

Quantification de l'ADN VIH et contexte de simplification

Dr Véronique Avettand-Fenoel

Université Paris Descartes – EA7327

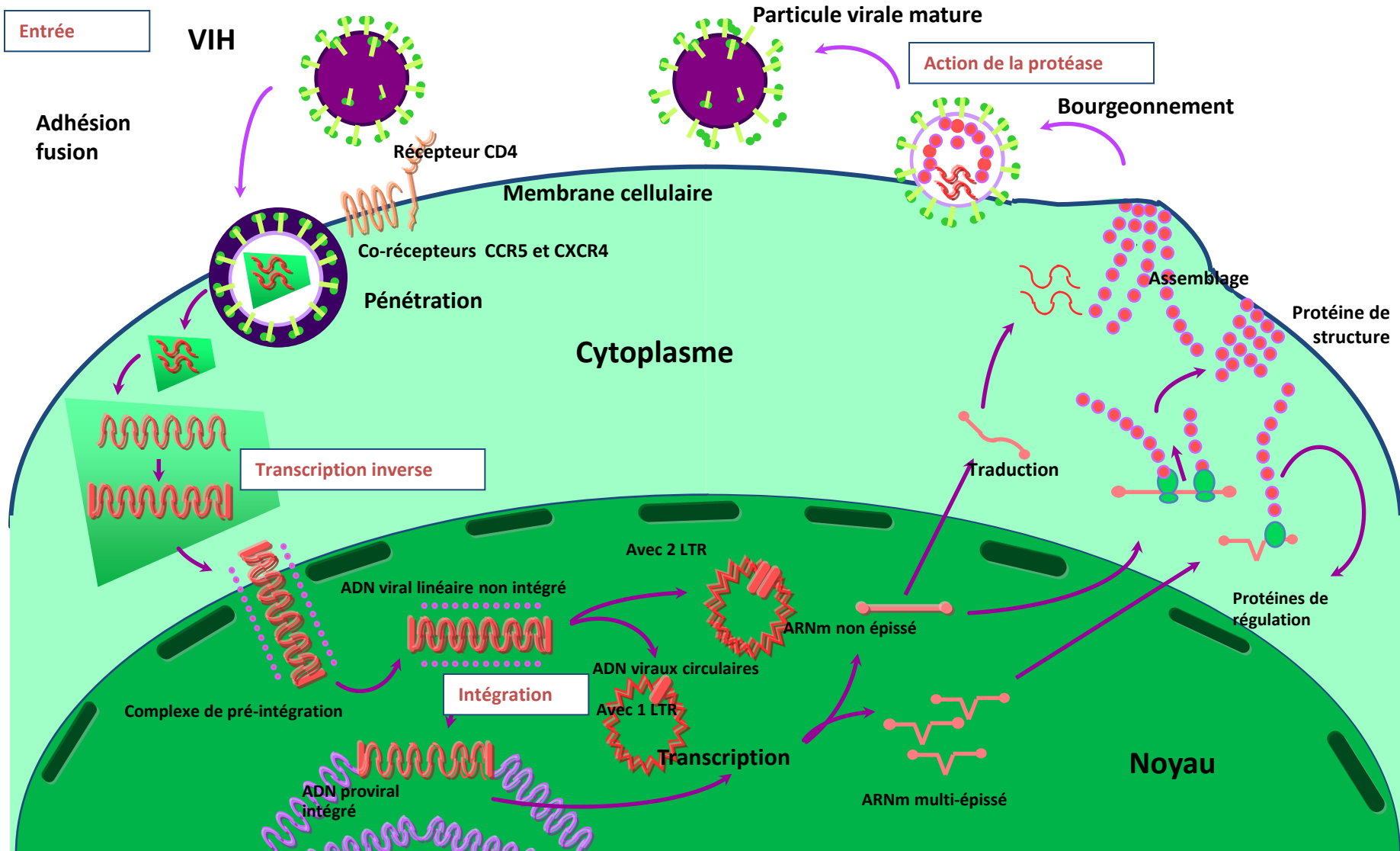
Hôpital Necker - Enfants Malades



Conflits d'intérêt

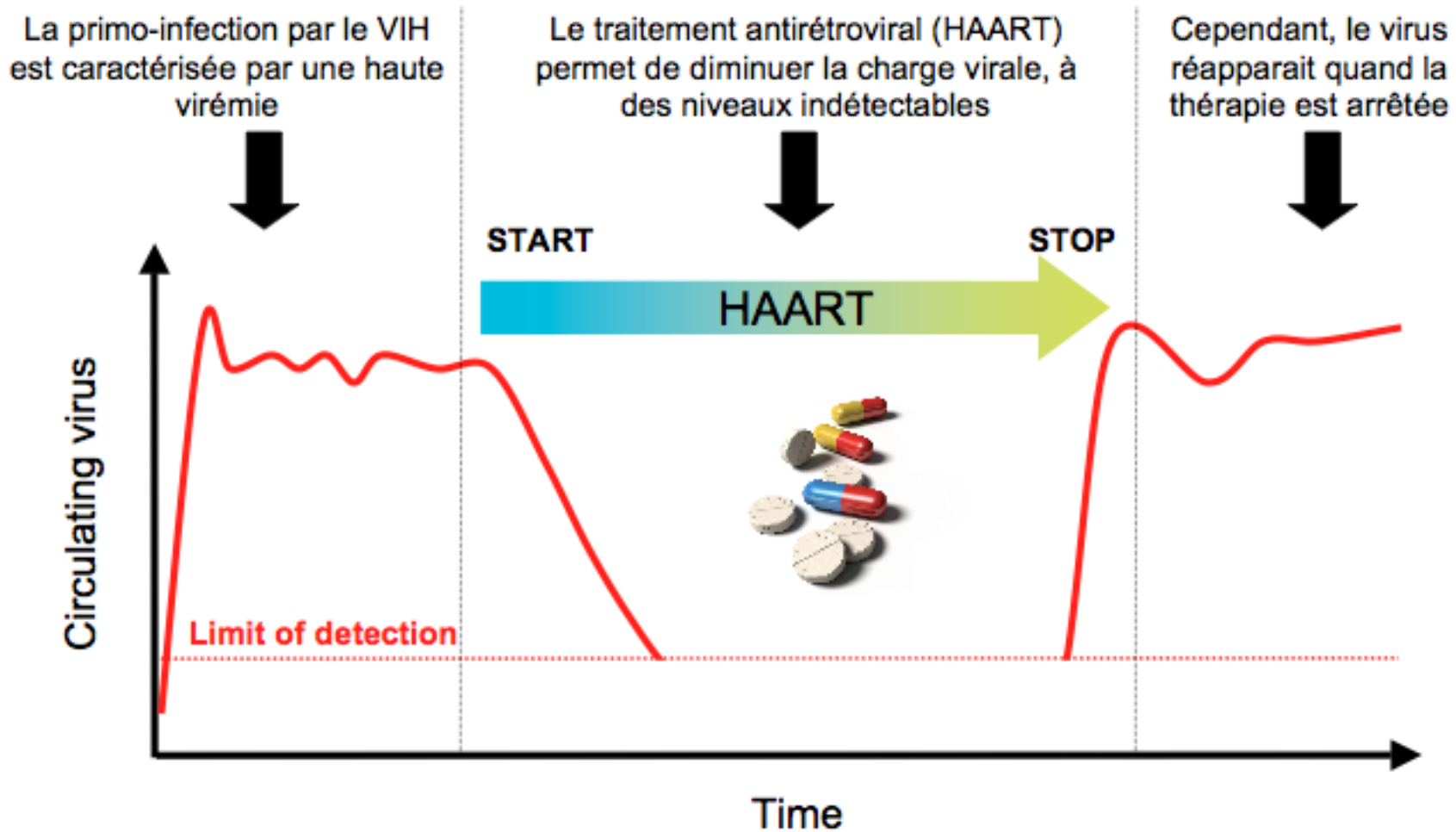
Orateur et Participation à des congrès :
ViiV, Janssen

ADN VIH au cours du cycle de réplication



LES RÉSERVOIRS VIH

Evidence clinique d'un réservoir pour le VIH



Le VIH "se cache" dans un réservoir qui n'est pas ciblé par les thérapies actuelles

Définition des réservoirs viraux

- Type cellulaire ou site anatomique dans lequel des formes virales compétentes pour la réplication s'accumulent et persistent avec une cinétique de renouvellement plus lente que celle des formes virales se répliquant activement.

Blankson et coll. 2002

Où ?

Cellules folliculaires
dendritiques, T follicular
helper (Tfh) des centres
germinatifs

**Lymph nodes
and thymus**

Blood

**Gut-associated
lymphoid tissue**

Cellules T4, macrophages

Progéniteurs
hématopoïétiques

Bone marrow

Brain

Cellules de la microglie,
astrocytes

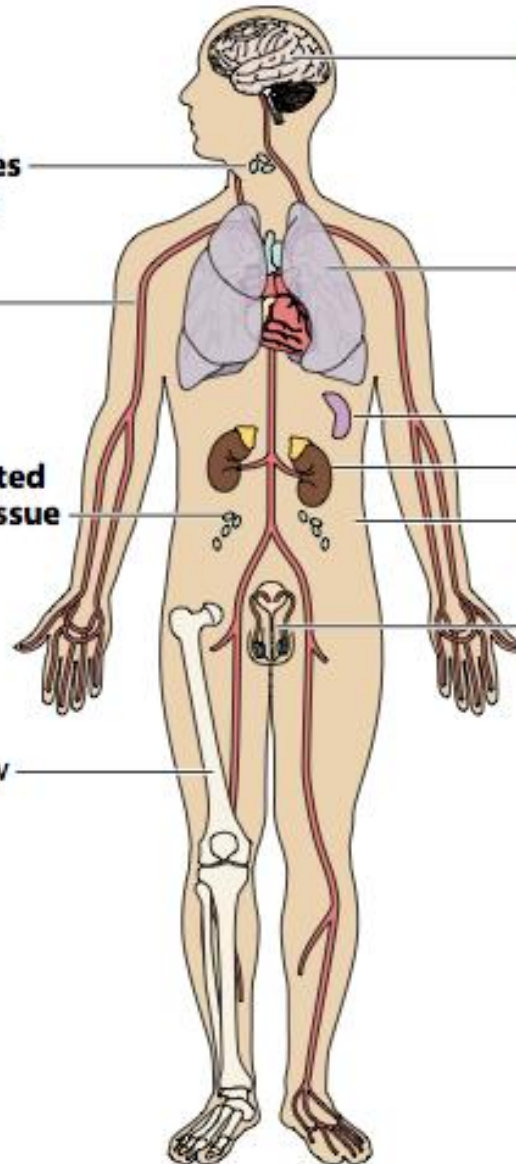
Lung

Spleen

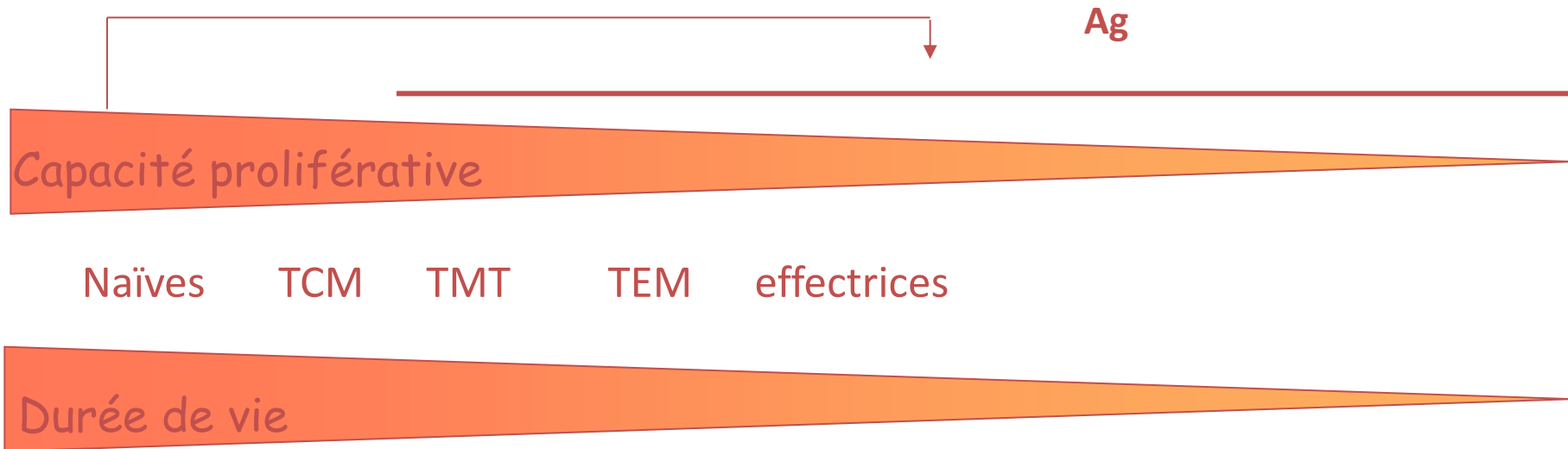
Kidney

Adipose
tissue

Genital tract
and fluids



Capacité proliférative et demi-vie des sous-populations lymphocytaires T CD4

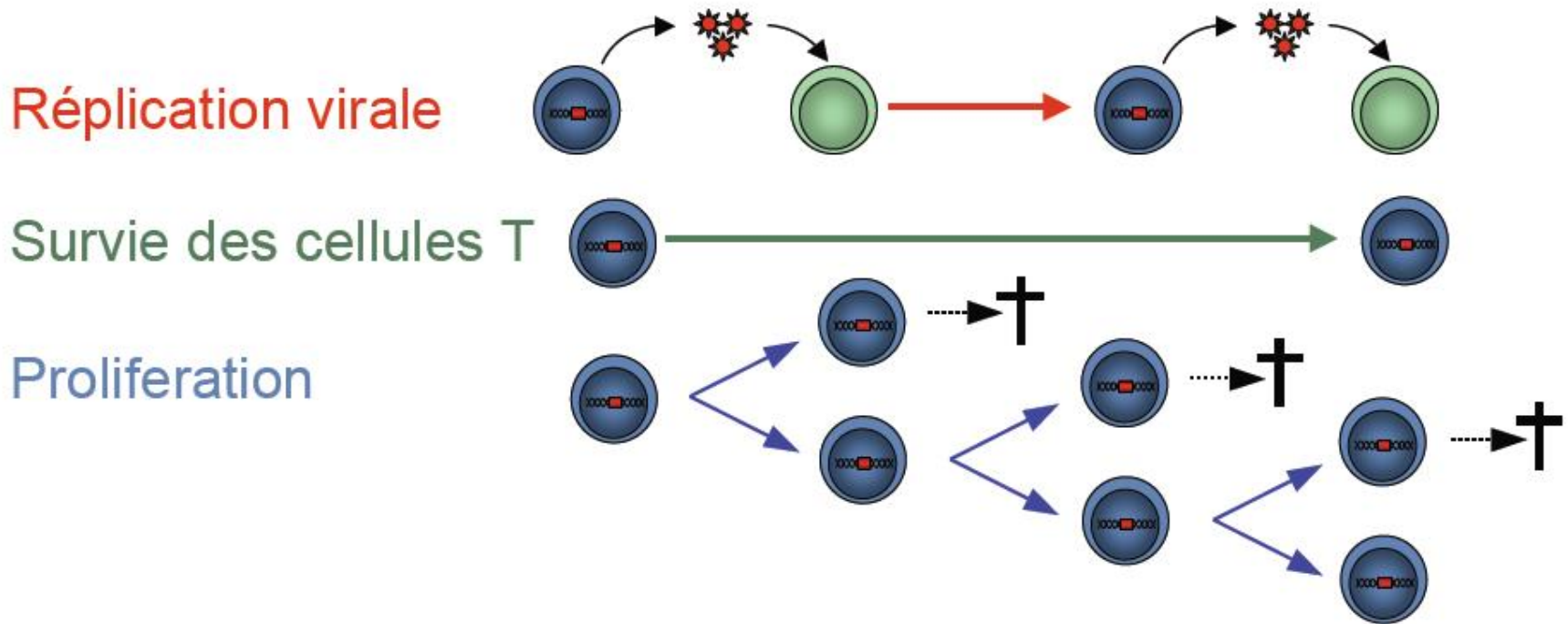


Durée de vie	10 ANS	6-12 mois 3-6 mois	3-6 mois ?	0,6-3 mois	8-15 jours
CXCR4	+	+	+	+	+
CCR5	+ faible	+	++	++	+++

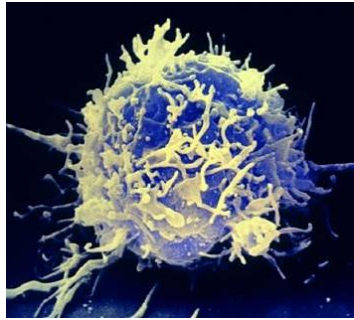
Monocytes : 1,5 semaines
Macrophages 3 mois

Victor Appay et al Cytometry, 2008

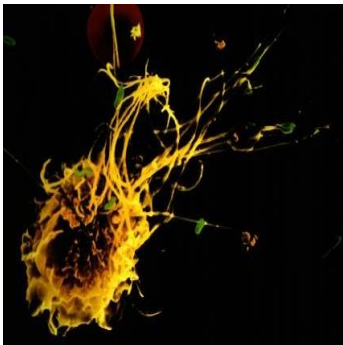
Mécanismes de persistance virale



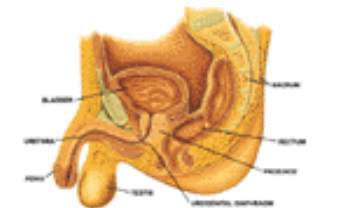
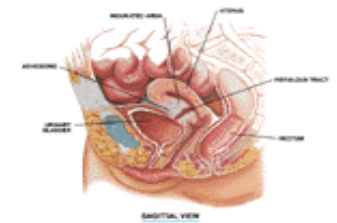
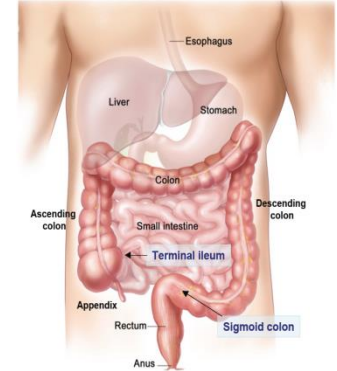
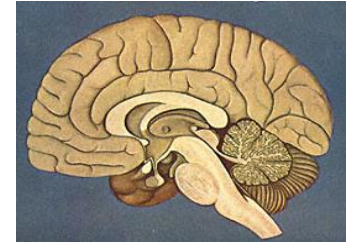
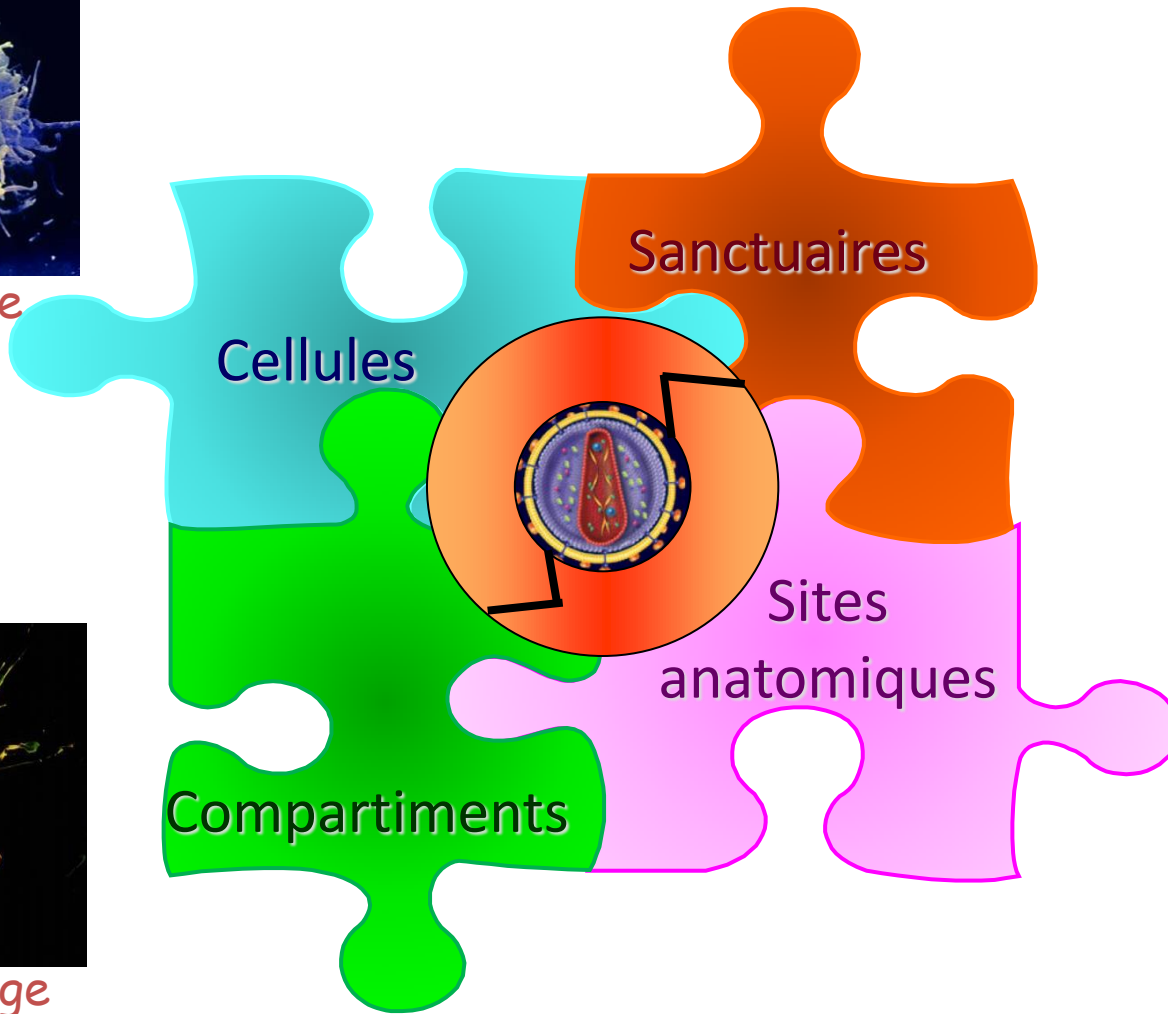
Les réservoirs VIH, reflet des dynamiques virale, cellulaire et tissulaire au cours du temps



Lymphocyte
T CD4

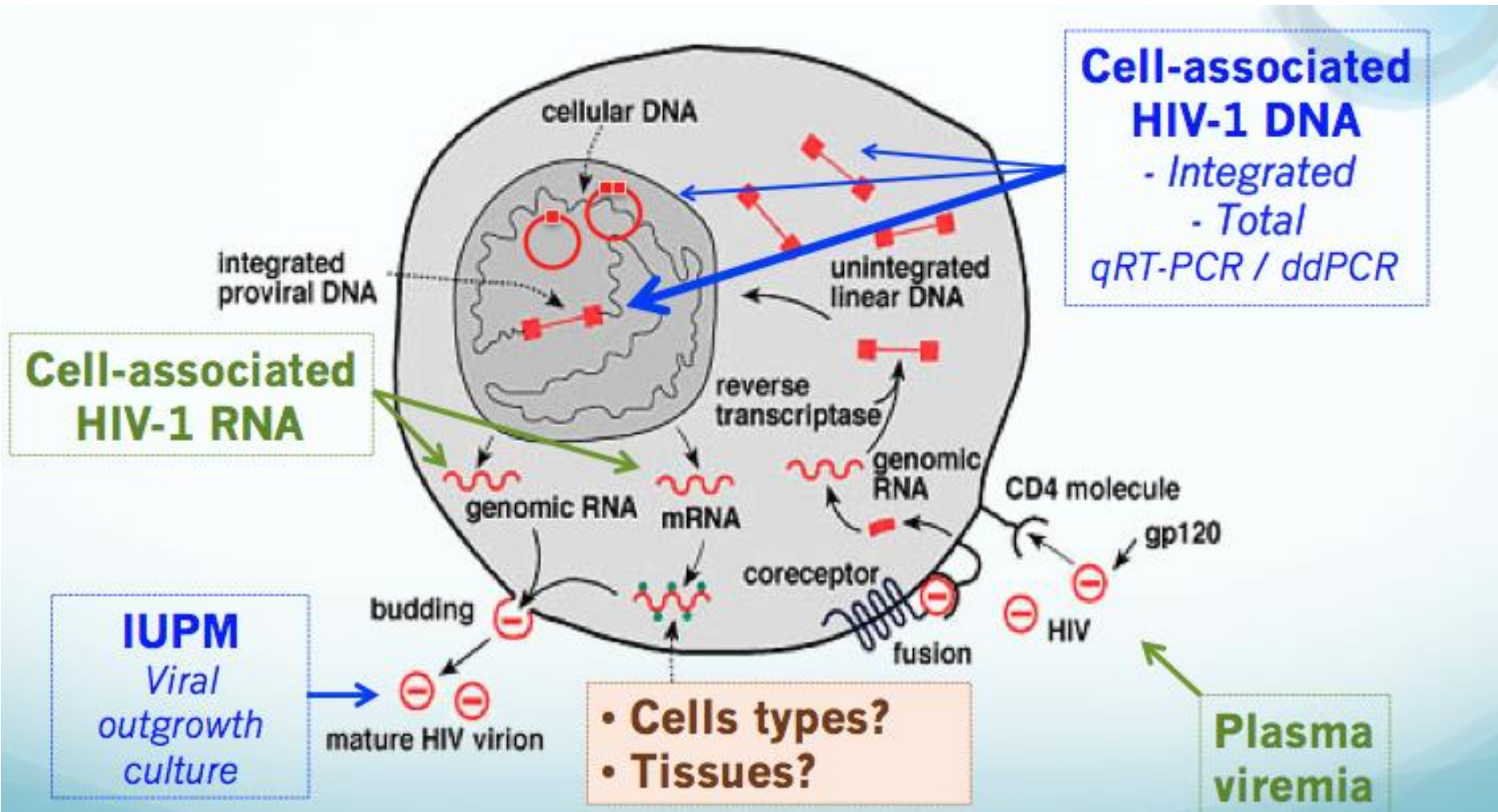


Macrophage



**QUELLE EST LA PLACE DE L'ADN VIH
PARMI LES MARQUEURS ESTIMANT LA
TAILLE DU RÉSERVOIR ?**

Marqueurs de réservoir VIH



Etude de la capacité des cellules infectées à produire de nouveaux virions

Sang → séparation des T CD4 quiescents

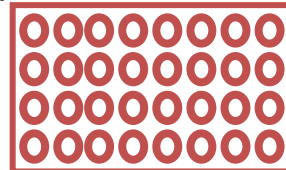
↓
coculture avec des PBMC - T CD8 de donneur HIV-

↓
PHA, anti-CD3, anti-CD28, IL2...

↓
mesure de la production virale (Ag p24 ou ARN VIH)
(unités infectieuses /million de cellules explorées)

approche quantitative par dilution limite

2.5 million cells/puits
2.5 million cells/puits
0.5 million cells/puits
0.1 million cells/puits



Pierson 2000, Han 2007

Coefficient de variation 0,95

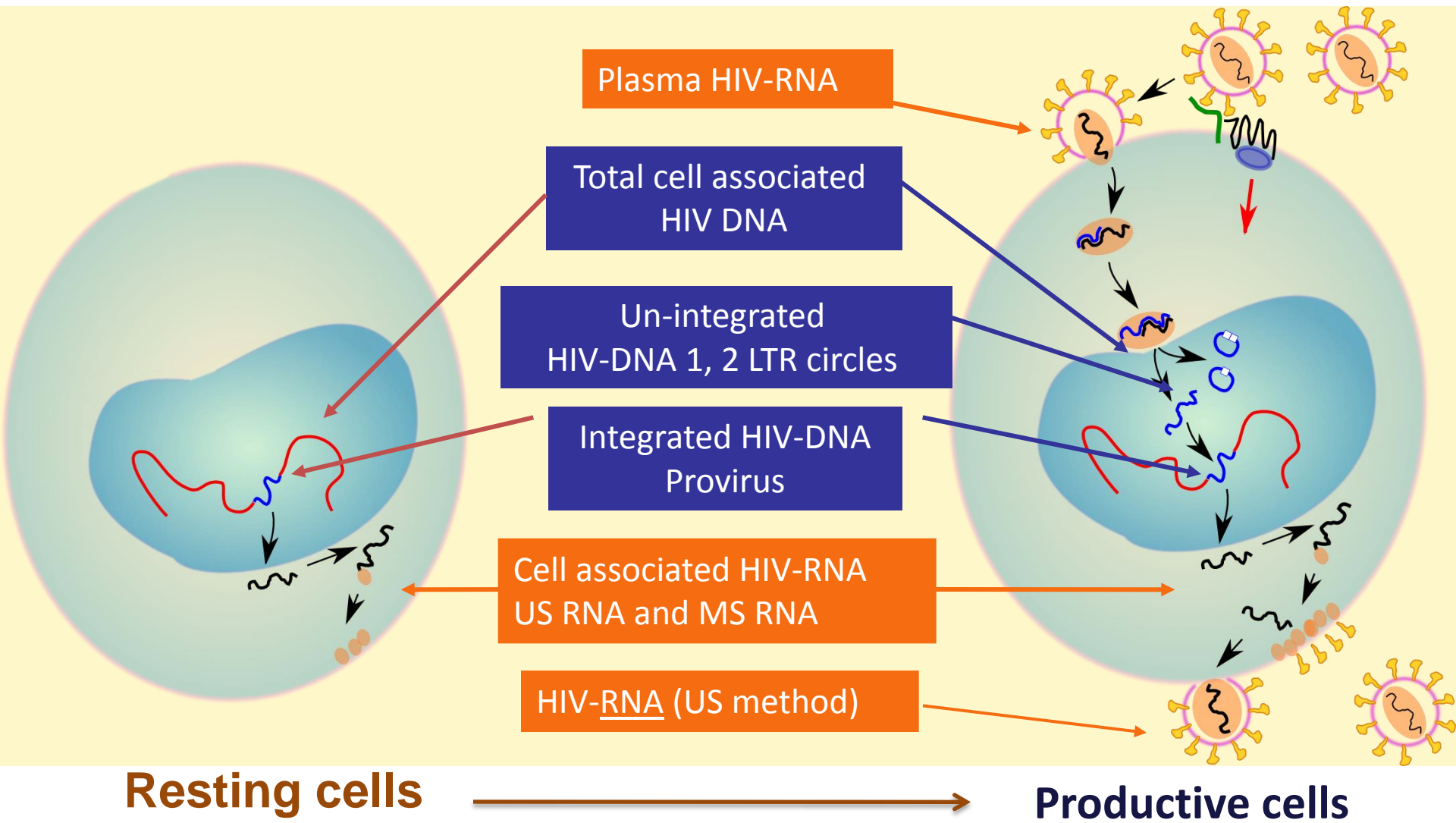
Intervalle de confiance ± 0.7 log

Eriksson plos path 2013, Siliciano Nat Med 2003, Crooks JID 2015

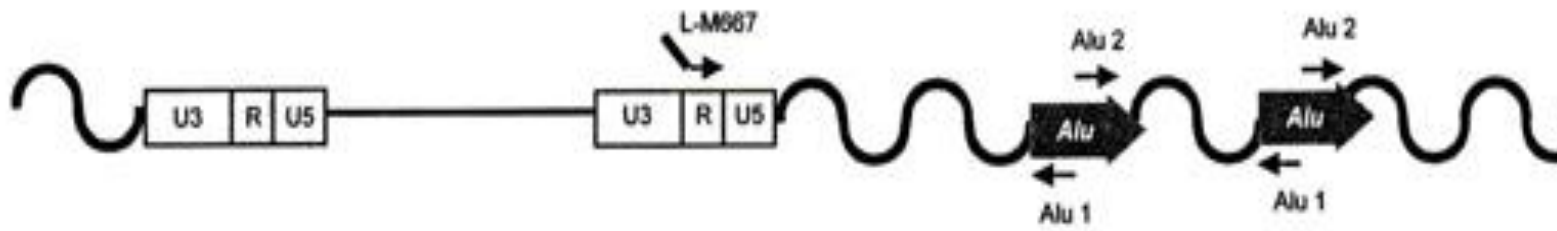
Blood



Tissues



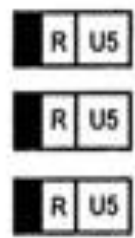
Quantification de l'ADN VIH-1 intégré



1° cycle de PCR



PCR nichée



Quantification de l'ADN VIH total par PCR en temps réel = ADN VIH linéaire intégré et non intégré (formes linéaires + épisomales)

Test ANRS ADN-VIH-1 commercialisé par Biocentric

AVANTAGES

- gène *LTR* : limite les problèmes liés à la diversité virale
- Standardisé
- sensible
- spécifique
- reproductible
- Applicable sur de grandes séries
- Petite quantité de cellules : sang total, culots globulaires, PBMC, DBS, biopsies

LIMITES

- Quantifie les virus infectieux et défectifs

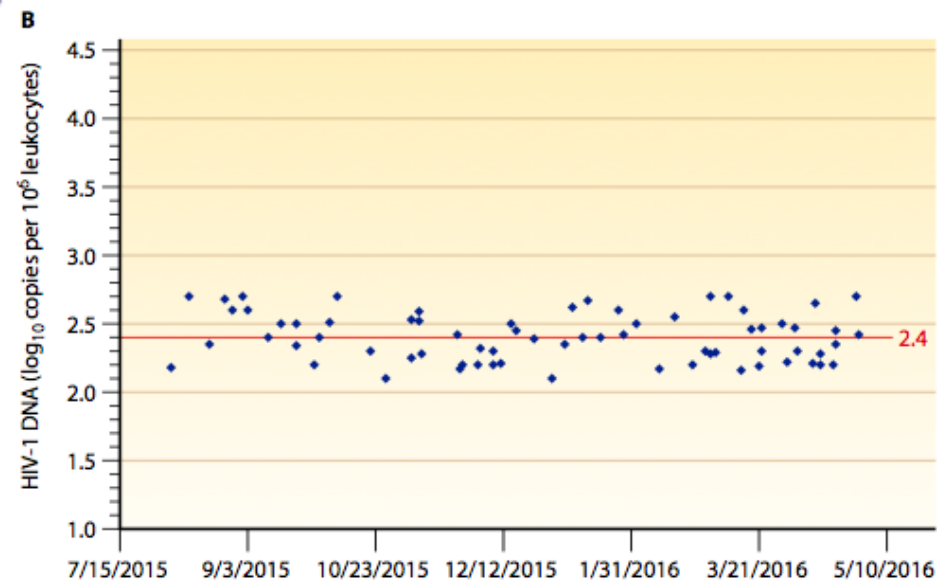
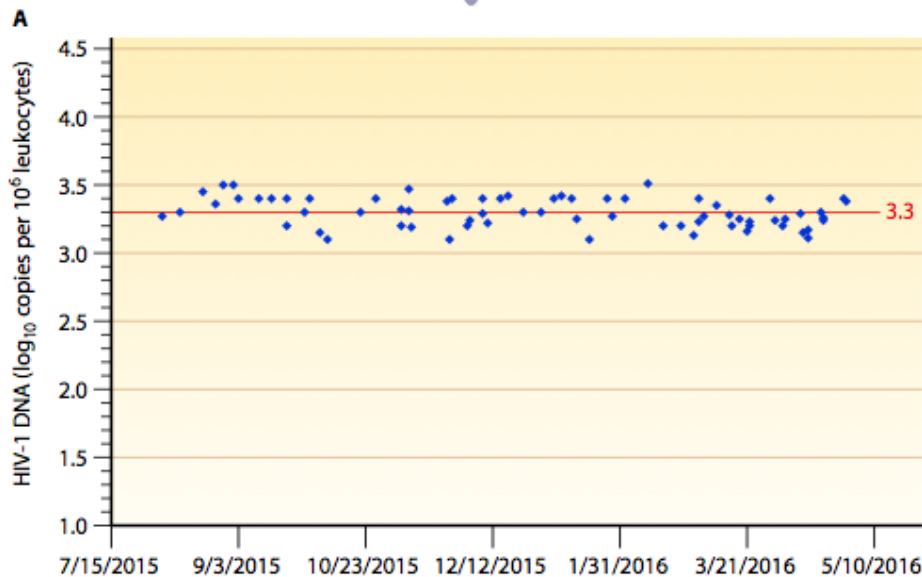


Droplet digital PCR (ddPCR)

Avettand-Fenoel, 2009

Reproductibilité intra-laboratoire

- Aliquots de pools de cellules de patients infectés par le VIH ,
- 1 contrôle faible, un contrôle fort testés >60 fois sur une période de >9 mois
- Techniciens différents, lots de réactifs différents du test ANRS de PCR en temps réel (Biocentric), thermocycleurs différents

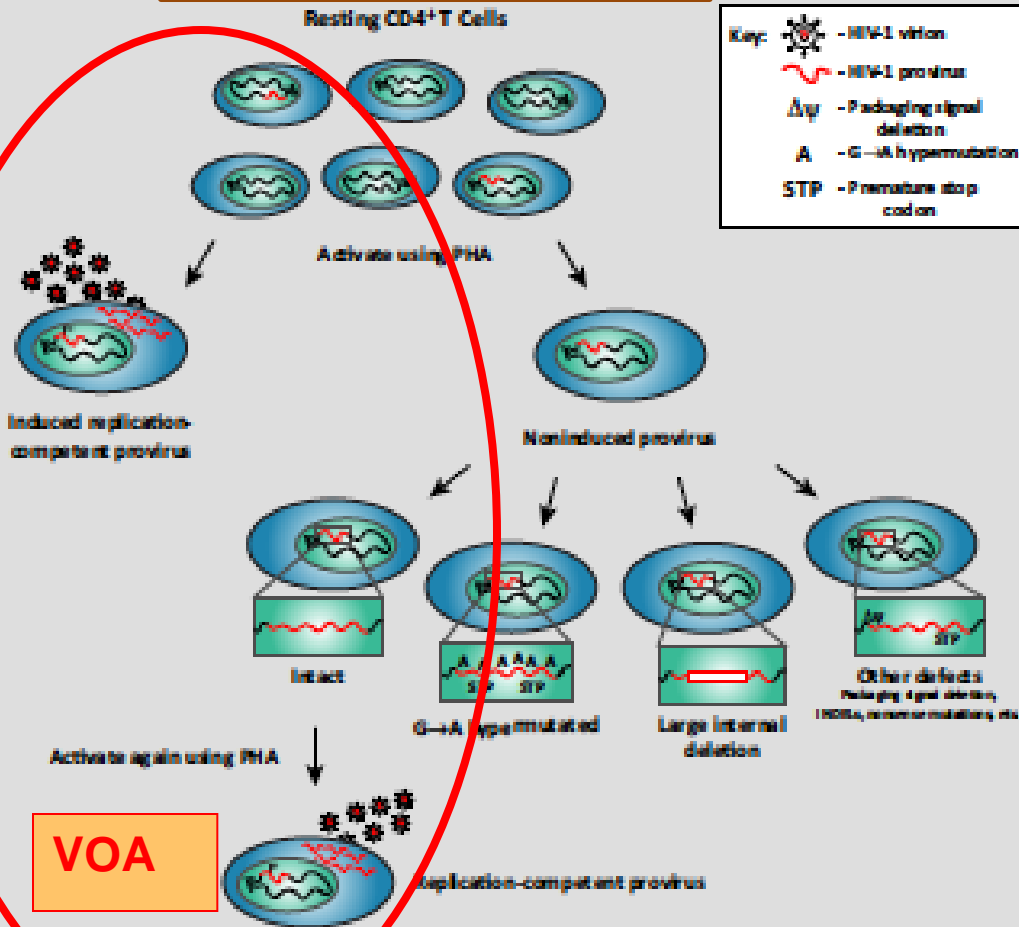


	Moyenne (log)	Ecart-type (log)	Coefficient de variation	Intervalle de confiance 95%
Contrôle fort	3,30	0,11	0,03	$\pm 0,22$ log
Contrôle faible	2,40	0,18	0,07	$\pm 0,35$ log

Total HIV Reservoirs

Adapté de Bruner
Trends microbiol
2015

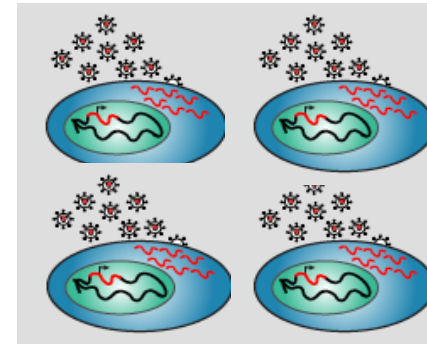
Latent Reservoir



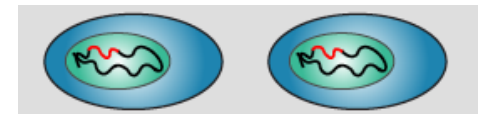
Key:

- HIV-1 virion
- HIV-1 provirus
- Packaging signal deletion
- G→A hypermutation
- Premature stop codon

Activated Reservoir



Productive CD4+T cells



Monocytes



HIV particles & proteins

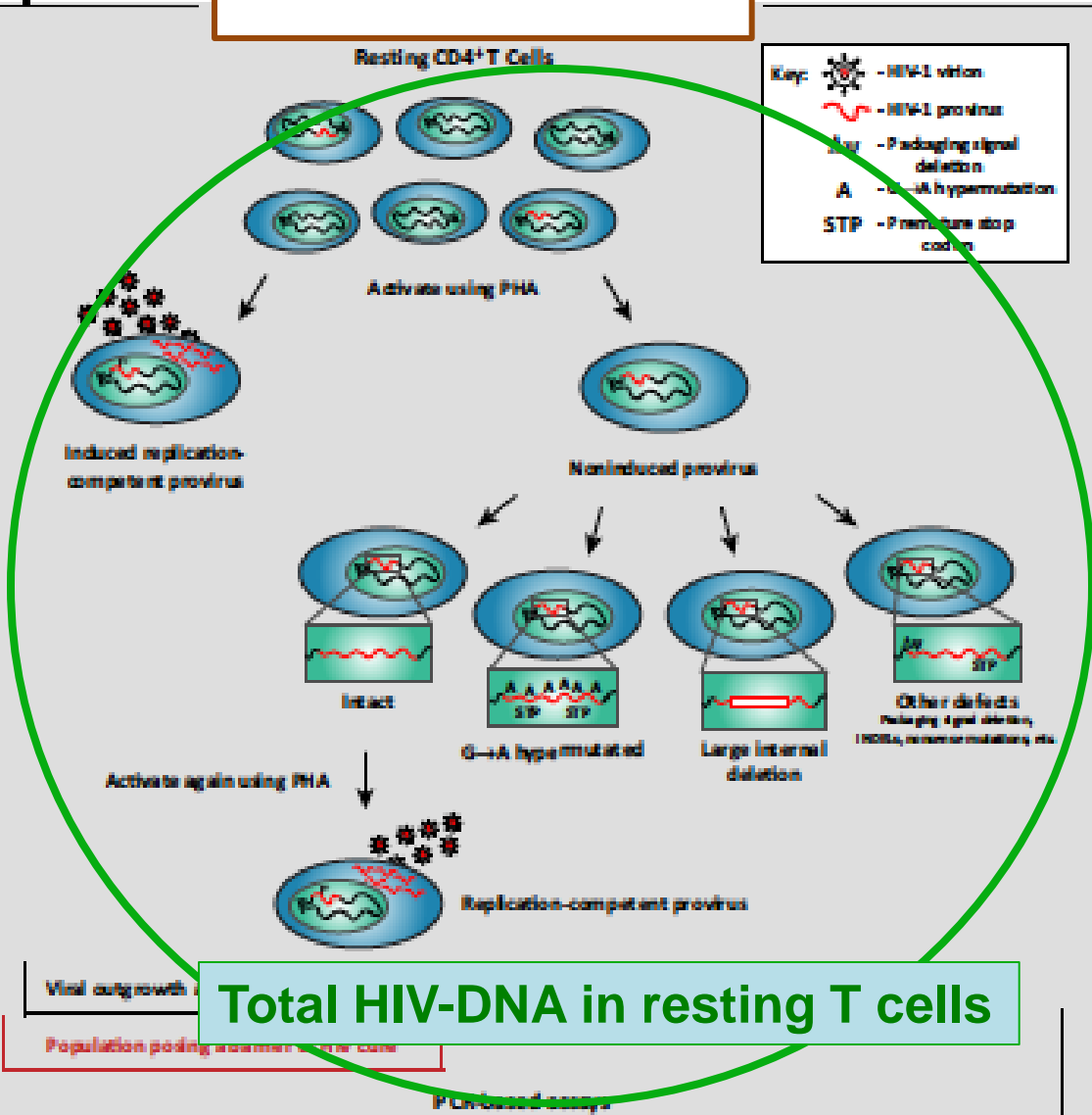
Viral outgrowth assay

Population pooling strategies for HIV cure

PCR-based assays

Total HIV Reservoirs

Latent Reservoir

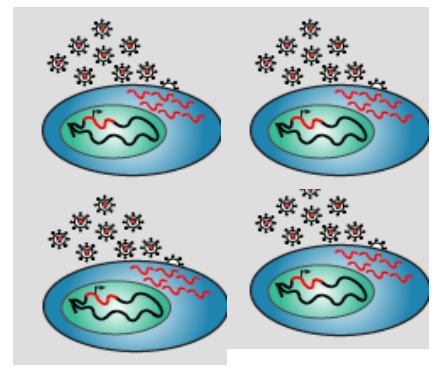


Key:

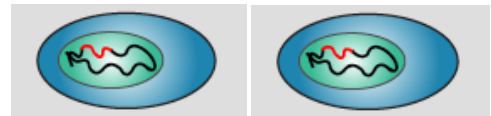
- HIV-1 virion
- HIV-1 provirus
- Packaging signal deletion
- G→A hypermutation
- Premature stop codon

Total HIV-DNA in resting T cells

Activated Reservoir



Productive CD4⁺T cells



Monocytes








HIV particles & proteins

Total HIV Reservoirs

Latent Reservoir

Activated Reservoir

Key:

-  - HIV-1 virion
-  - HIV-1 provirus
-  - Packaging signal deletion
-  - G→A hypermutation
-  - Premature stop codon

Resting CD4+T Cells



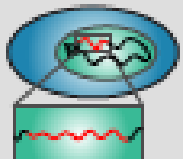
Activate using PHA



Induced replication-competent provirus



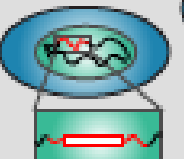
Noninduced provirus



Intact



G→A hypermutated

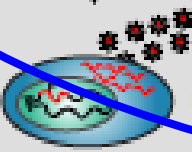


Large internal deletion

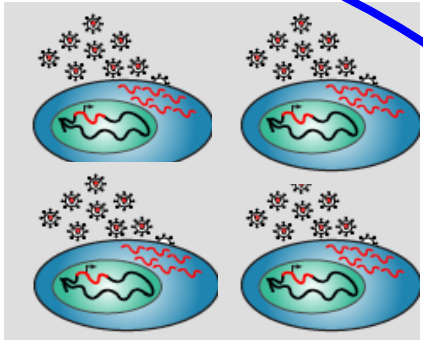


Other defects
Packaging signal deletion,
INCR1, reverse mutations, etc.

Activate again using PHA



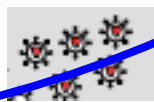
Replication-competent provirus



Productive CD4+T cells



Monocytes



HIV particles & proteins

Viral outgrowth assay

Population posing a barrier to HIV cure

PCR-based assays

Total HIV-DNA

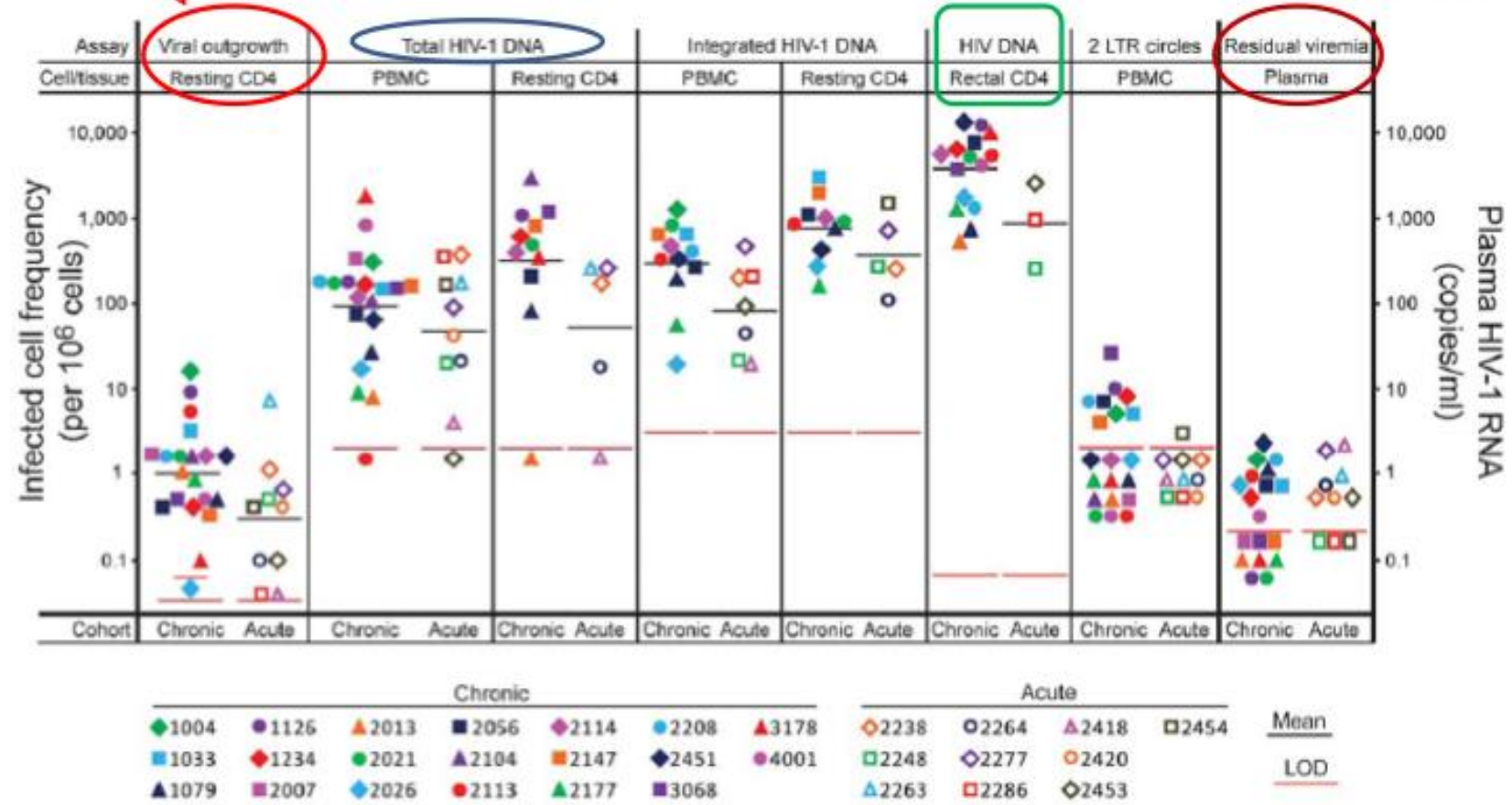
Quantification du réservoir lymphocytaire T CD4

Gold standard

Facilité

Problème des tissus

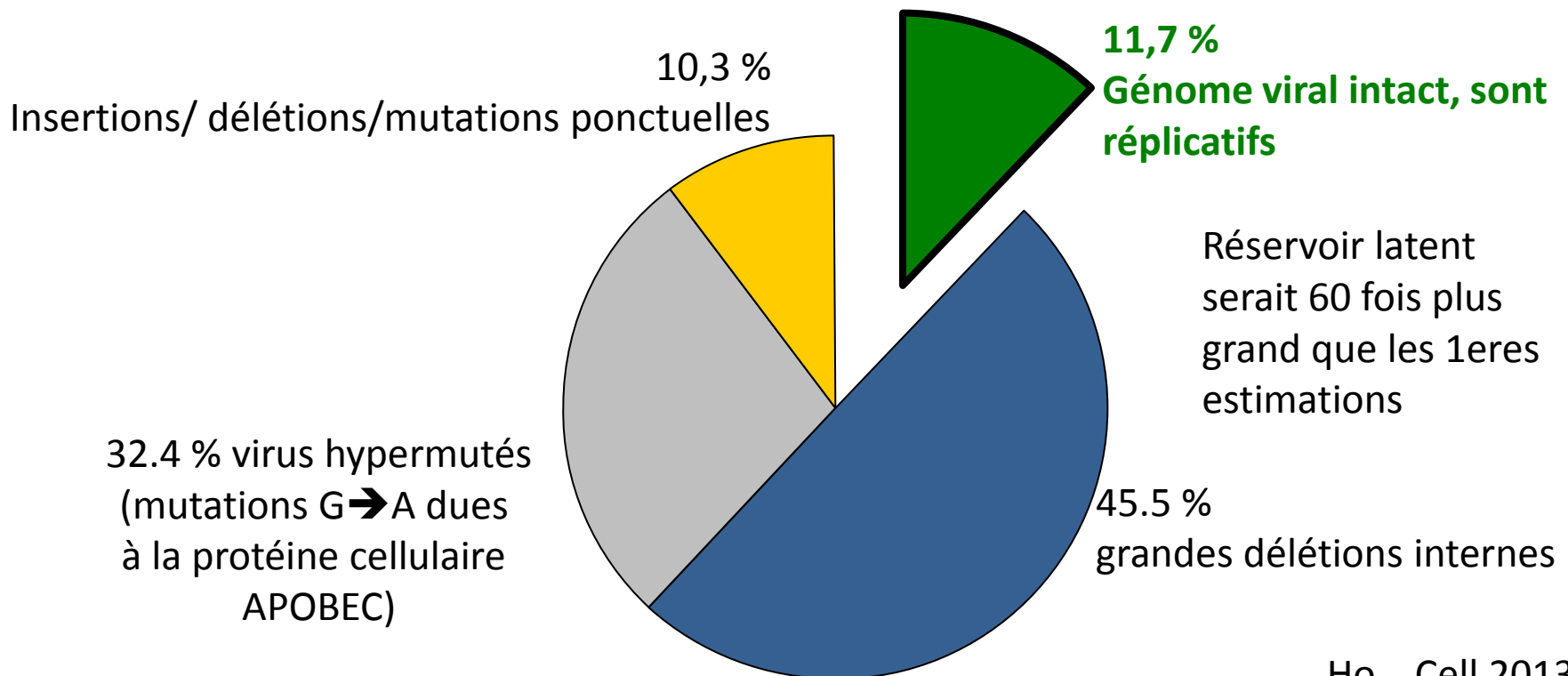
Réplication résiduelle



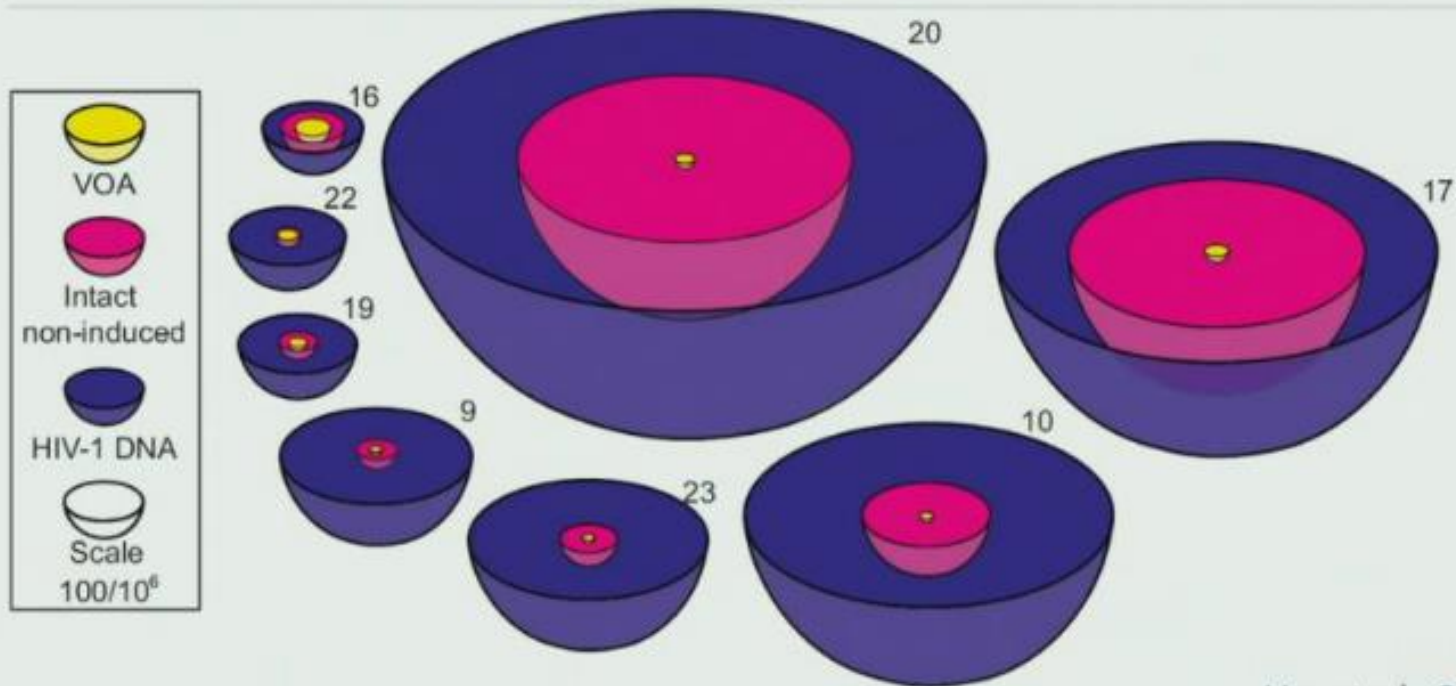
Caractérisation des virus non réactivés présents dans le réservoir

L'activation des cellules T latentes ne permet l'induction que d'une très faible proportion, d'environ 1%, des provirus latents.

→ 88,3 % des virus non réactivés ne pourront pas générer de réplication



Inducible versus non-inducible viral reservoir size



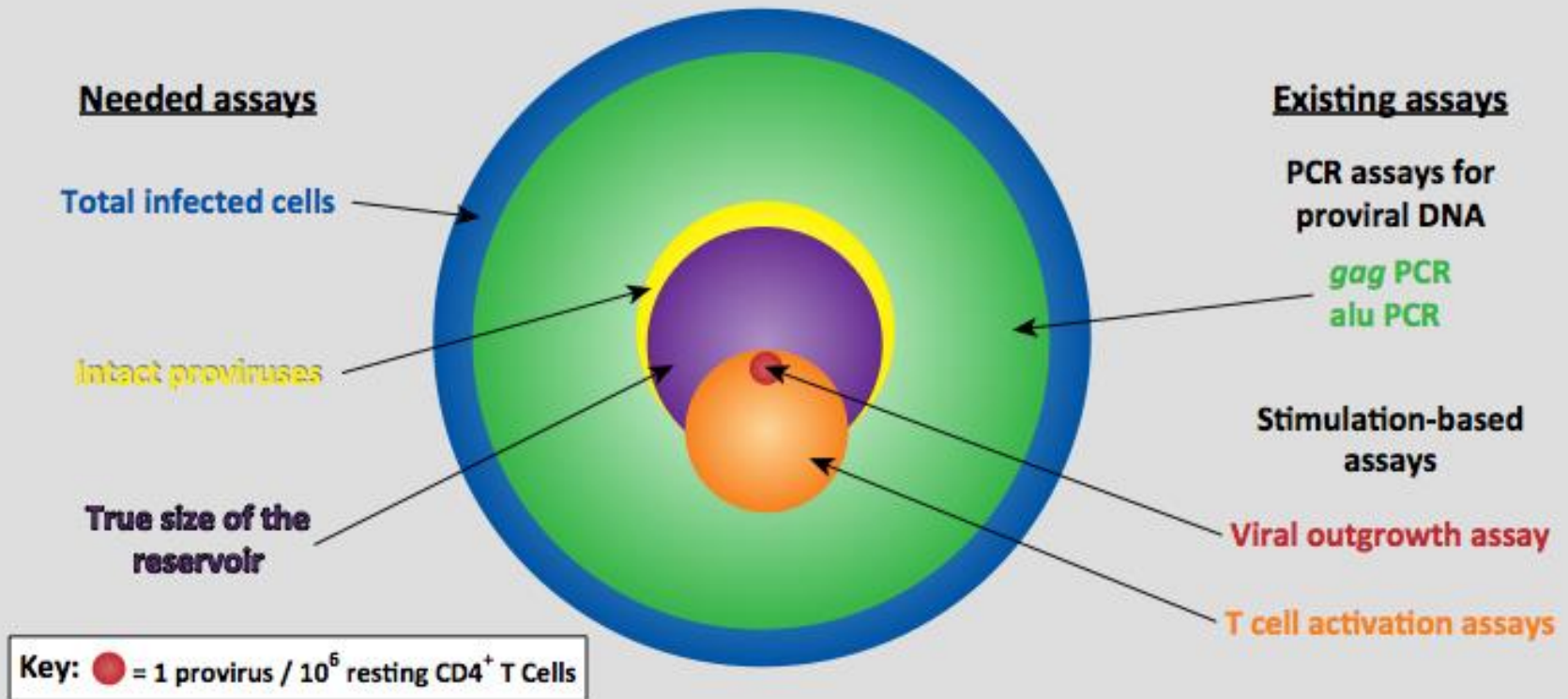
Ho et al, Cell, 2013

Challenges techniques

- Problèmes de surestimation ou de sous estimation du réservoir selon les techniques de quantification utilisées
- Le sang n'est qu'une petite fraction du réservoir latent
 - Problème d'accessibilité des réservoirs anatomiques

Différentes techniques pour estimer le réservoir, aucune n'est parfaite

Assays for the latent reservoir



Chaque marqueur apporte une information différente

METHODES	OBJECTIFS	AVANTAGES	INCONVENIENTS
ADN-VIH intégré	Mesure du provirus intégré dans les cellules productives et/ou les cellules quiescentes	Possible sur échantillons congelés	Pas de méthodes std Reproductibilité? Virus défectifs
ADN-VIH Total	Mesure de l'ADN intégré, 1 LTR, 2LTR et ADN linéaire non intégré dans le sang et les tissus	Sang total ou PBMC Standardisé, simple reproductible, Contrôle de qualité OK	Inclut la quantification de virus défectifs
US-ARN et MS-ARN intracellulaire	Marqueur d'une réplication en cours dans les cellules productrices	Marqueur d'une production résiduelle sous HAART	Virus infectieux? Reproductibilité?
ARN-VIH plasma HIV-RNA (1 copie)	Marqueur de production virale par les cellules infectées Méthode ultrasensible pour quantifier la réplication résiduelle (1 copie)	Méthode universelle Possible pour tous les sous-types VIH avec certaines trouses	Marqueur indirect de cellules productrices Reproductibilité?
Viral outgrowth assay VOA (IUPM)	Mesure la capacité des cellules à produire du virus infectieux	virus infectieux	Technique longue et lourde Nécessite de grandes quantités de sang frais Reproductibilité?

Choix du marqueur

- Valeur prédictive dans différentes situations cliniques
- Mesure standardisée, reproductible
- Coût raisonnable (technique, humain, volume d'échantillon, financier)

Le niveau d'ADN VIH total est informatif :

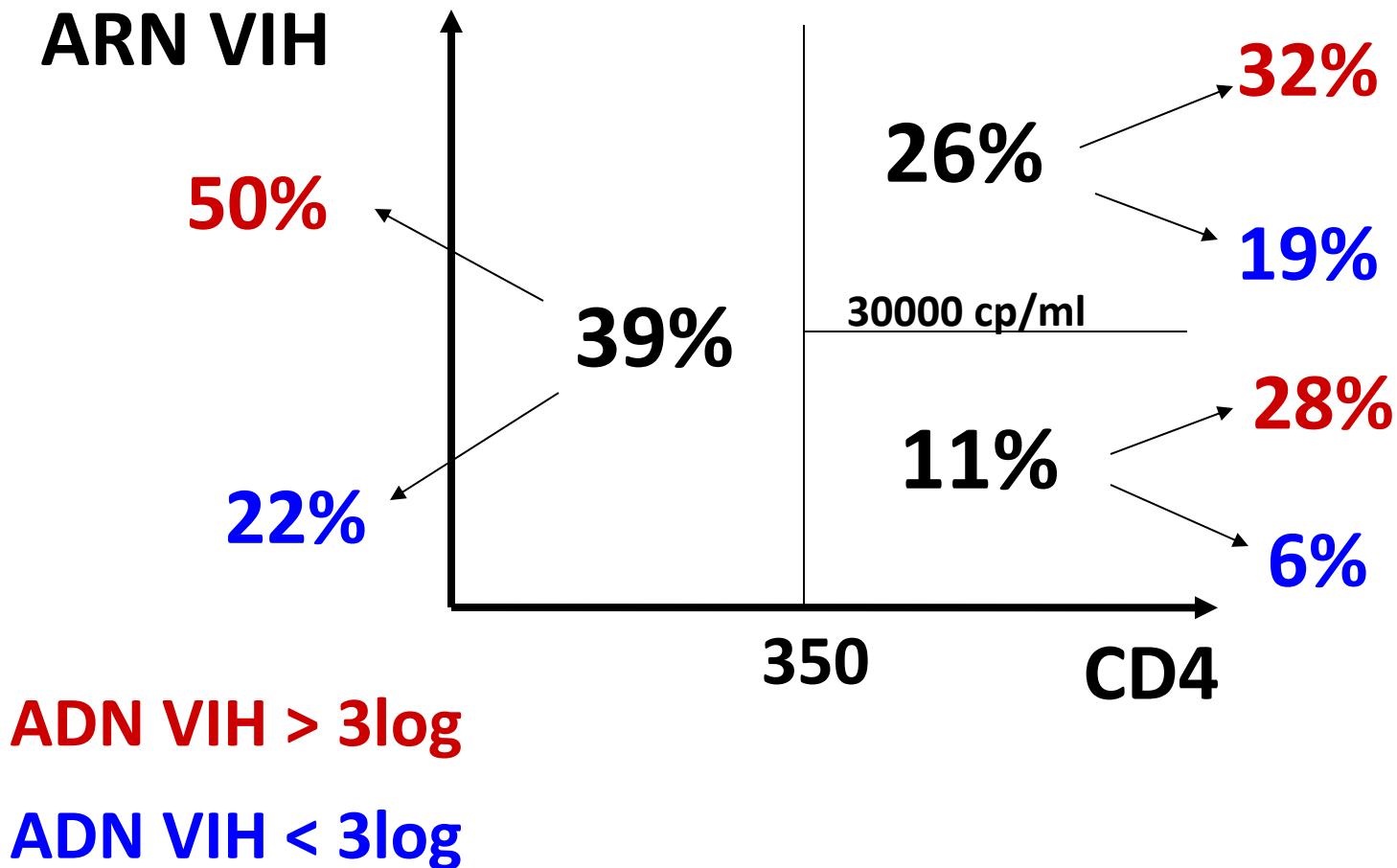
- en histoire naturelle**
- sous traitement**

L'ADN VIH comme marqueur pronostique en histoire naturelle

- Prédicatif de la progression immunologique et clinique et du décès, indépendamment du taux de lymphocytes T CD4 et de la charge ARN VIH-1

Kostrikis 2002, Rouzioux 2005, Goujard 2006,
Minga 2008, Avettand-Fenoel 2008, Ganesan 2010

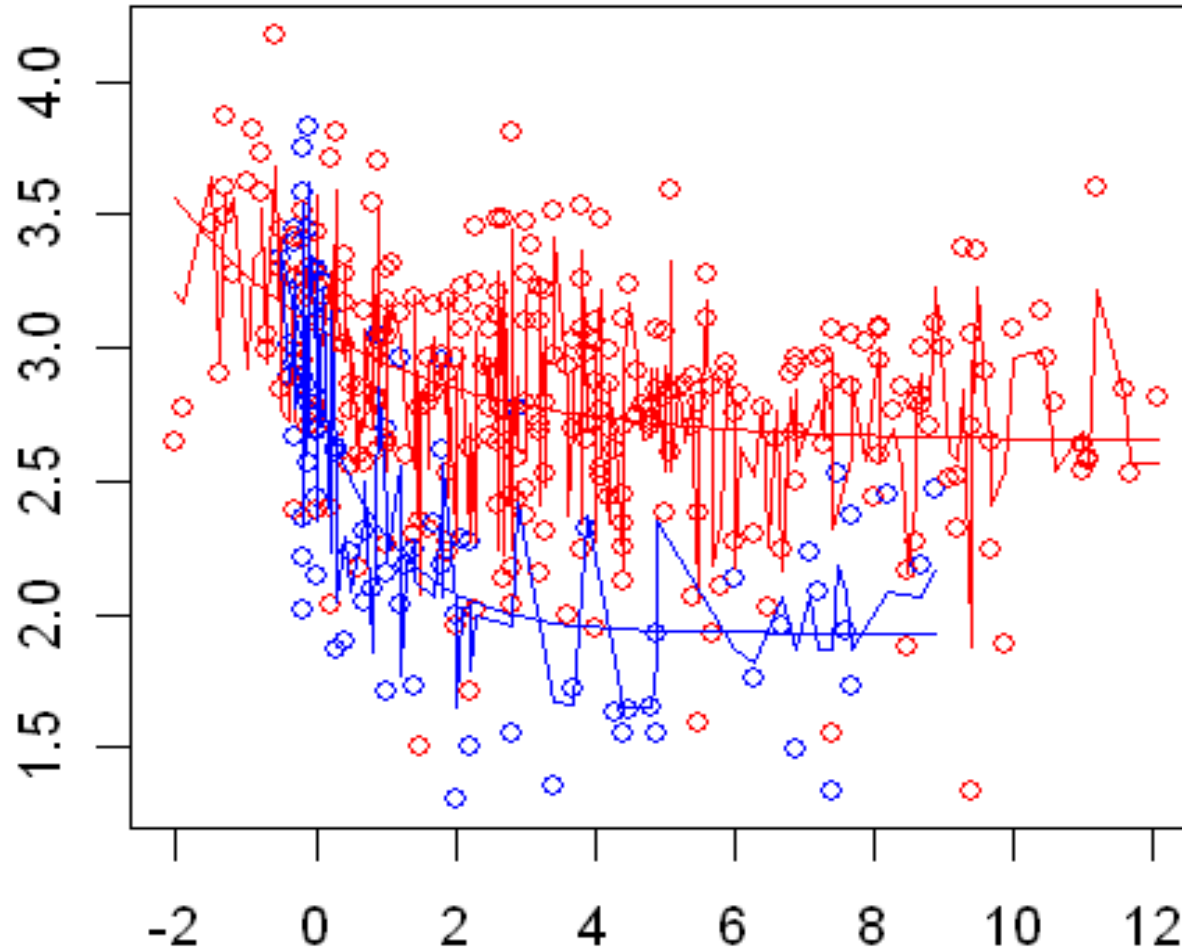
Risque de progression vers le SIDA : Probabilités à 5 ans



Décroissance de l'ADN VIH sous traitement initié en PHI ou CHI

>1100 échantillons

ADN VIH-1 (Log copies/million de PBMC)



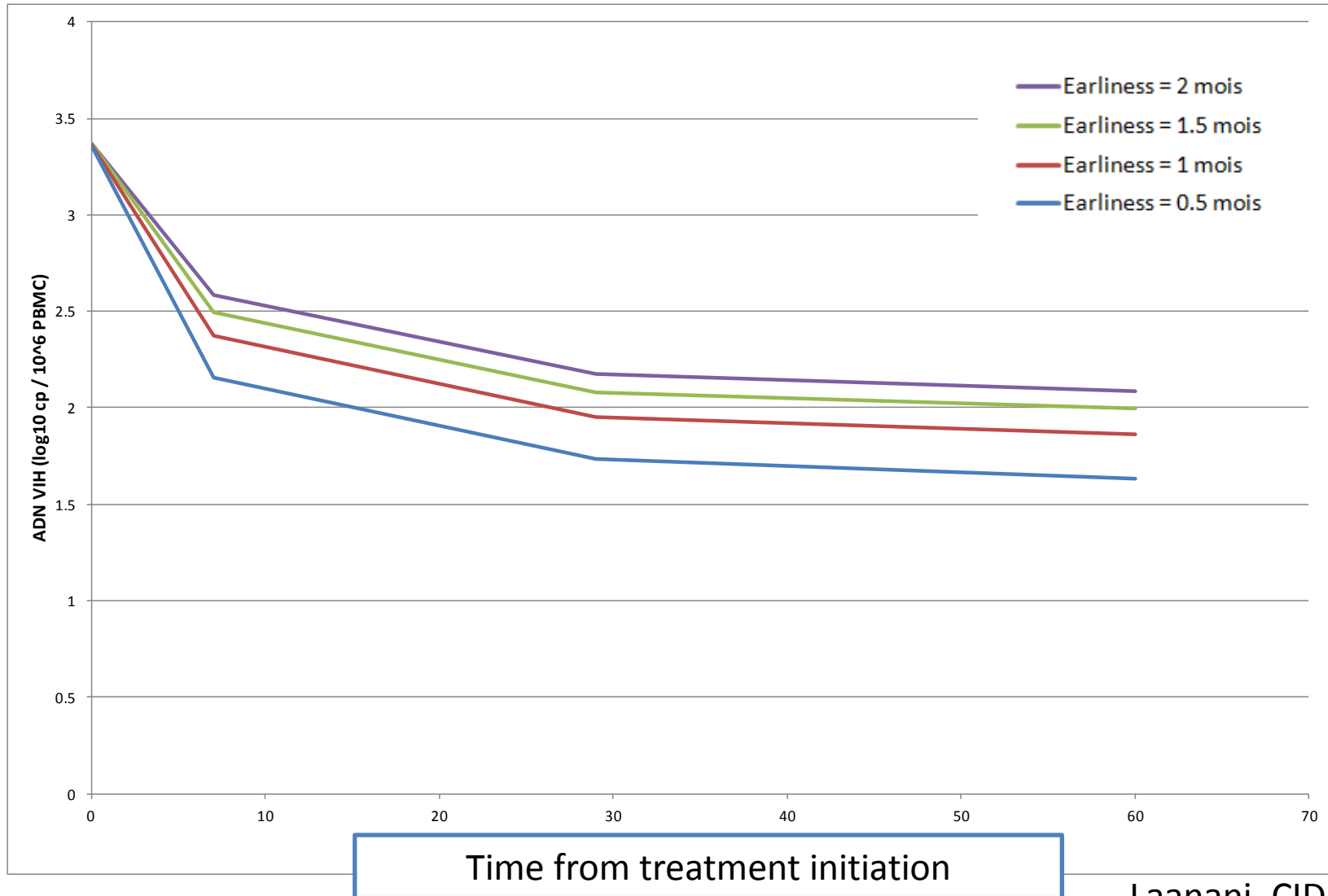
Modèle exponentiel à effets mixtes (effet fixe et variable aléatoire)

- CHI (n=139)
- PHI (n=22)

Temps écoulé depuis que l'ARN VIH-1 est indétectable (années)

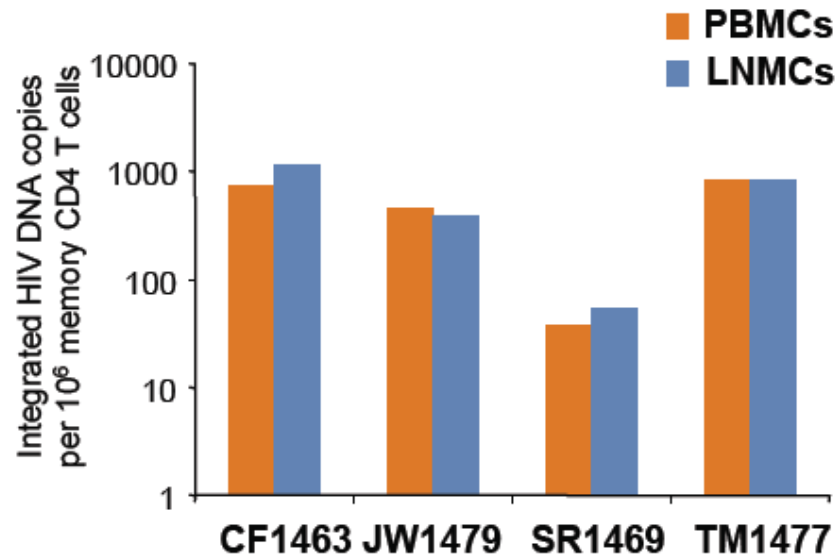
Cohorte PRIMO : décroissance de l'ADN VIH sous traitement

327 patients on HAART, 1305 samples, 3 slope mixt model



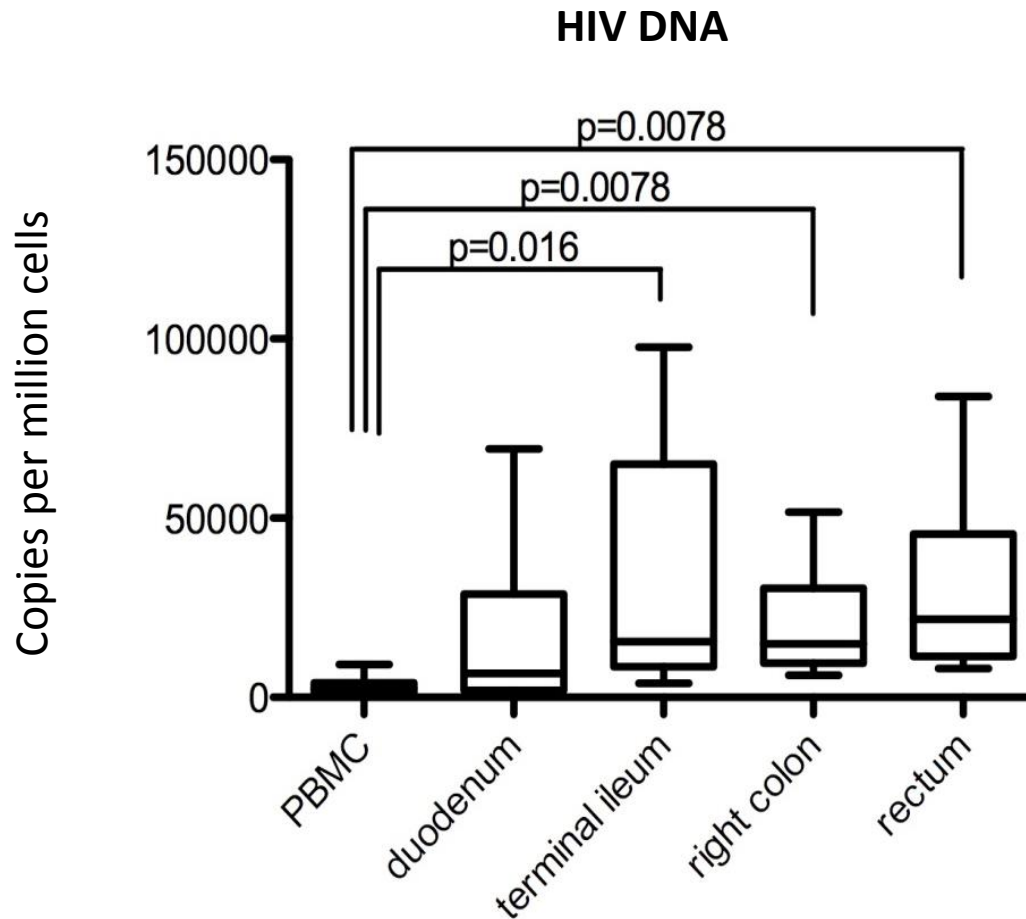
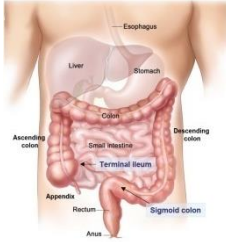
ADN VIH dans les T CD4 sanguins et ganglionnaires

Dans les CD4 mémoires



Les fréquences de cellules CD4 portant de l'ADN viral sont comparables dans le sang et les ganglions.

Tissu lymphoïde associé au tissu digestif (GALT) : réservoir viral sous cART



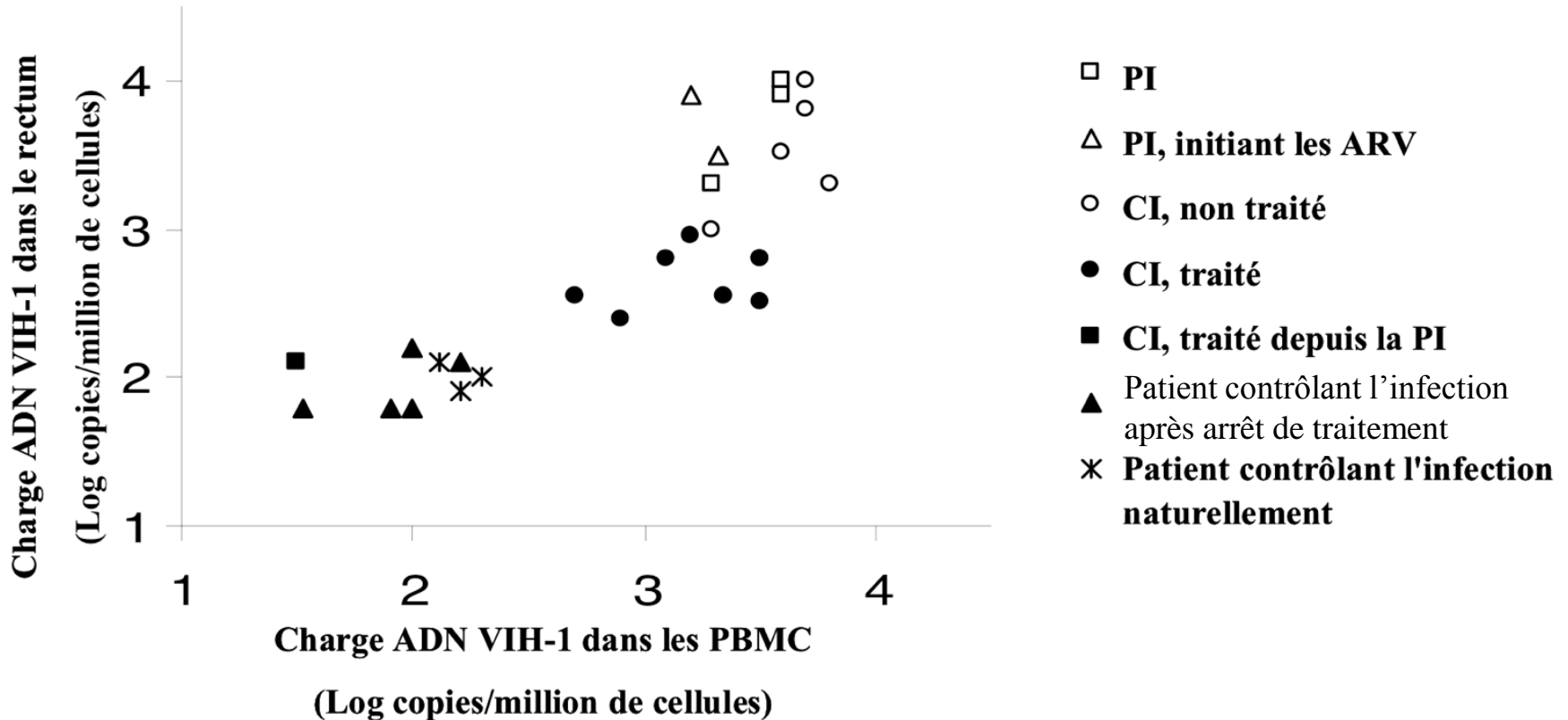
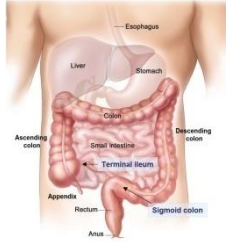
N=8, time on HAART with undetectable HIV RNA 2.8 – 12 years

Chun et al., *J Infect Dis* 2008; Yukl et al., *J Infect Dis* 2010

ADN VIH au niveau rectal

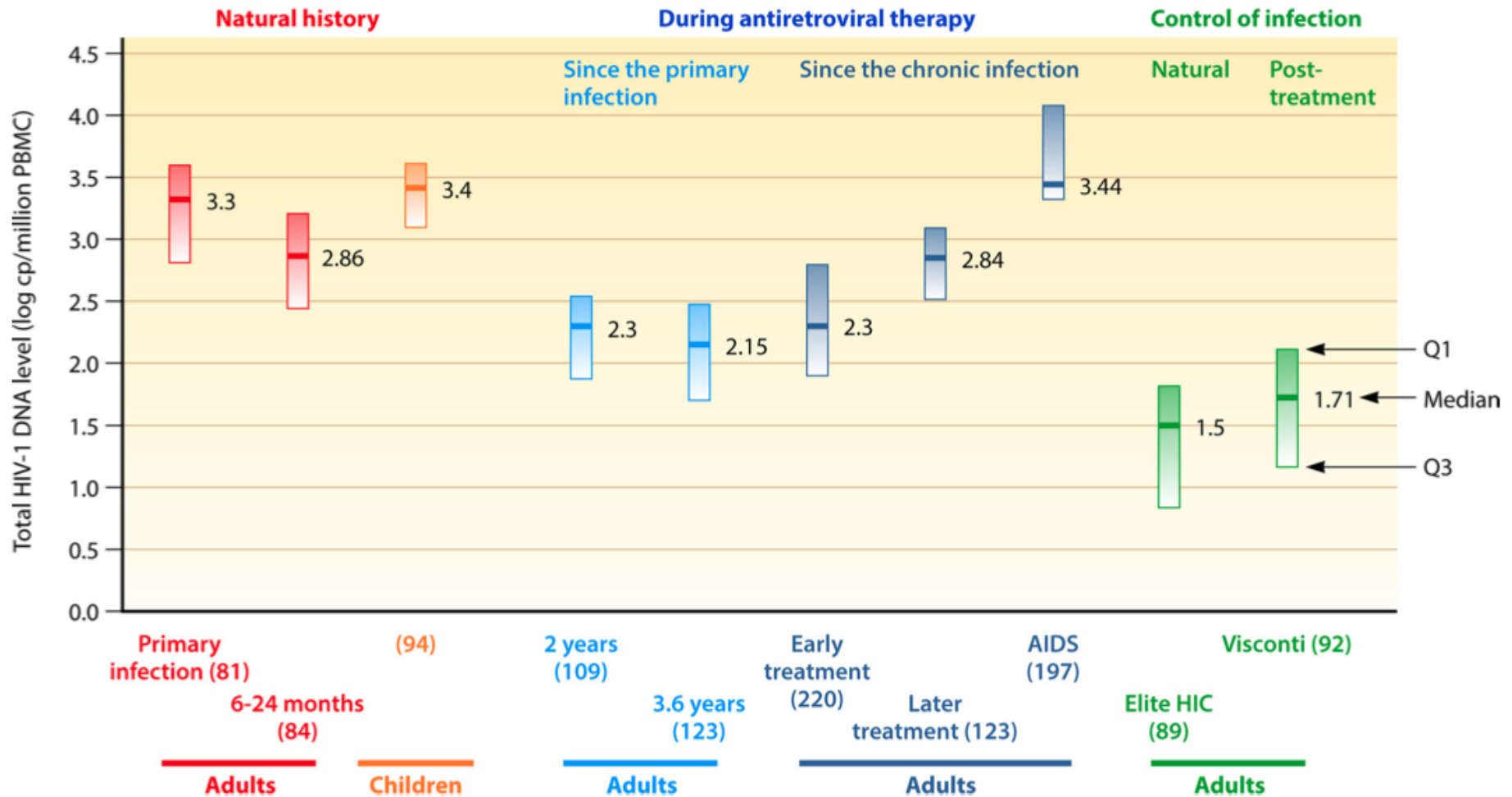
$r=0.841, p < 0.0001$

Grande variabilité inter-individuelle



Très bonne corrélation entre le niveau d'infection du tissu rectal et celui du sang pour plusieurs groupes de patients

Charge ADN-VIH total selon le stade de l'infection



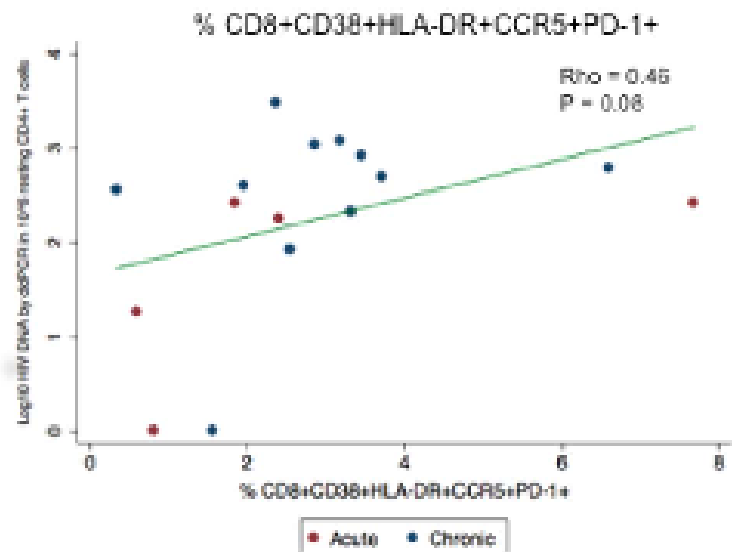
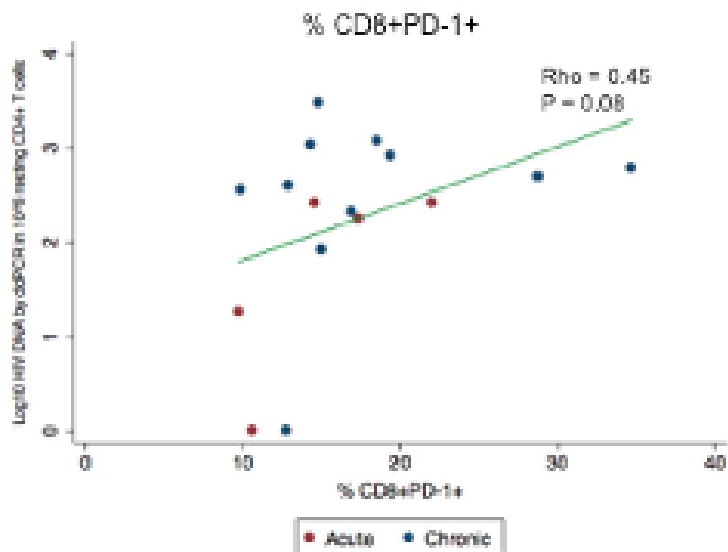
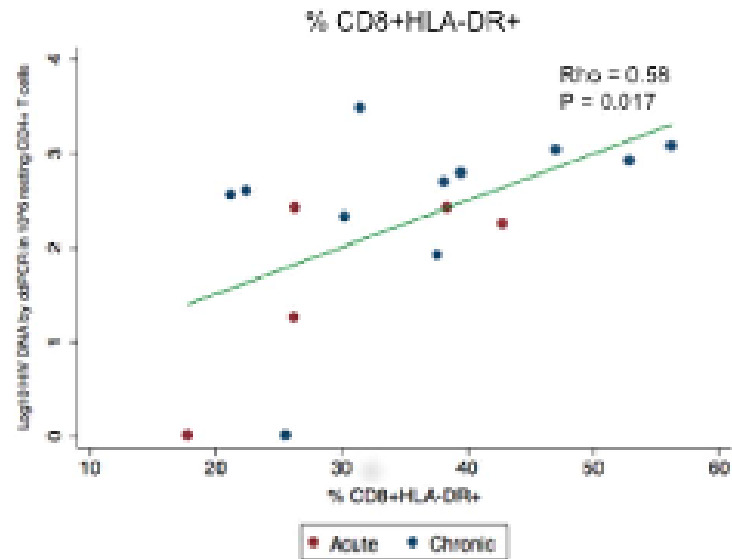
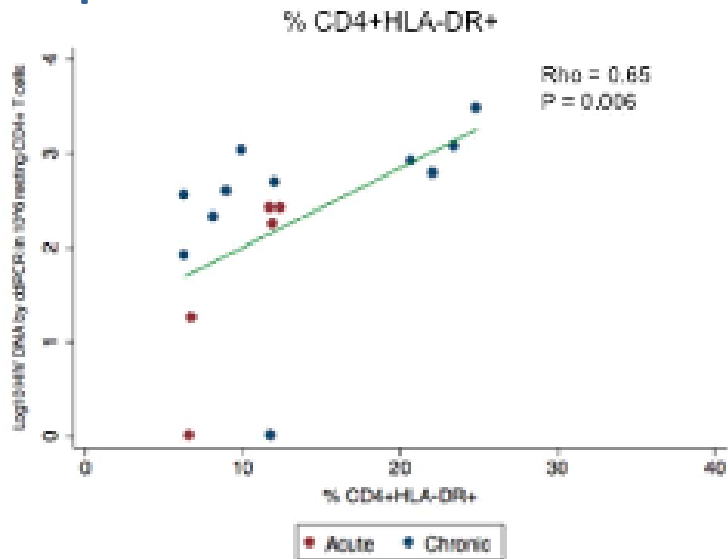
Charge ADN VIH total associée au niveau d'activation

Association très significative entre:

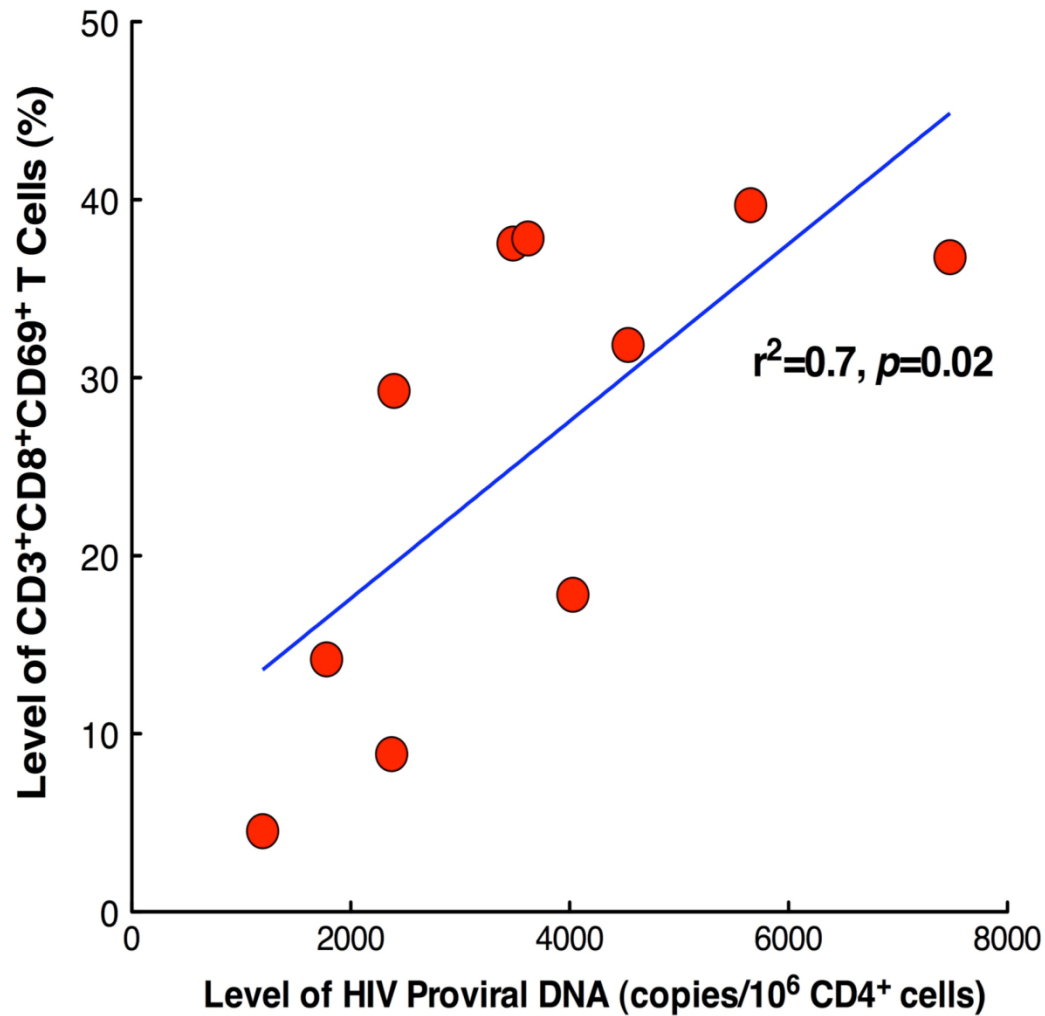
- HIV-DNA et expression des marqueurs d'activation (HLA-DR, CD38) par les T CD4 et CD8
- HIV-DNA et expression de PD-1 par les lymphocytes T CD4

Hatano et al: JID 2013 , Cockerham et al, PLOS ONE 2014

Marqueurs d'activation des cellules T sont associés aux niveaux d'ADN VIH des T4 quiescents



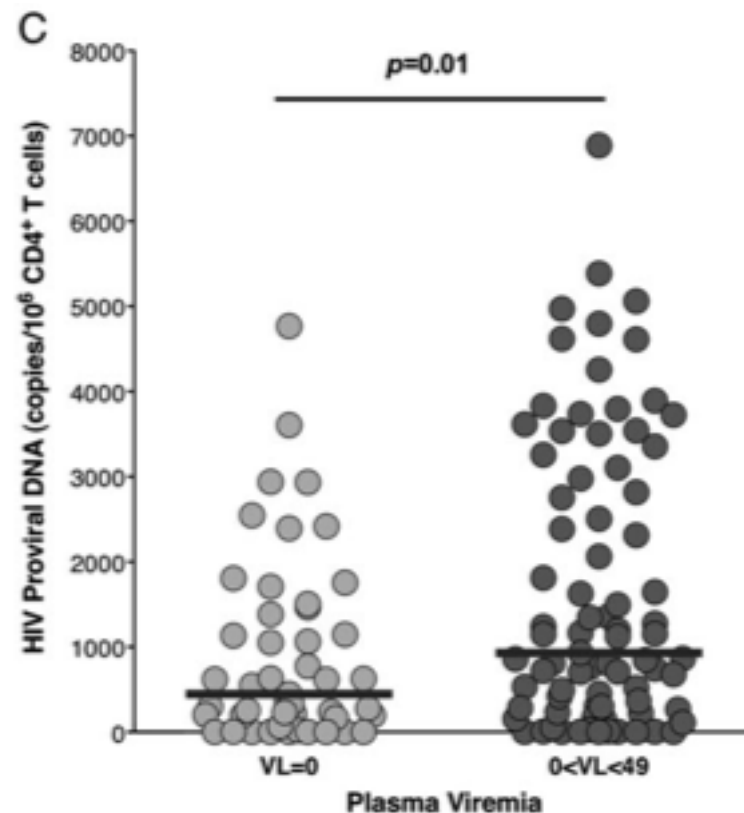
Charge ADN VIH associée au niveau d'activation des cellules du colon sigmoïde



Charge ADN VIH total corrélée à la virémie résiduelle chez les patients traités en succès

Table 1. Profiles of Study Participants With Human Immunodeficiency Virus Infection N=127

Characteristic	Values
Sex, % of participants	
Male	96.9
Female	3.1
Age, median years (range)	48 (30–73)
Duration of antiretroviral therapy at time of study, median years (range)	6.5 (1.3–15.8)
Plasma viremia at time of study	<50 copies/mL ^a
No. of viral blips (<100 copies/mL), % of participants	
0	49.6
1	28.4
2	22.0
CD4 ⁺ T cell count at time of study, median cells/mm ³ (range)	580 (100–1770)
CD8 ⁺ T cell count at time of study, median cells/mm ³ (range)	760 (200–2470)
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ cell ratio, median value (range)	0.8 (0.1–3.5)



Liens entre charge ADN VIH et réplication résiduelle sous cART

- Charge ADN VIH préthérapeutique associée au niveau de virémie résiduelle et de transcription virale sous traitement

Fischer JID 2004, Yerly AIDS 2000

- Décroissance du réservoir inversement corrélée à la fréquence et au niveau des épisodes de virémie intermittente chez des patients sous traitement efficace

Ramratnam Nat Med 2000, Fischer JID 2004, Yerly AIDS 2000

L'ADN-VIH total : un marqueur cliniquement relevant

- Valeur prédictive en histoire naturelle
- Corrélation au niveau d'activation.
- avant traitement, corrélation à la virémie résiduelle sous traitement¹
- Sous traitement, reflet de la virémie cumulée des 5 dernières années²
- Le taux d'ADN-VIH à l'interruption (>2.56 log cp/M PBMC), un nadir de CD4 bas et le stade SIDA sont prédictifs indépendants du rebond viral et du risque de progression vers un taux de CD4 $< 300/\text{mm}^3$ après arrêt de traitement : Essai ANRS-SALTO³

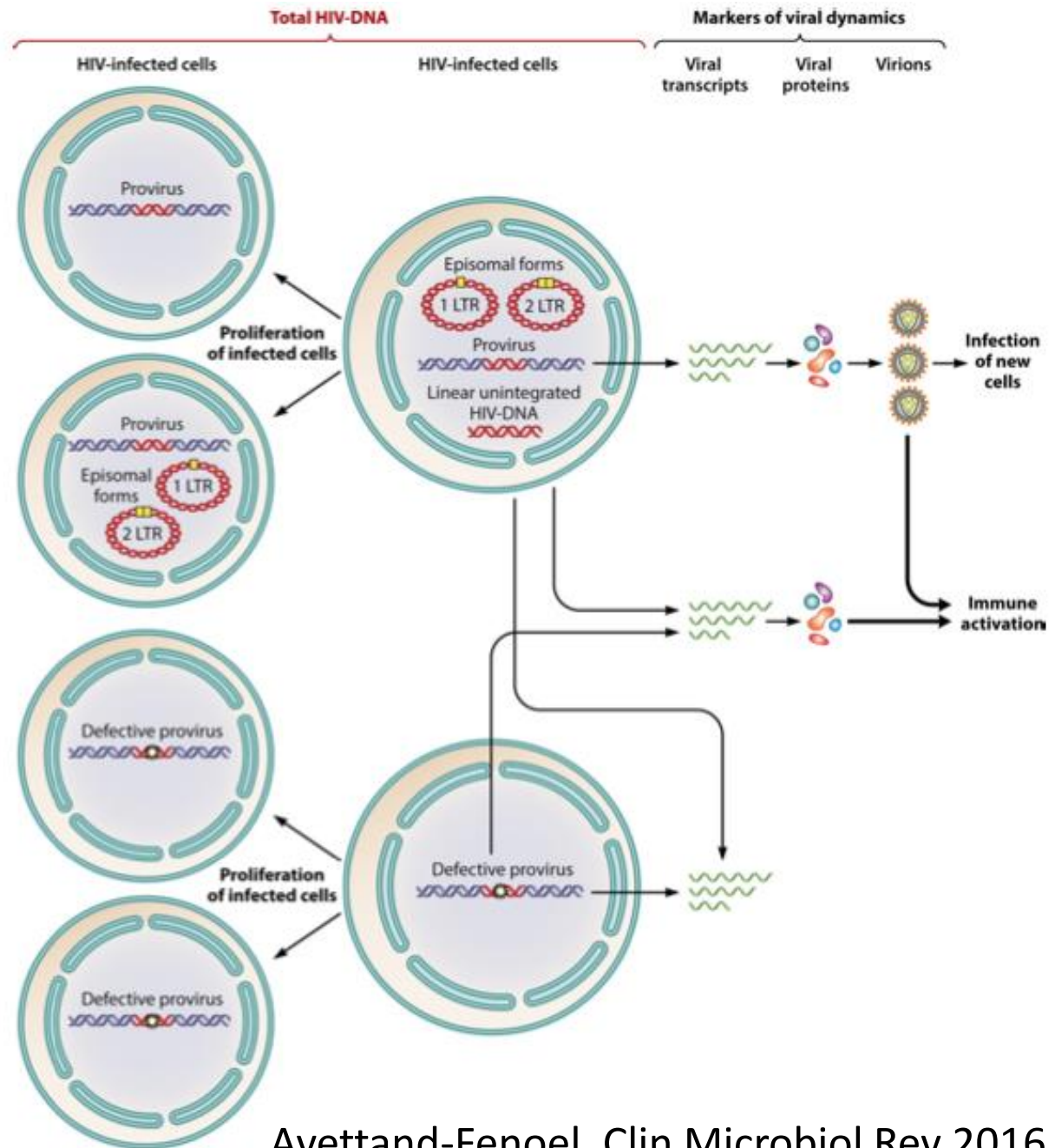
1 : Havlir et al .J Infect Dis. 2005

2 :Avettand-Fenoel J Infect Dis. 2012

3: Piketty et al. J Med Virol. 2010

**Pourquoi l'ADN VIH total est informatif
alors qu'il contient des formes labiles,
des formes défectives ou non
réactivables ?**

Les différentes formes d'ADN VIH participent à la physiopathologie de l'infection



Définition alternative des réservoirs VIH

**Toutes cellules ou tissus
contenant une/des forme(s) de persistance du VIH
qui peut participer à la physiopathologie de
l'infection VIH.**

ADN VIH dans le contexte d'une simplification thérapeutique

Pourquoi optimiser un traitement antirétroviral en situation de succès virologique ?

- **Une fois obtenu le succès virologique** (CV < 50 copies/ml), **individualiser** le traitement pour gagner en **tolérance** et/ou **simplicité d'administration** tout en maintenant l'efficacité immuno-virologique.
- améliorer la qualité de vie du patient, améliorer l'acceptabilité et l'adhésion au traitement,•
- corriger ou prévenir les effets indésirables (cardiovasculaire et métabolique, rénal, ou osseux)•
- corriger ou prévenir des interactions médicamenteuses, notamment à l'occasion de l'introduction d'un nouveau médicament.
- Réduire le coût du traitement

Individualiser le traitement ARV

- ARV puissants : bonne efficacité virologique,
- Patients traités et contrôlés virologiquement, avec une histoire préthérapeutique et thérapeutique très diverse, un large spectre de T4

Faut-il prescrire le même traitement ARV, quel que soit la charge ADN VIH?

Pour qui optimiser un traitement antirétroviral en situation de succès virologique ?

Tenir compte de

- Historique thérapeutique
- Tests génotypiques de résistance
 - sur l'ARN-VIH plasmatique
 - sur l'ADN-VIH dans les PBMC
- Durée de traitement préalable
- Virémie transitoire (blip) ou charge virale <50 copies/ml avec signal détectable au cours des 12 mois précédents
- Charge virale ADN-VIH élevée

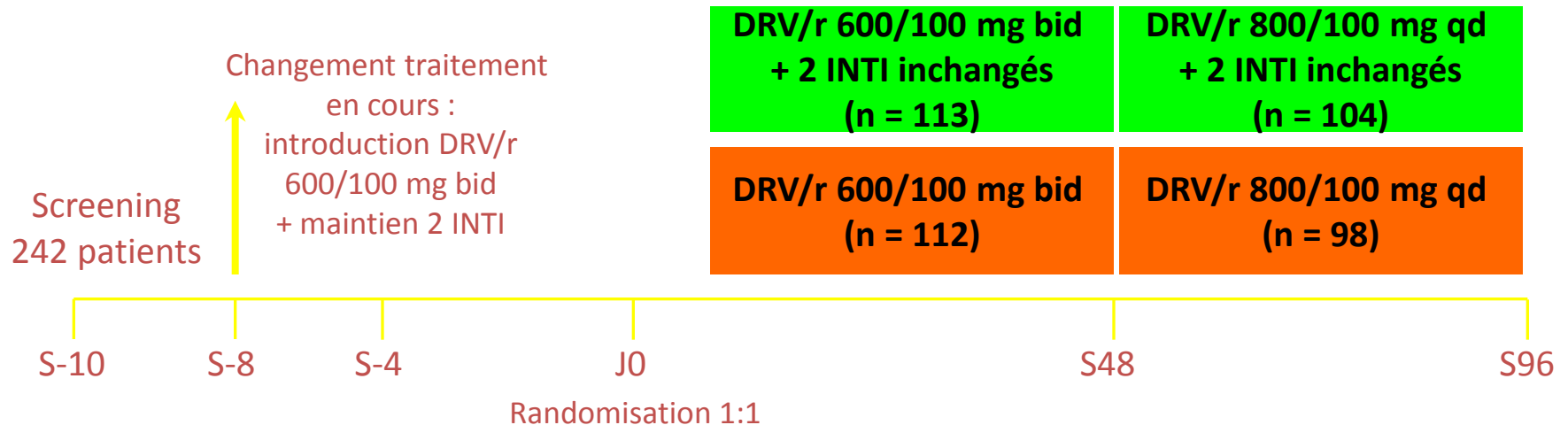
Quelles stratégies d'allègement thérapeutique ?

- **Bithérapie:** ANRS 163 ETRAL, ANRS 167 LAMIDOL
- **Trithérapie à posologie réduite:** ANRS 165 DARULIGHT
- **Trithérapie intermittente 4 ou 5 jours/7:** ANRS 162 4D et PENTA 16

**Quelles données sur l'ADN VIH dans le
contexte de l'allègement ?**

Essai MONOI : monothérapie DRV/r bid vs DRV/r bid + 2 INTI chez des patients en succès virologique

- critères d'inclusion
 - sous traitement ARV depuis plus de 18 mois, $CD4 \geq 200/mm^3$,
 - CV < 400 c/ml depuis plus de 18 mois et < 50 c/ml au screening
 - naïf de DRV, et pas d'antécédent d'échec virologique aux IP

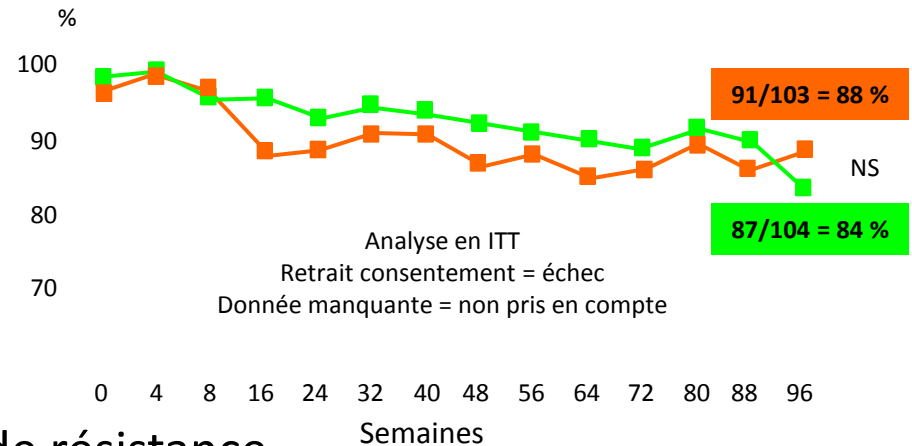


- Critère de jugement principal = succès virologique à S48
 - échec si : 2 CV consécutives > 400 c/ml, modification traitement ARV, sortie d'étude
- Résultat à S48 : non-infériorité de la monothérapie de DRV/r non démontrée

Essai MONOI : résultats à S96

- Patients sous monothérapie de DRV/r

Proportion de patients avec
CV < 50 c/ml



- Pas d'émergence de mutation de résistance
 - Pas de différence d'évolution des CD4 par rapport au bras de trithérapie
 - Si blip ou échec virologique, la réintroduction de 2 INTI permet de récupérer une CV < 50 c/ml
- Conclusion : la monothérapie de DRV/r représente une option thérapeutique pour épargner la toxicité long terme des INTI

Essai MONOI : facteurs prédictifs de l'échec virologique de la monothérapie de DRV/r bid

Table 1. Patient Characteristics

	DRV/r triple therapy (n = 113)	DRV/r monotherapy (n = 112)
Age, y,		
median (IQR)	45 (39-56)	46 (41-51)
Male sex, n (%)	87 (77)	83 (74)
CD4 cells/mm ³ , median (IQR)		
Baseline	582 (390-780)	585 (457-757)
Nadir	212 (147-283)	223 (150-320)
Baseline ultrasensitive HIV-1 RNA, n (%)		
<1 copy/mL	46 (40.7)	56 (50.5)
Other	67 (59.3)	55 (49.5)
Baseline log ₁₀ DNA/10 ⁶ cells,		
median (IQR)	2.45 (2.1-2.8)	2.51 (2.1-2.8)

Analyse multivariée : facteurs associés au rebond virologique dans le bras de monothérapie de DRV/r (2 CV > 50 c/ml)

Analyse multivariée	OR (IC95)	p
S48		
ARN HIV us J0 < 1 c/ml	0,24 (0,05-0,86)	0,042
Blip à J0	7,84 (1,22-52,2)	0,025
S96		
Observance (<100%)	3,84 (1,29-12,49)	0,02
Durée courte ART antérieur (-5 ans)	2,93 (1,43-6,66)	0,006
ADN HIV J0 (+1 log)	2,66 (1,11-7,48)	0,04

Etude ANRS-MONOI : le taux d'ADN-VIH à J0 d'un allègement pour une monothérapie DRV/r est prédictif du maintien d'un ARN-VIH < 50 cp/ml à S96

Lambert-Niclot JID 2011

Recommandations Morlat 2015 : Monothérapie d'IP/r si absence d'échec IP, > 24 mois de CV < 50 copies/ml, ADN VIH < 2,3 log/M PBMC et uniquement avec DRV/r

*Si une réduction du nombre d'ARV actifs est envisagée,
la quantification de l'ADN-VIH dans les PBMC peut
être un outil d'aide à la décision*

Charge ADN VIH sous traitement antirétroviral est :

- prédictive de l'échec virologique en cas de monothérapie d'inhibiteur de protéase Lambert Niclot JID 2011,
- associée à la détection de virus dans le liquide séminal de patients ayant une charge virale plasmatique contrôlée Ghosn CID 2014•
- corrélée au niveau de la virémie résiduelle sous traitement Chun JID 2011.

Un nadir de lymphocytes CD4 bas ($< 200/\text{mm}^3$) est associé à un réservoir ADN-VIH plus important Lambert Niclot JID 2011.

Sur quels critères évaluer les stratégies d'allègement thérapeutique ?

- **Objectif principal : maintenir le succès virologique**
- **Objectif secondaires :**
 - **Sécurité :**
 - Virologique : ARN VIH us, ADN VIH, émergence de résistance
 - CD4 et événements cliniques
 - Inflammation résiduelle
 - Compartiment génital
 - **Bénéfices attendus**
 - Paramètres métaboliques
 - Qualité de vie et observance
 - Médico-économique

Risques potentiels : répllication résiduelle? Ré-ensemencement des réservoirs?

The FASEB Journal • Life Sciences Forum

Four days a week or less on appropriate anti-HIV drug combinations provided long-term optimal maintenance in 94 patients: the ICCARRE project

Jacques Leibowitch,^{*,1} Dominique Mathez,^{*} Pierre de Truchis,^{*} Damien Ledu,^{*} Jean Claude Melchior,^{*} Guislaine Carcelain,[†] Jacques Izopet,[‡] Christian Perronne,^{*} and John R. David[§]

FASEB J 29,2223-2234 (2015)

Traitement intermittent

TABLE 5. Total cell-associated HIV DNA before/under intermittent maintenance treatment

Measurement	Before ART	7 day treatment	4 day treatment	3, 2, and 1 day treatment
Mean (log ₁₀)	3.33	2.66	2.71	2.73
Median	3.47	2.80	2.73	2.66
Standard	0.49	0.47	0.50	0.35
Range	2.29–3.93	1.6–3.24	1.56–3.51	2.1–3.44
No. of patients	25	21	15	20

FASEB J 29,2223-2234 (2015)

➔ Mais nécessité d'études à plus long terme

4D : prospectif non randomisé, 96% efficacité (ARN VIH < 50 c/ml à S 48) (IAS Durban 2016)

A recommander ?Essai QUATUOR débute fin 2016 : randomisé, 640 patients

Conclusions : L'ADN-VIH en pratique :

- Moteur de l'infection VIH mais aussi « disque dur » de l'histoire de la maladie : l'ADN-VIH est utile pour évaluer passé, présent et futur
- Marqueur des réservoirs
 - Quantification standardisée, test reproductible, trousse commerciale qui facilite les comparaisons inter-laboratoires
- Marqueur pronostique
 - Avant traitement
 - Sous traitement
 - fortement corrélé avec la dynamique de l'infection et reflet de l'impact du traitement sur l'infection
 - **Permet d'aider à identifier les patients éligibles**
 - à une simplification thérapeutique : Ex : critère d'inclusion dans l'essai randomisé Trulight (NCT02302547) d'allègement pour bithérapie d'INTI (ADN VIH < 2,7 log cp/M PBMC)

-L'ADN VIH peut aider à définir les bons candidats à l'allègement.

Perspectives

- La valeur prédictive du niveau d'ADN VIH sur l'échec est à évaluer dans les différentes stratégies d'allègement.

Résultats disponibles pour monothérapie de DRVr, peu d'études et qui ne permettent pas de conclure en bithérapie car il y a peu d'échecs (Gubavu (ATV/DTG) JAC 2016, Maggiolo (DRVr-RIL JAIDS 2016, Prazuck (bithérapie INTI) HIV Clin Trials 2013)

- Niveau d'ADN VIH faible : rassurant pour une simplification,

- le seuil d'ADN VIH autorisé dans ces stratégies peut différer selon la puissance des ARV : seuil à déterminer pour chaque stratégie d'allègement envisagée

-Ex : va être évalué dans l'essai randomisé Moncay (stratégie de maintenance par monothérapie de DTG)

-Un ADN VIH élevé ne préjuge pas forcément de l'échec virologique : surveillance plus rapprochée chez ces patients lors d'une simplification?

Perspectives (2)

- L'ADN VIH peut aider à mesurer l'impact des stratégies d'allègement, notamment dans les compartiments profonds.

- ganglions
- compartiments génitaux
- GALT
- SNc

