/CRF06 (1)	CRF02/A3/CRF02 (1)
	CRF09/U/CRF09 (1)
	CRF02/A3/CRF02/C (1)
	C/F1/D (1)
3 (4,3%)	12 (20%)

P= 0,0189 < 5%

Clusters de transmission



Enquête 2004 (JAIDS, 2009)



Enquête 2007

Détection des co-infections

Détection des doubles infections

- **Séquençage:**
 - Identification du variant majoritaire
 - Détection des doubles infections après clonage et séquençage

==> nécessité d'un nombre important de clones
- **Multi-Hybridization Assay (MHA)**
 - Sondes fluorescentes variant-spécifiques
 - PCR TR: sensibilité de détection (>1/1000)
fort rendement de collecte de données
 - Possibilité de détection de virus recombinants
car plusieurs régions du génome

Principe de la MHA

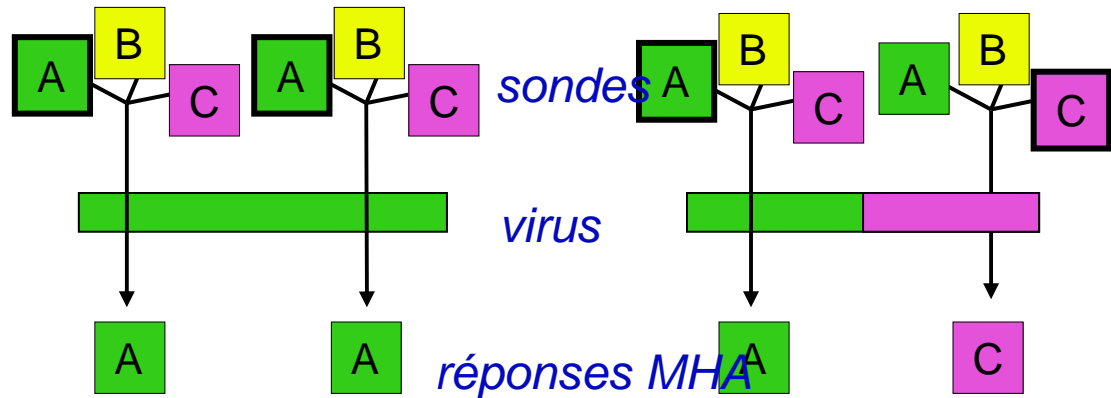
Ex: pour 2 régions du génomes et 3 variants VIH-1 (A, B, C)

Cas N°1:

Infection simple

- variant A pur
- ou

- recombinant A/C

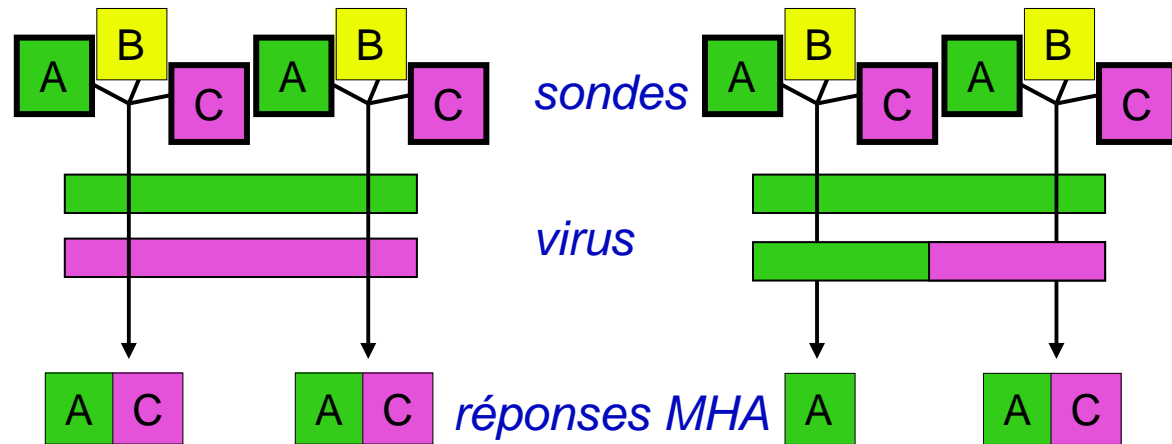


Cas N°2:

Double infection

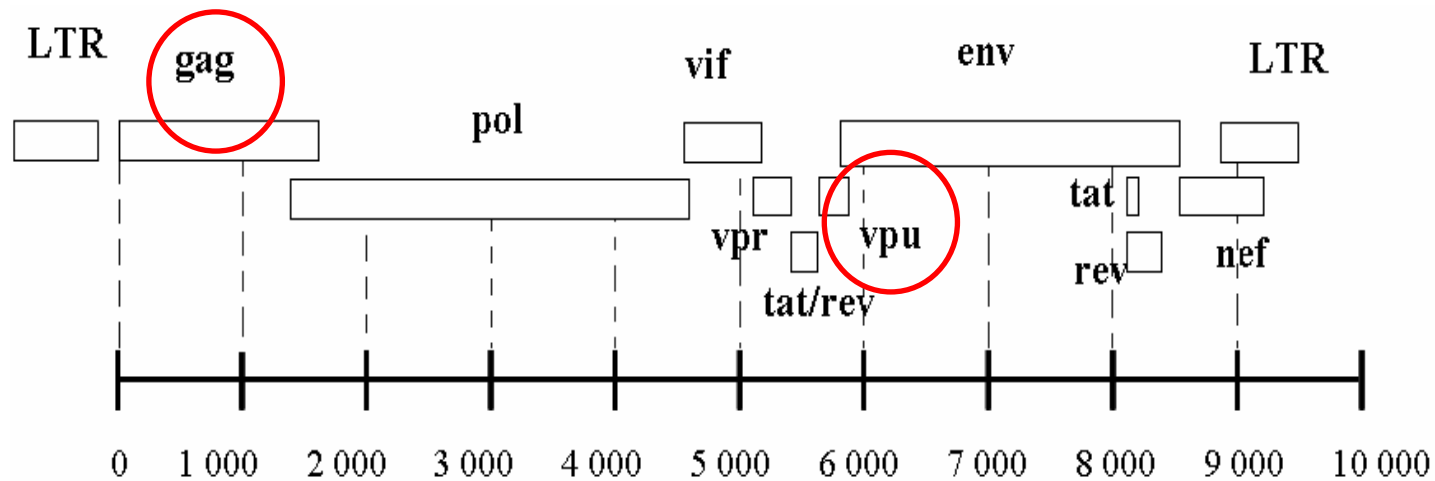
- variants A et C purs
- ou

- variant A pur et recombinant A/C



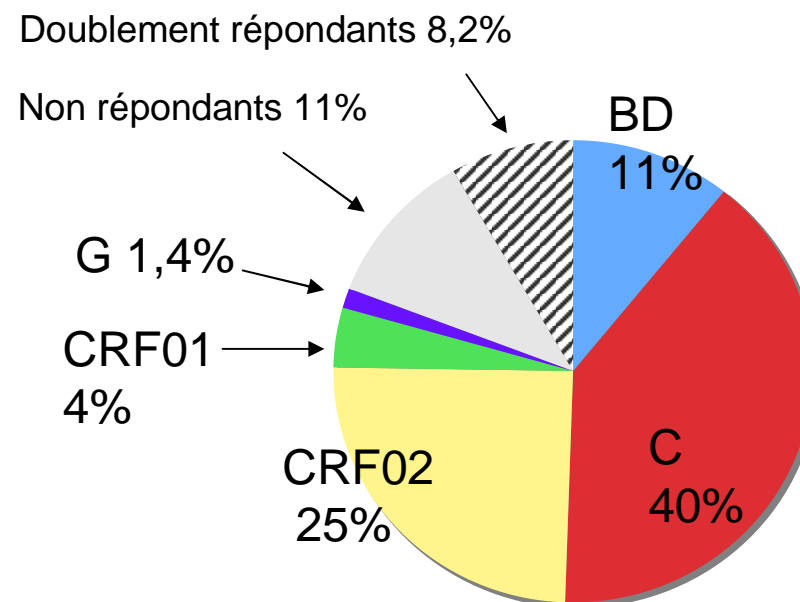
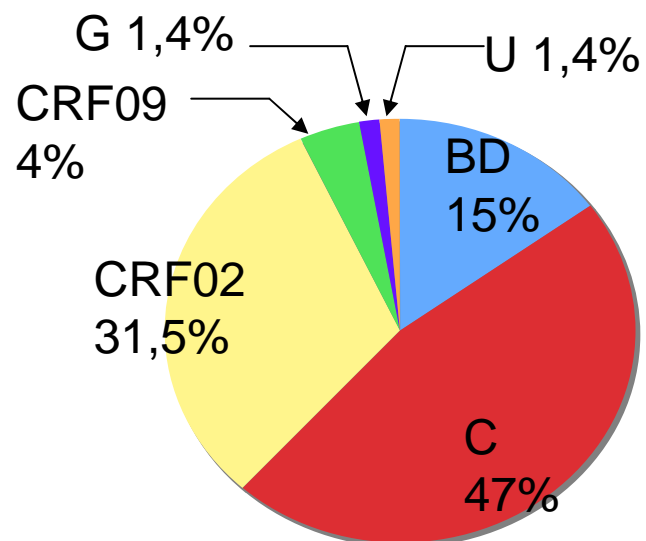
Méthodologie

- Étude rétrospective - 73 MSM VIH-1 – 2007
 - Extraction **ADN proviral** à partir PBMCs
 - Séquençage des **gènes vpu** (~210pb) et **gag** (~400pb)
 - Détection des doubles infections par MHA
 - 13 Sondes FAM-TAMRA en *vpu*
 - 13 Sondes Yakima-Yellow en *gag*



Résultats

Séquençage et MHA du gène *vpu*



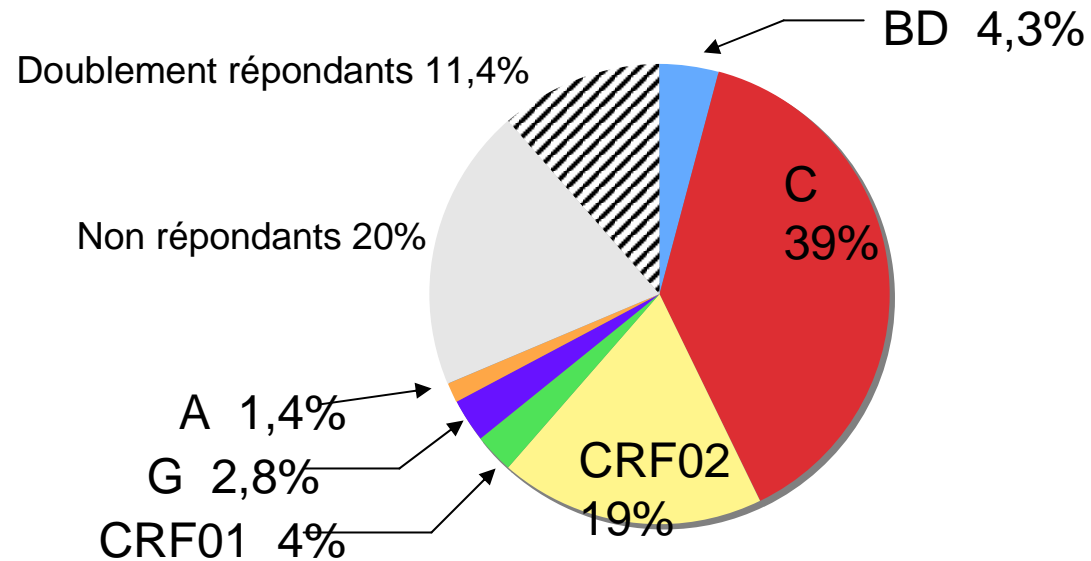
65/73 échantillons réactifs en MHA soit une **sensibilité globale de 89%**

Six doubles infections probables : prévalence (8.2%)

- 3 CRF02 + C (2 CRF02 et 1 C en séquençage)
- 3 C + BD (2 C et 1 BD en séquençage)

Résultats

Séquençage et MHA du gène gag













56/70 échantillons réactifs en MHA soit une sensibilité globale de **80%**

Huit doubles infections probables : prévalence 11,4%

- 2 CRF02+BD
- 2 CRF02+C
- 1 de chaque A+C, F+G, A+G, CRF02+G

Résultats

Exemples d'échantillons probablement doublement infectés

Echantillon	Séquence gag	Séquence vpu	Séquence pol	MHA gag	MHA vpu
1120	C	CRF02	CRF02	 	
1047	CRF02	CRF02	C	 	 
2005	CRF02	CRF02	B		 

Discussion

Diversité génétique

- **Enquête de 2004**
 - 40% de sous-type C dans gène *pol* (n=70) [Diop-Ndiaye et al, 2009]
 - 15 clusters de transmission, épidémie débutante, homogène
- **Enquête de 2007:**
 - Prédominance sous-type C (n=78)
 - *gag* (43.6%), *pol* (28.3%) et *env* (50.7%)
 - 4 clusters de transmission => Diffusion des souches
 - 20% de recombinants uniques => cas de co-infections

Diversité génétique

- **MSM - prédominance sous-type C**
 - **Prédominance du CRF02_AG dans la PG** (Kane C.T et *coll.*, 2000, Diop-Ndiaye H et *coll.*, 2010, in press) **et TS** (Hamel et *coll.*, 2007)
 - **Au Sénégal - 2 épidémies de VIH-1 - Notion de double épidémie**
 - En Afrique du Sud- B => MSM et C => PG [Van Harmelen J et *al.*, 1997].
 - En Argentine - B =>MSM et F => PG , [Avila MM et *al.*, 2002].
 - Au Chili - B => MSM et F => PG [Rios M et *al.*, 2005].

Co-infection

- **Sensibilité générale de MHA *vpu* 89% , *gag* 80%**

- Comparable aux sensibilités (N Vidal et *al.*, poster N°539, CASA 2010)

- **11 probables doubles infections (16%)**

- Des travaux similaires –

- Etude au Burkina Faso - HMA – *env* -147 prostituées - 2 cas de coinfection [Manigart O et *al.*, 2004]

- Tanzanie – 600 TS : 26 cas de doubles infections - MHA [Herbinger et *al.*, 2006], 19% chez FSWs en Tanzanie

- En Inde - IDUs - 20% doublement infectés - [Sarkar R et *al.*, 2009]

Conclusion

- Prédominance du sous-type C
- Identification de 11 doubles infections probables dans *vpu, gag*
- Epidémie plus ou moins homogène
 - avec un nombre limité de variants
 - Evolution très rapide avec URFs +++
 - Risques de nouveaux CRFs ???
- Risque de transfert vers population gle
- Renforcer les interventions auprès des MSM

Perspectives

- Appliquer la MHA dans la **région nef**
- Confirmer les cas de doubles infections par clonage
- Surveillance de l'épidémiologie moléculaire +++

Equipes participantes

- Equipe Sénégal
 - Coumba TOURE-KANE
 - Halimatou DIOP-NDIAYE
 - Edmond TCHIAKPE
 - Ousseynou Ndiaye
 - Nafissatou LEYE
 - Khady Kébé
 - Abdoulaye Sidibé WADE
 - Abdou Khoudia DIOP
 - Souleymane MBOUP
- Equipe France
 - IRD Montpellier
 - Nicole Vidal
 - Martine Peeters
 - Eric Delaporte
 - ANRS

Merci de votre attention