(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) **N° de publication :** **2 810 049**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **00 07441**

(51) Int Cl[7] : **C 12 Q 1/70,** C 12 Q 1/68, C 07 H 21/00 // (C 12 Q 1/70, C 12 R 1:93)

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 09.06.00.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 14.12.01 Bulletin 01/50.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire :** *Se reporter à la fin du présent fascicule*

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(71) **Demandeur(s) :** *INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM Etablissement public à caractère scientifique et technologique* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** HANCE ALLAN, CLAVEL FRANCOIS, LECOSSIER DENISE et LEMIALE VALERIE.

(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire(s) :** BREESE MAJEROWICZ SIMONNOT.

(54) METHODE DE DETECTION ET/OU DE QUANTIFICATION DE VARIANTS MINORITAIRES AU SEIN D'UNE POPULATION VIRALE HETEROGENE DANS UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE.

(57) La présente invention a pour objet une méthode de détection et/ ou de quantification de variants minoritaires portant au moins une mutation au sein d'une population hétérogène de virus contenue dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes: (a) l'extraction des acides nucléiques contenus dans l'échantillon biologique, (b) l'amplification par PCR des acides nucléiques de l'étape (a) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique virale susceptible de porter la mutation, (c) la préparation d'un standard par amplification par PCR avec la même paire d'amorces qu'à l'étape (b) d'une séquence d'acide nucléique portant la mutation, (d) l'amplification par PCR en temps réel des produits d'amplification de l'étape (b) et du standard de l'étape (c) avec une paire d'amorces hautement conservées ne discriminant pas les séquences portant ou non la mutation, et la quantification du nombre de séquences d'acide nucléique virales portant ou non la mutation présentes dans l'échantillon, (e) l'amplification par PCR en temps réel des produits d'amplification de l'étape (b) et du standard de l'étape (c) avec une paire d'amorces spécifiques d'une séquence portant la mutation, et quantification du nombre de séquences d'acide nucléique virales portant la mutation présentes dans l'échantillon, (f) la comparaison des quantifications des étapes (d) et (e) pour déterminer la proportion de virus portant la mutation dans l'échantillon.

FR 2 810 049 - A1

2810049

METHODE DE DETECTION ET/OU DE QUANTIFICATION DE VARIANTS MINORITAIRES AU SEIN D'UNE POPULATION VIRALE HÉTÉROGÈNE DANS UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE.

La présente invention concerne une méthode de détection et/ou de quantification de variants minoritaires au sein d'une population virale hétérogène dans des échantillons biologiques. La présente invention s'applique plus particulièrement à la détection et/ou la quantification de variants minoritaires du virus d'immunodéficience humaine (VIH).

Chez les patients infectés par le VIH, le virus est représenté par une population hétérogène de variants viraux génétiquement distincts. Au cours des traitements antirétroviraux, à défaut de pouvoir totalement supprimer la réplication virale, on assiste à la sélection de variants viraux résistants. Ces variants sont porteurs de mutations dans la réverse transcriptase et/ou la protéase qui sont les principales cibles des traitements antirétroviraux. Au cours de l'échappement du virus à ces traitements, l'émergence de la résistance virale est un processus graduel au cours duquel les mutations s'accumulent progressivement, ce qui s'accompagne d'un niveau croissant de résistance.

Ces variants minoritaires pourraient jouer un rôle considérable dans l'évolution de la résistance au cours du traitement ou à la suite de changements de traitement. En effet, on suspecte que les mutants résistants qui émergent au tout début de l'échec d'un traitement antirétroviral ne représentent qu'une très faible minorité de la population virale. Ces virus minoritaires ne sont probablement pas détectables à ce stade, mais constituent la base de la sélection ultérieure de virus fortement résistants. Lorsque les virus résistants commencent à être détectés par les

tests génotypiques classiques, les virus fortement résistants sont déjà prêts à émerger.

De plus, lorsqu'un traitement antirétroviral doit être changé, le traitement de relais est choisi en fonction du génotype viral. La présence de virus minoritaires porteurs de mutations absentes des virus majoritaires pourrait participer à l'échec ultérieur du traitement de relais.

Enfin, lorsqu'un traitement antirétroviral en échec est interrompu, le virus plasmatique résistant est plus ou moins vite remplacé par un virus sensible de type sauvage. Chez de nombreux patients, ce remplacement semble souvent incomplet, dans la mesure où la réintroduction du traitement aboutit le plus souvent à la réémergence rapide du virus résistant. Cet échec semble être la conséquence de minorités faibles de virus résistant résiduel, persistant de façon prolongée après l'interruption thérapeutique.

La dynamique de l'évolution de la résistance du VIH n'a pas encore été examinée de façon approfondie. Une des raisons de ce manque d'informations est l'absence de moyens techniques capables d'analyser de façon précise et quantitative les sous-populations virales minoritaires, rares, ou limitées à des compartiments spécifiques de l'organisme.

Les tests génotypiques classiques (séquençage) après transcription inverse et amplification par polymérisation en chaîne (PCR) peuvent détecter la présence de mutations spécifiques, mais selon la mutation étudiée, les séquences mutées doivent représenter 10 à 50 % de la population totale pour être détectées (Günthard *et al.*, 1998, AIDS Res. Hum. Retroviruses, vol. 14, pages 869-76) et la procédure n'est pas strictement quantitative. De plus, la nécessité de séquencer des centaines ou des milliers de

clones pour obtenir une sensibilité même modeste rend cette approche peu pratique.

La technique de PCR sélective utilisant des amorces nucléotidiques spécifiques des séquences mutées et sauvages a été employée pour identifier la présence de mutations de résistance plutôt que pour les quantifier. Bien que supérieures aux techniques de séquençage, les techniques actuelles de PCR sélective ont certaines limitations. Pour une mutation de résistance donnée, les séquences mutées et sauvages diffèrent dans la plupart des cas par une seule paire de bases. Même quand ce mésappariement est placé dans la position la plus déstabilisante c'est-à-dire à l'extrémité 3' de l'amorce spécifique, l'amorce reconnaissant la séquence mutée permet également, avec une efficacité réduite, l'amplification de la séquence sauvage (Huang *et al.*, 1992, Nucleic Acids Res., vol. 20, pages 4567-73; Kwok *et al.*, 1990, Nucleic Acids Res., vol. 18, pages 999-1005). De ce fait, il est nécessaire de diluer les échantillons ou de diminuer le nombre de cycles d'amplification à un niveau où les signaux non spécifiques provenant de la séquence non désirée ne sont plus détectables après la PCR, ce qui limite la sensibilité du test. Une amélioration de la discrimination entre les séquences mutées et sauvages a été obtenue par l'introduction d'un ou plusieurs mésappariements additionnels dans l'extrémité 3' de l'amorce (Anderson *et al.*, 1994, Antiviral Res., vol. 25, pages 245-58 ; Larder *et al.*, 1991, AIDS, vol. 5, pages 137-44 ; De Milito *et al.*, 1995, Mol. Biotechnol., vol. 3, pages 166-9 ; Cha *et al.*, 1992, PCR Methods Appl., vol. 2, pages 14-20), mais l'effet de mésappariements additionnels n'a pas été évalué en détail. En outre, dans les tests actuellement décrits, les réactions de PCR ont déjà atteint la phase plateau de la réaction lors de la détection des produits d'amplification par électrophorèse ou hybridation. Dans ces conditions, un

échantillon donné peut être identifié comme ayant un profil « sauvage », « mutant » ou « mixte », mais la quantification du nombre de séquences mutées originellement présentes n'est pas possible.

Récemment, il a été décrit dans le brevet américain US 5,827,648 une méthode pour mesurer les populations relatives de deux variants d'une séquence nucléotidique cible. Cette méthode s'applique plus particulièrement à des variants du VIH et est basée sur une méthode d'hybridation différentielle. La sensibilité de cette méthode reste cependant modérée. Ainsi, aucun test permettant une quantification précise de séquences mutées en présence d'un excès de séquences sauvages n'est actuellement disponible.

La présente invention a précisément pour objet une nouvelle méthode de détection et/ou de quantification de virus portant au moins une mutation par exemple de résistance aux antiviraux au sein d'une population virale hétérogène contenu dans un échantillon biologique. La méthode de l'invention permet notamment de détecter la présence de variants minoritaires représentant moins de 1 % de la population virale.

Ce but est atteint selon l'invention grâce à une méthode de détection et/ou de quantification de variants minoritaires portant au moins une mutation au sein d'une population hétérogène de virus contenue dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) l'extraction des acides nucléiques contenus dans l'échantillon biologique,

b) l'amplification par PCR des acides nucléiques de l'étape (a) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique virale susceptible de porter la mutation,

c) la préparation d'un standard par amplification PCR avec la même paire d'amorces qu'à l'étape (b) d'une séquence d'acide nucléique portant la mutation,

d) l'amplification par PCR en temps réel des produits d'amplification de l'étape (b) et du standard de l'étape (c) avec une paire d'amorces hautement conservées ne discriminant pas les séquences portant ou non la mutation, et la quantification du nombre de séquences d'acide nucléique virales portant ou non la mutation présentes dans l'échantillon,

e) l'amplification par PCR en temps réel des produits d'amplification de l'étape (b) et du standard de l'étape (c) avec une paire d'amorces spécifiques d'une séquence portant la mutation, et quantification du nombre de séquences d'acide nucléique virales portant la mutation présentes dans l'échantillon,

f) la comparaison des quantifications des étapes (d) et (e) pour déterminer la proportion de virus portant la mutation dans l'échantillon.

On entend par amplification par PCR tant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) proprement dite que les techniques d'amplification qui en sont dérivées.

L'étape (a) d'extraction des acides nucléiques peut être réalisée par des techniques classiques à partir d'un échantillon biologique prélevé sur un patient infecté par le virus étudié. Les méthodes de préparation d'échantillons pour des analyses en biologie moléculaire sont bien connues de l'homme du métier. Tous les types d'échantillons biologiques pouvant contenir des populations virales comme des cellules, des tissus, des sécrétions biologiques ou des liquides biologiques sont utilisables pour la méthode objet de l'invention. Les échantillons

biologiques selon l'invention sont avantageusement du plasma.

La méthode de l'invention s'applique à toutes les familles de virus. Dans le cas de virus à ARN, comme le VIH ou le virus de l'hépatite C, l'étape (b) est une RT PCR en présence d'une paire d'amorces encadrant la séquence d'acide nucléique susceptible de porter la mutation.

L'étape (b) de l'invention est une amplification par PCR des acides nucléiques de l'étape (a) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique virale susceptible de porter la mutation. La paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique virale susceptible de porter la mutation est choisie de façon à amplifier avec la même efficacité les séquences qui portent la mutation et celles qui ne la portent pas. La paire d'amorces utilisée à l'étape (d) est également choisie de façon à amplifier avec la même efficacité les séquences qui portent ou non la mutation.

Le standard préparé à l'étape (c) de la méthode de l'invention correspond aux produits d'amplification d'une séquence portant la mutation étudiée, obtenus avec les mêmes amorces que pour l'étape (b) de la méthode de l'invention. La séquence portant la mutation étudiée et utilisée pour réaliser le standard peut être une séquence en acide nucléique d'un virus portant la mutation, une séquence en acide nucléique d'un virus sauvage dans lequel la mutation a été introduite par mutagenèse dirigée ou peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier qui permet d'obtenir une séquence capable de fournir par amplification avec les mêmes amorces que pour l'étape (b) un produit présentant les mêmes caractéristiques (séquence et longueur

identiques) que la séquence en acide nucléique d'un virus portant la mutation étudiée.

L'amplification par PCR en temps réel mise en œuvre aux étapes (d) et (e) de la méthode de l'invention est une technique récente qui permet la quantification rapide et précise d'ADN ou d'ADNc (Heid *et al.*, 1996, Genome Res., vol. 6, pages 986-94 ; Gibson *et al.*, 1996, Genome Res., vol. 6, pages 995-1001). Dans cette technique, les réactions d'amplification par PCR sont réalisées en présence d'une sonde conjuguée à ses extrémités 5' et 3', respectivement, avec un colorant fluorescent reporteur et un composé de réduction d'intensité de fluorescence. Avantageusement, le colorant fluorescent reporteur et le composé de réduction d'intensité de fluorescence aux extrémités de la sonde sont respectivement la 6-carboxy-fluorescéine (FAM) et la 6-carboxy-tétraméthylrhodamine (TAMRA). La sonde utilisée est spécifique d'une séquence présente aussi bien dans les produits d'amplification des étapes (d) et (e). Ainsi, la séquence de la sonde est choisie pour être complémentaire d'une région amplifiée aux étapes (d) et (e) qui ne comprend pas la mutation.

Au cours des réactions de PCR des étapes (d) et (e) de la méthode objet de l'invention, les produits d'amplification s'accumulent et se lient avec la sonde. L'activité 5'-3' exonucléase de la polymérase dégrade la sonde fluorogénique et sépare le composé de réduction d'intensité de fluorescence et le colorant fluorescent ce qui entraîne l'émission d'un signal fluorescent. La fluorescence émise est mesurée en continu et le nombre de cycles d'amplification nécessaires pour que la fluorescence dépasse un seuil donné (cycle seuil ou Cs) est déterminé aux étapes (d) et (e) de la méthode de l'invention.

La quantification du nombre total de séquences d'acide nucléique virales (portant ou non la mutation) dans l'échantillon de l'étape (d) et celle du nombre de séquences

d'acide nucléique mutées présentes dans l'échantillon de l'étape (e) sont réalisées en comparant le Cs avec une courbe étalon de Cs obtenue avec des dilutions du standard soumis à des amplifications dans les conditions des étapes (d) et (e).

La méthode selon l'invention est fondée sur la capacité d'amplifier de façon préférentielle des séquences comportant une mutation spécifique. Ainsi, à l'étape (e) de la méthode de l'invention, il est nécessaire d'utiliser une paire d'amorces dont l'une est complémentaire de la séquence présentant la mutation et présente donc un mésappariement avec la séquence non mutée. Tous les mésappariements n'étant pas équivalents, ce mésappariement pourrait ne pas empêcher une amplification de la séquence non mutée (sauvage), ce qui pourrait entraîner des signaux non-spécifiques.

Les inventeurs ont étudié ce phénomène dans le cadre de l'invention, et ont comparé plusieurs amorces sens couplées avec la même amorce antisens. Comme déjà décrit, l'adjonction d'un ou plusieurs mésappariements additionnels proches de l'extrémité 3' de l'amorce améliore considérablement la discrimination (Anderson *et al.*, 1994, Antiviral Res., vol. 25, pages 245-58 ; Larder *et al.*, 1991, AIDS, vol. 5, pages 137-44 ; De Milito *et al.*, 1995, Mol. Biotechnol., vol. 3, pages 166-9 ; Cha *et al.*, 1992, PCR Methods Appl., vol. 2, pages 14-20).

Afin de limiter le risque de signaux non-spécifiques, et donc pour réaliser une amplification sélective de la séquence mutée, la méthode de l'invention comprend à l'étape (e) la mise en œuvre d'une amorce sens spécifique de la séquence mutée présentant au moins un ou deux mésappariemments supplémentaires autre que la mutation étudiée.

Les inventeurs ont obtenu une discrimination optimale, sans réduire l'efficacité d'amplification des

séquences mutées, en utilisant à l'étape (e) une amorce sens spécifique de la séquence mutée présentant un mésappariement moyennement déstabilisant, autre que la mutation, en position -2 par rapport à l'extrémité 3' de l'amorce sens. La notion de « mésappariement moyennement déstabilisant » a été décrite par Huang *et al.* (1992, Nucleic Acids Res., vol. 20, pages 4567-73) et par Kwok *et al.* (1990, Nucleic Acids Res., vol. 18, pages 999-1005).

Les séquences portant ou non la mutation à étudier peuvent présenter une certaine variabilité génétique, par exemple présence d'autres mutations ou polymorphisme. Les inventeurs ont donc identifié les conditions des PCR en temps réel des étapes (d) et (e) à utiliser pour que la quantification des séquences présentant une mutation ne soit pas faussée par un éventuel polymorphisme dans le milieu et l'extrémité 5' des amorces. Ainsi, selon la méthode de l'invention, les PCR en temps réel des étapes (d) et (e) sont réalisées en présence de 3 à 5 mM de $MgCl_2$, avec plus de 100 mM de chacun des dNTP, avantageusement 200 mM de chacun des dNTP et à une température équivalente aux Tm des amorces utilisées.

Dans un mode préféré de réalisation de la méthode de l'invention, un contrôle supplémentaire permettant de déterminer la limite de sensibilité de la méthode est utilisé. Ce contrôle correspond à un standard identique à celui préparé à l'étape (c) mais ne présentant pas la mutation à étudier. Ce contrôle est amplifié par PCR en temps réel selon les conditions de PCR des étapes (d) et (e) de la méthode.

Les travaux réalisés dans le cadre de la présente invention ont concerné tout particulièrement l'application de la méthode selon l'invention à la détection et/ou la

quantification de variants minoritaires du VIH portant au moins une mutation de résistance au sein d'une population virale hétérogène contenue dans un échantillon biologique. De façon avantageuse, la méthode de l'invention permet de détecter et/ou de quantifier des variants minoritaires du VIH portant au moins une mutation de résistance dans la séquence de la protéase au sein d'une population virale hétérogène contenue dans un échantillon biologique. Plus précisément, la méthode de l'invention permet de détecter et/ou de quantifier des variants minoritaires du VIH portant la mutation de résistance V82A ou L90M dans la séquence de la protéase au sein d'une population virale hétérogène contenue dans un échantillon biologique.

L'invention se rapporte donc tout spécialement à la méthode décrite précédemment appliquée à la détection et/ou la quantification des variants minoritaires du VIH portant l'une au moins des mutations de résistance V82A ou L90M dans la séquence de la protéase, au sein d'une population virale hétérogène contenue dans un échantillon biologique.

Une forme de mise en œuvre préférée de cette application de la méthode de l'invention est caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes:

a) l'extraction des ARN contenus dans l'échantillon biologique,

b) l'amplification par RT PCR des ARN de l'étape (a) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique virale susceptible de porter la mutation V82A ou L90M, cette paire d'amorces étant SEQ ID No.1 et SEQ ID No.2 dans la liste de séquences en annexe,

c) la préparation d'un standard par amplification par PCR avec la même paire d'amorces qu'à l'étape (b) d'une séquence d'acide nucléique portant la mutation V82A ou L90M,

d) l'amplification par PCR en temps réel des produits d'amplification de l'étape (b) et du standard de

l'étape (c) avec une paire d'amorces hautement conservées ne discriminant pas les séquences portant ou non la mutation V82A ou L90M,, cette paire d'amorces étant SEQ ID No.3 et SEQ ID No.4 dans la liste de séquences en annexe, et quantification du nombre de séquences d'acide nucléique virales portant ou non la mutation V82A ou L90M présentes dans l'échantillon,

e) l'amplification par PCR en temps réel des produits d'amplification de l'étape (b) et du standard de l'étape (c) avec une paire d'amorces spécifiques d'une séquence portant la mutation V82A ou L90M, et quantification du nombre de séquences d'acide nucléique virales portant la mutation V82A ou L90M présentes dans l'échantillon,

f) la comparaison des quantifications des étapes (d) et (e) pour déterminer la proportion de virus portant la mutation V82A ou L90M, dans l'échantillon.

L'étape (e) de la méthode pour détecter et/ou quantifier des variants minoritaires du VIH portant la mutation de résistance V82A dans la séquence de la protéase au sein d'une population virale hétérogène contenue dans un échantillon biologique est avantageusement réalisée avec la paire d'amorces référencées comme SEQ ID No.4 et SEQ ID No.6 dans la liste des séquences en annexe.

L'étape (e) de la méthode pour détecter et/ou quantifier des variants minoritaires du VIH portant la mutation de résistance L90M dans la séquence de la protéase au sein d'une population virale hétérogène contenue dans un échantillon biologique est avantageusement réalisée avec la paire d'amorces référencées comme SEQ ID No.4 et SEQ ID No.7 dans la liste des séquences en annexe.

L'invention concerne également les paires d'amorces utilisées dans les différentes étapes de la

méthode de détection et/ou de quantification des variants minoritaires du VIH portant l'une au moins des mutations de résistance V82A ou L90M dans la séquence de la protéase, au sein d'une population virale hétérogène contenue dans un échantillon biologique.

L'invention concerne une paire d'amorces susceptible d'être mise en œuvre à l'étape (b) de la méthode et de séquence SEQ ID No.1 et SEQ ID No.2 dans la liste de séquences en annexe.

L'invention concerne aussi une paire d'amorces susceptible d'être mise en œuvre à l'étape (d) de la méthode et de séquence SEQ ID No.3 et SEQ ID No.4 dans la liste de séquences en annexe.

L'invention s'applique à une paire d'amorces susceptible d'être mise en œuvre à l'étape (e) de la méthode et de séquence SEQ ID No.4 et SEQ ID No.6 ou de séquence SEQ ID No.4 et SEQ ID No.7 dans la liste de séquences en annexe.

L'invention concerne également une sonde susceptible d'être mise en œuvre aux étapes (d) et (e) de la méthode et de séquence SEQ ID No.5 dans la liste de séquences en annexe.

La méthode de l'invention trouve donc de nombreuses applications comme bien entendu :

- l'étude de la dynamique de l'émergence de mutations dans des populations virales, par exemple, au cours de traitements antiviraux,
- l'évolution des populations de virus mutés lors des interruptions pharmaceutiques,
- l'appréciation plus précise de la réponse ou de l'échec des traitements antiviraux conduisant à des décisions thérapeutiques plus efficaces.

L'invention concerne aussi un kit pour la mise en œuvre de la méthode de l'invention. Un tel kit est caractérisé en ce qu'il comprend les réactifs suivants :

- une paire d'amorces encadrant le segment susceptible de porter une mutation,
- une paire d'amorces hautement conservées ne discriminant pas les séquences mutées et non mutées,
- une paire d'amorces spécifiques des séquences mutées,
- une sonde conjuguée à ses extrémités 5' et 3', respectivement, avec un colorant fluorescent reporteur et un composé de réduction d'intensité de fluorescence, spécifique des produits d'amplification des étapes (c) et (d) de la méthode selon l'invention,
- un séquence d'acide nucléique portant la mutation pour la préparation d'un standard par amplification PCR avec la paire d'amorces encadrant le segment susceptible de porter une mutation,
- les produits et réactifs nécessaires pour réaliser les différentes amplifications par PCR.

L'invention concerne un kit pour la détection et/ou la quantification de variants minoritaires du VIH portant la mutation de résistance aux antirétroviraux V82A ou L90M dans la séquence de la protéase qui comprend les réactifs suivants :

- la paire d'amorces encadrant le segment susceptible de porter une mutation de séquence SEQ ID No.1 et SEQ ID No.2 dans la liste de séquences en annexe,
- la paire d'amorces hautement conservées ne discriminant pas les séquences mutées et non mutées de séquence SEQ ID No.3 et SEQ ID No.4 dans la liste de séquences en annexe,
- la paire d'amorces spécifiques des séquences portant la mutation V82A de séquence SEQ ID No.4 et SEQ ID No.6 dans la liste de séquences en annexe et la paire

d'amorces spécifiques des séquences portant la mutation L90M de séquence SEQ ID No.4 et SEQ ID No.7 dans la liste de séquences en annexe,

- la sonde conjuguée à ses extrémités 5' et 3', respectivement, avec un colorant fluorescent reporteur et un composé de réduction d'intensité de fluorescence de séquence SEQ ID No.5 dans la liste de séquences en annexe.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent et qui font référence aux figures suivantes :

- la figure 1 présente la quantification par PCR séquence-sélective des populations virales exprimant la mutation de résistance L90M. L'ARN est extrait des échantillons cliniques et les ARN correspondant au gène de la protéase ont été amplifiés par RT-PCR. Les produits d'amplification ont été dilués et la quantité d'ADN présent a été quantifiée par PCR en temps réel réalisée en utilisant la paire d'amorces non séquence-sélectives F3/R1 de séquence SEQ ID No.3 et SEQ ID No.4 dans la liste de séquences en annexe (A). Pour tous les échantillons, la quantité d'ADN présent est déterminé grâce à une courbe standard obtenue à partir de dilutions d'ADN provenant de l'amplification d'un plasmide contenant la séquence de la protéase de pNL4-3 dans lequel la mutation L90M a été introduite par mutation dirigée (O-O). La même quantité d'ADNc est amplifiée dans des réactions parallèles en utilisant une paire d'amorces séquence-sélectives M2-L90M/R1 de séquence SEQ ID No.4 et SEQ ID No.7 dans la liste de séquences en annexe (B). Les échantillons obtenus à partir de patients non traités (■) se superposent avec la courbe obtenue avec de l'ADN standard contenant la séquence sauvage (□-□), alors que les échantillons obtenus à partir de patients en échec de traitement thérapeutique dont le génotypage a montré qu'ils présentent des virus exprimant de multiples mutations de

résistance parmi lesquelles L90M (●) correspondent à la courbe obtenue avec de l'ADN standard contenant la mutation L90M (O-O). Les échantillons contenant 41 % de séquences mutées (▲) ou 3 % de séquences mutées (▼) ce qui a été montré par analyse des clones dérivés de réactions PCR parallèles donnent des résultats intermédiaires proches des valeurs prédites (lignes brisées). Il faut noter que les échantillons contenant moins de 0,1 % de séquences mutées peuvent être distinguées des échantillons contenant uniquement des virus sauvages.

- la figure 2 présente les cinétiques de conversion de virus mutées en virus sauvages suite à des interruptions structurées de traitement. Le plasma provient de 5 patients différents aux temps indiqués avant et après l'IT et le pourcentage de séquences virales exprimant les mutations de résistance V82A (■) et L90M (▲) est déterminé par PCR séquence-sélective. Les valeurs dans la zone ombragée (« U ») sont sous la limite de détection (< 1 % pour V82A et < 0,05 % pour L90M). La charge virale plasmatique (O) est déterminée par Monitor (Roche). Par un génotypage standard, tous les patients présentent la mutation V82A et les patients 1, 4 et 5 ont la mutation L90M avant l'IT. Les mutations V82A et L90M sont indétectables par génotypage standard à 3, 4, 2 et 2 mois respectivement pour les patients 1, 2, 3 et 5. Les flèches indiquent le moment où une thérapie antirétrovirale est reprise.

I. Matériel et méthodes.

I-1. Patients.

Le sang périphérique a été obtenu à partir de patients infectés par le VIH avant et suite à l'interruption de toute thérapie antirétrovirale et le plasma a été conservé à -80°C. Tous les patients ont donné leur consentement avant de suivre l'IT.

I-2. Préparation de l'ADNc viral.

Le plasma (0,5 à 1 ml) a été centrifugé à 23,500xg pendant une heure à 4°C et l'ARN a été extrait à partir du culot et élué dans 60 µl d'eau. Quinze µl d'ARN ont été utilisés pour la RT-PCR (Titan One Tube RT-PCR kit, Boehringer Mannheim) selon les instructions du fournisseur et en utilisant à la concentration finale de 0,4 µM les amorces ProtF1 (5'-CTTTAGCTTCCCTCAGATCACTC) et ProtR1 (5'-CCTGGCTTTAATTTTACTGGTACA) respectivement SEQ ID No.1 et SEQ ID No.2 dans la liste de séquences en annexe. Les conditions de la RT-PCR sont les suivantes : dénaturation à 94°C pendant 30 sec, hybridation à 52°C pendant 30 sec, extension à 68°C pendant 45 sec ; 40 cycles.

I-3. Quantification des populations virales contenant des mutations de résistance en utilisant la PCR en temps réel.

Les mutations de résistance V82A (GTC → GCC) et L90M (TTG → ATG) ont été introduites dans le plasmide pNL4-3 par mutagenèse dirigée comme déjà décrit par Petit *et al.* (1999, J. Virol., vol. 73, pages 5079-88) et vérifiées par séquençage. L'ADN plasmidique des plasmides sauvage, V82A et L90M a été ensuite amplifié par PCR en utilisant la paire d'amorces ProtF1/ProtR1. Les produits de cette amplification ont été utilisés comme standard, afin de s'assurer que les échantillons (ADNc viral) et les standards utilisés pour la PCR en temps réel se trouvent dans la même forme.

Pour quantifier la proportion de séquences exprimant la mutation V82A, les produits obtenus par RT-PCR ont été dilués dans un tampon Tris à 10 mM au pH de 7,4 contenant de l'EDTA à 0,1 mM et de l'ADN de sperme de hareng à 100 ng/ml (Sigma) (habituellement 10^{-4} -10^{-6}) et des aliquotes de 10 µl ont été ajoutés aux réactions de PCR permettant l'amplification non-sélective de toutes les

séquences virales ou l'amplification préférentielle des séquences contenant la mutation V82A. Pour l'amplification non-sélective, les conditions de réaction sont, dans un volume total de 50 µl, du tampon Taqman 1X, du MgCl2 à 3 mM, chaque dNTP à 200 nM, chaque amorce à 100 nM F3 (5'-GGTACAGTATTAGTAGGACCTACA) et R1 (5'-TGGTACAGTTTCAATAGGACTAAT), la sonde TaqMan à 50 nM [5'-(6-Fam)CTCAGATTGGTTGCACTTTAAATTTTCC(Tamra)(phosphate)], l'uracil-n-glycosylase à 0,5U et la Taq polymérase AmpliTaq Gold à 1,25 U. Les amorces F3, R1 et la sonde TaqMan correspondent respectivement aux séquences SEQ ID No.3, SEQ ID No.4 et SEQ ID No.5 dans la liste de séquences en annexe. Pour l'amplification préférentielle de V82A, les conditions sont identiques, exceptée l'amorce F3 remplacée par l'amorce M2-V82A (5'-TATTAGTAGGACCTACACCAGC ; SEQ ID No.6 dans la liste de séquences en annexe). Les réactifs et le matériel ont été fournis par Perkin-Elmer, les oligonucléotides ont été synthétisés par Genset. Les échantillons ont été évalués par PCR en temps réel (Heid *et al.*, 1996, Genome Res., vol. 6, pages 986-94 ; Gibson *et al.*, 1996, Genome Res., vol. 6, pages 995-1001) en utilisant le système de Perkin-Elmer 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) en utilisant les paramètres de cycles suivants : 50°C x 2 min ; 95°C x 10 min ; suivie de 40 cycles à 95°C x 15 sec et 50°C x 1 min. Le nombre de cycles nécessaire pour atteindre la fluorescence seuil (Cs) est déterminé et la quantité de séquences initialement présentes est calculée par extrapolation sur la courbe standard. Les mêmes dilutions de standard (produits d'amplification produits via le plasmide V82A) sont utilisées pour à la fois les amplifications non-sélective et sélective de V82A. Le pourcentage de séquences virales est calculé selon la formule : % de séquences mutées = [quantité de séquences mutées dans l'échantillon)/(quantité totale de séquences dans l'échantillon)] x 100. Pour quantifier la proportion de

séquences exprimant la mutation L90M, des techniques analogues sont utilisées, exceptée l'amorce M2-V82A remplacée par l'amorce M2-L90M (5'-AACATAATTGGAAGAAATCAGA ; SEQ ID No.7 dans la liste de séquences en annexe). Des dilutions des produits d'amplification générés à partir du plasmide L90M sont utilisées pour réaliser la courbe standard.

Les amplifications non-sélectives et sélectives sont toujours réalisées en même temps. Toutes les réactions sont réalisées en double et la moyenne des deux valeurs est utilisée pour les calculs. Bien que les réactions réalisées en utilisant les amorces M2-V82A et M2-L90M amplifient des séquences contenant les mutations correspondantes plus efficacement que les séquences sauvages, des produits d'amplification résultant de l'amplification des séquences sauvages sont générés. Lorsque des échantillons contenant uniquement des séquences sauvages sont analysés comme décrit ci-dessus, les résultats indiquent la présence apparente de 0,6 ± 0,2% (moyenne ± DS, n = 10) de séquences mutées en utilisant le système V82A et de 0,01 ± 0,02% (moyenne ± DS, n = 10) de séquences mutées en utilisant le système L90M. Basée sur ces résultats, la limite de sensibilité a été définie comme la moyenne + 2 DS de ces valeurs soit 1% pour V82A et 0,05% pour L90M.

I-4. Evaluation des produits PCR clonés.

Pour valider les résultats obtenus par PCR séquence-sélective utilisant une technique indépendante et pour évaluer le génotype des populations virales minoritaires exprimant les mutations V82A et L90M, des aliquotes des réactions initiales de RT-PCR sont amplifiés en utilisant les amorces F4 (5'-CTCAGATCACTCTTTGGCA ; SEQ ID No.8 dans la liste de séquences en annexe) et R1, et les produits sont clonés dans pCR4-TOPO (Invitrogen) puis utilisés pour transfecter *E. coli*. Les colonies sont mises à

pousser sur des boîtes LB. Pour évaluer la proportion de clones contenant des séquences sauvages ou mutées (V82A ou L90M), des colonies individuelles sont transférées sur 200 µl de milieu LB. Après une incubation toute la nuit à 37°C, les cultures sont remises en suspension, diluées à 1 :50 dans de l'eau, et des aliquotes de 10 µl sont évalués par PCR en temps réel comme décrit ci-dessus. Les clones contenant les séquences sauvages ou mutées sont facilement distinguées en comparant le Cs obtenu pour les réactions réalisées en utilisant les conditions de PCR séquence- ou non-séquence-sélective (clones mutants, $\Delta Cs < 2$ cycles ; clones sauvages, $\Delta Cs \approx 10$ cycles). L'ADN plasmidique des clones représentatifs est purifié et les inserts séquencés. Les données du séquençage confirment l'identification des clones sauvages et mutants dans tous les cas (27 clones).

II. Résultats.

II-1. Détection des mutations de résistance en utilisant la PCR en temps réel.

La présence de mésappariements entre l'amorce et sa cible en partie 3' de l'oligonucléotide diminue l'efficacité de l'amplification par PCR (Huang *et al.*, 1992, Nucleic Acids Res., vol. 20, pages 4567-73; Kwok *et al.*, 1990, Nucleic Acids Res., vol. 18, pages 999-1005). En utilisant la PCR en temps réel, il est possible de mesurer avec précision les différences dans l'efficacité d'amplification en déterminant le nombre de cycles (cycle seuil ou Cs) nécessaires pour générer un signal fluorescent spécifique. Le clivage permet la séparation physique du groupe fluorescent (FAM) et du quencheur (TAMRA) présent dans la sonde non clivée. Cette approche est utilisée pour quantifier la proportion de séquences virales dans les échantillons cliniques contenant les mutations V82A et L90M

dans le gène de la protéase associées avec la résistance aux inhibiteurs de protéases.

Dans des études initiales, des oligonucléotides qui permettent une discrimination adéquate entre les séquences sauvages et mutées ont été identifiés. Lorsqu'une amorce appariée parfaitement avec les séquences contenant la mutation de résistance V82A (et donc produisant un mésappariement A-C en partie 3' avec la séquence sauvage) est utilisée, l'amplification de la séquence sauvage est, comme attendu, retardée mais la différence de 1,2 cycles dans le Cs (correspondant à une diminution d'un facteur 2,3 de l'efficacité d'amplification) ne permet pas une bonne discrimination entre les deux séquences. Comme précédemment décrit (Larder *et al.*, 1991, AIDS, vol. 5, pages 137-44; Cha *et al.*, 1992, PCR Methods Appl., vol. 2, pages 14-22), l'addition d'un mésappariement supplémentaire en position -2 par rapport à l'extrémité 3' de l'oligonucléotide déstabilise considérablement l'amplification des séquences sauvages, alors que cette seule mutation a peu d'effet sur l'amplification de la séquence V82A. En utilisant cet oligonucléotide, un ΔCs supérieur à 10 cycles est observé en comparant l'amplification de standard sauvage et V82A, ce qui correspond à une diminution dans l'efficacité de l'amplification de la séquence sauvage d'un facteur supérieur à 1000. En utilisant une approche similaire, un oligonucléotide permettant une amplification préférentielle de séquences contenant la mutation L90M a été identifié. Le mésappariement avec la séquence sauvage produit par l'alignement de l'oligonucléotide reconnaissant la séquence L90M est intrinsèquement plus déstabilisant que celui produit par l'oligonucléotide reconnaissant V82A, ce qui entraîne une meilleure discrimination (ΔCs = 15 cycles, correspondant à une diminution dans l'efficacité de l'amplification de la séquence sauvage d'un facteur supérieur à 30000). Ces oligonucléotides sont utilisés pour

quantifier des populations minoritaires de séquences mutées dans les échantillons cliniques.

L'ARN a été purifié à partir de plasma et l'ARN correspondant au gène de la protéase a été amplifié par PCR. Ces produits d'amplification ont été dilués et quantifiés par PCR en temps réel en utilisant une paire d'amorces qui ne fait pas la différence entre les séquences sauvages et mutées (Figure 1A). Lorsque ces produits de PCR ont été analysés en utilisant une paire d'amorces qui amplifient de façon préférentielle les séquences contenant la mutation L90M, les échantillons provenant de patients non-traités ont donné des résultats qui suivent la courbe obtenue en utilisant le standard contenant la séquence sauvage (Figure 1B, cercles pleins), alors que les échantillons de patients en échec de traitement virologique qui ont été démontrés par génotypage standard comme contenant de nombreuses mutations de résistance parmi lesquelles L90M se superposent avec la courbe obtenue avec le standard L90M (Figure 1B, carrés pleins). Cet enseignement et d'autres résultats démontrent que, sous les conditions de réaction utilisées dans cette étude, la présence de polymorphismes ou d'autres mutations de résistance dans la plupart des échantillons cliniques n'affectent pas l'efficacité de l'amplification des séquences sauvages et des séquences avec la mutation V82A ou L90M (Christopherson *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res., vol. 2, pages 14-20). Au contraire, lorsque les échantillons contenant une population minoritaire de séquences virales avec la mutation L90M sont analysés, les résultats se situent entre ceux obtenus pour les échantillons contenant seulement soit les séquences sauvages, soit les séquences mutées (Figure 1B, triangles), et correspondent assez bien aux valeurs déterminées en évaluant les clones dérivés de réactions de PCR parallèles réalisées sur ces échantillons. Il faut noter que les échantillons contenant de l'ordre de 0,05 % des séquences avec la mutation L90M peuvent être

distingués avec cette approche des échantillons contenant uniquement des séquences sauvages. Des résultats identiques sont obtenus pour la détection de mutants V82A, exceptée la sensibilité du test qui est approximativement de 1 % de séquences mutées.

II-2. Evaluation des cinétiques de disparition des formes résistantes durant l'IT.

Des patients infectés par le VIH-1 avec des souches virales grandement résistantes aux antirétroviraux suivant une IT ont été identifiés. Les échantillons plasmatiques de ces patients ont été analysés suivant la technique de l'invention avant et suite à l'interruption de tout traitement antirétroviral. La proportion des souches virales contenant les souches L90M et/ou V82A en fonction du temps est montrée à la Figure 2. Avant l'arrêt de la thérapie, une grande proportion de souches mutantes sont présentes. Un mois après l'arrêt de la thérapie, les souches résistantes restent prédominantes dans les 3 patients testés. Par la suite, la proportion des souches mutantes diminue chez la plupart des patients. Lorsque des échantillons obtenus 3 mois après l'arrêt de la thérapie sont analysés par un génotypage standard, une apparente conversion en séquences sauvages est observée chez 4 des 5 patients. Lorsque les échantillons obtenus plus de 3 mois après l'arrêt de la thérapie sont analysés par PCR en temps réel, des souches virales résistantes résiduelles sont encore présentes chez 3 des 5 patients, bien que un seul de ces patients présente plus de 5 % de souches résistantes. Les souches virales mutantes sont devenues par la suite indétectables par PCR en temps réel chez 3 patients, mais la durée de l'interruption de traitement nécessaire est plutôt variable (moins de 2 mois, entre 2 et 4 mois et entre 3 et 5 mois respectivement pour les patients 3, 5 et 2). Chez les deux autres patients, les séquences virales mutantes sont

encore présentes lorsque la thérapie est reprise après 5 à 6 mois d'interruption.

II-3. Génotypage des souches résistantes présentes durant l'IT.

Pour confirmer ces résultats et évaluer le génotype des populations virales minoritaires exprimant les mutations V82A et L90M, des aliquotes des réactions RT-PCR réalisées sur les échantillons de deux patients avant et à différents temps après l'arrêt de la thérapie sont amplifiés à nouveau en utilisant des amorces qui ne font pas la différence entre les séquences sauvage et mutantes (F4/R1). Les produits d'amplification sont clonés et la proportion de clones contenant des séquences mutantes déterminée. Comme montré dans le Tableau 1, les résultats obtenus par PCR en temps réel séquence-sélective et ceux obtenus par l'évaluation des clones sont concordantes. De plus, des clones sauvages et mutants représentatifs sont séquencés. Tous les clones dérivés à partir des échantillons obtenus avant l'arrêt de la thérapie contiennent toutes les mutations de résistance identifiées par génotypage standard (Tableau 1). Inversement, la plupart des clones provenant d'échantillons obtenus 5 mois après l'arrêt de la thérapie qui ne présentent pas la mutation V82A ou L90M présentent un génotype sauvage chez les deux patients.

De façon surprenante, les clones contenant des mutations de résistance identifiés dans les échantillons 5 mois (patient 1) ou 3 mois (patient 2) après l'IT ne sont pas homogènes et la plupart ont un génotype intermédiaire entre celui d'une population grandement mutante présente avant l'interruption de la thérapie et une population sauvage majoritaire qui émerge après l'IT. Par exemple, 3 à 4 % de la population virale présente chez le patient 2, 3 mois après l'IT ont les mutations V82A et/ou L90M mais les résultats obtenus par clonage indiquent que ces mutations

sont présentes dans les populations partiellement non-chevauchantes. Parmi les 5 clones minoritaires identifiés, un clone présente toutes les 7 mutations (clone F), un second présente 5 des 7 mutations dont L90M mais pas V82A (clone G), et un troisième présente 4 des 7 mutations dont L90M et V82A (clone H) et les autres clones contiennent L90M en association avec une autre mutation (clone I) ou seule (clone J).

L'analyse génétique indique que ces virus avec un génotype de résistance intermédiaire sont apparus par deux mécanismes distincts : réémergence de génomes viraux sélectionnés aux premiers stades de la résistance aux drogues et recombinaison entre des souches sauvages et résistantes. Le premier mécanisme est illustré par le clone B (patient 1, Tableau 1) qui porte seulement 2 des 5 mutations de résistance présentes dans les souches avant l'IT I54V et V82A. L'analyse phylogénétique de ce clone est plus proche des virus sauvages post-IT que des virus résistants pré-IT, ce qui suggère fortement qu'il n'a pas été généré par une réversion sélective des mutations de résistance. De façon similaire, l'analyse du génotype écarte une production par recombinaison. L'histoire clinique de ce patient est en accord avec l'idée que ce clone résulte de la réémergence de génomes viraux sélectionnés dans les stades précoces de la résistance aux antirétroviraux. En effet, le clone B contient les mutations de résistance typiques d'une résistance au indinavir mais ne présente pas la mutation G48V. Cette dernière mutation grandement typique d'une résistance au saquinavir a dû être sélectionnée ultérieurement après que le patient a changé pour un traitement avec du saquinavir suite à un échec initial avec un traitement avec du indinavir. La réémergence de quasi-espèces préexistantes est certainement l'explication pour le clone G du patient 2 bien qu'une réversion sélective des mutations A71V et V82A soit plus difficile à exclure, parce

que ce virus avec une résistance intermédiaire est plus proche des virus résistants pré-IT que des virus sauvages post-IT.

Au contraire, l'analyse des séquences suggère fortement que plusieurs des autres clones sont générés via des recombinaisons, par exemple, clone C (patient 1) et clones H-I (patient 2). Pour chaque cas, une extrémité de la protéase porte des motifs de la séquence en acide nucléique qui sont typiques de virus sauvages post-IT alors que le reste de la séquence contient un polymorphisme caractéristique des virus résistants pré-IT. Plusieurs éléments indiquent que ces recombinaisons sont survenues *in vivo* et non durant l'amplification avant le clonage. Par exemple, le clone C du patient 1 contient plusieurs polymorphismes en 5' qui ne sont pas typiques de virus résistants pré-IT, or ce recombinant est présent dans un échantillon qui ne contient aucun virus résistant détectable qui pourrait servir de source pour ces motifs durant la PCR.

Tableau 1 : Proportion et génotype des clones exprimant les mutations de résistance V82A et L90M obtenus à différents temps après l'IT*.

Patient	Mois après l'IT	% muté PCR	clones mutés (95% interval. conf)	Nombre séquencé	Génotype	Nombre et désignation
1	-3	80% V82A	12/12 V82A (76-100%)	4 (82A)	L10I G48V I54V A71V V82A	4 **A**
		3% V82A	1/88 V82A (0-6%)	1 (82A)	I54V V82A	1 **B**
				5 (82V)	L10I	1 **C**
					Type sauvage	4 **D**
2	0	94% L90M	21/21 L90M (86-100%)	5 (90M)	L10I V32I M46I L63P A71V V82A L90M	5 **E**
	2	30% V82A	14/34 V82A (26-62%)			
	3	3% V82A	2/80 V82A (0-9%)	2 (82A)†	L10I V32I M46I L63P A71V V82A L90M	1 **F**
		4% L90M	5/161 L90M (3-10%)	5 (90M)	L10I V32I M46I L63P L90M	1 **G**
					L63P A71V V82A L90M	1 **H**
					L63P L90M	1 **I**
					L90M	1 **J**
	5	<0,05% L90M	0/28 L90M (0-10%)	5 (90L)	Type sauvage	5 **K**

* le pourcentage de séquences virales exprimant la mutation L90M et/ou V82A dans les échantillons de patients obtenus au temps indiqué après l'IT est déterminé par une PCR séquence-sélective (« PCR ») et par évaluation de clones dérivés de réaction PCR parallèles (« clones mutés »). Les résultats pour les clones sont présentés comme le nombre de clones contenant la mutation indiquée/ au nombre total de clones testés. Le pourcentage de clones mutés exprimé comme un intervalle de confiance de 95% est indiqué entre paranthèses. † ces clones sont les mêmes que les clones F et H identifiés dans les clones exprimant L90M.

2810049

II-4. Quantification des souches exprimant les mutations de résistance après une IT de 3 mois.

Pour évaluer si une IT d'une durée de 3 mois communément utilisée est suffisante pour éliminer complètement les virus résistants, la proportion de virus exprimant les mutations V82A et L90M a été quantifiée chez les patients qui suivent une IT depuis 3 mois et pour lesquels un génotypage conventionnel révèle une apparente totale reconversion en virus sauvage. Pour les 13 patients avec des mutations V82A ou L90M avant l'interruption du traitement, des populations minoritaires exprimant ces mutations de résistance sont encore détectables après une IT de 3 mois dans 9 cas (Table II). La proportion de souches virales exprimant V82A et L90M diminue chez les patients présentant les deux mutations avant l'IT. Cependant, il convient de noter que la proportion de populations résiduelles avec V82A est plus importante que celle des populations L90M chez les 3 patients avec des populations résistantes détectables après l'IT, ce qui est en accord avec la présence de souches avec des génotypes de résistance intermédiaires, comme décrit ci-dessus. La spécificité de la méthode de PCR séquence-sélective apparaît valable puisque les virus avec les mutations V82A ou L90M ne sont jamais détectées chez les individus qui ne présentent pas la mutation correspondante avant l'IT.

Tableau 2 : Détection des populations virales minoritaires exprimant les mutations de résistance V82A et/ou L90M dans le plasma de patients après une IT de 3 mois †.

Technique	Temps d'évaluation	Résultats du génotypage ou quantification des souches virales mutantes par PCR								
Génotype	Avant IT	82A 90M			82A 90L			82V 90M		
	Après 3 mois	82V 90L			82V 90L			82V 90L		
PCR	Après 3 mois	Patient	% V82A	% L90M	Patient	% V82A	% L90M	Patient	% V82A	% L90M
		17	21	13	8	9	sld	23	sld	9
		2	15	6	13	4	sld	1	sld	5
		3	9	0,1	12	3	sld	15	sld	2
		21	sld*	sld	19	sld	sld	14	sld	sld

† des patients infectés par le VIH ont été testés après une IT de 3 mois et ont été identifiés les patients pour lesquels le génotypage standard révèle une réversion apparemment complète en virus sauvage. La proportion de séquences virales contenant la mutation de résistance V82A et/ou L90M est déterminée par une PCR séquence-sélective pour tous les patients dont le génotype avant l'IT contient la mutation de résistance V82A et/ou L90M. * sld signifie « sous la limite de détection » qui est inférieure à 1% pour V82A et inférieure à 0,05% pour L90M.

REVENDICATIONS

1) Méthode de détection et/ou de quantification de variants minoritaires portant au moins une mutation au sein d'une population hétérogène de virus contenue dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) l'extraction des acides nucléiques contenus dans l'échantillon biologique,

b) l'amplification par PCR des acides nucléiques de l'étape (a) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique virale susceptible de porter la mutation,

c) la préparation d'un standard par amplification PCR avec la même paire d'amorces qu'à l'étape (b) d'une séquence d'acide nucléique portant la mutation,

d) l'amplification par PCR en temps réel des produits d'amplification de l'étape (b) et du standard de l'étape (c) avec une paire d'amorces hautement conservées ne discriminant pas les séquences portant ou non la mutation, et la quantification du nombre de séquences d'acide nucléique virales portant ou non la mutation présentes dans l'échantillon,

e) l'amplification par PCR en temps réel des produits d'amplification de l'étape (b) et du standard de l'étape (c) avec une paire d'amorces spécifiques d'une séquence portant la mutation, et quantification du nombre de séquences d'acide nucléique virales portant la mutation présentes dans l'échantillon,

f) la comparaison des quantifications des étapes (d) et (e) pour déterminer la proportion de virus portant la mutation dans l'échantillon.

2) Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que les variants minoritaires appartiennent à toutes les familles de virus.

3) Méthode selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que les variants minoritaires sont des virus à ARN et en ce que l'étape (b) est une RT PCR en présence d'une paire d'amorces encadrant la séquence d'acide nucléique susceptible de porter la mutation.

4) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les paires d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique virale susceptible de porter la mutation des étapes (b) et (d) sont choisies de façon à amplifier avec la même efficacité les séquences qui portent la mutation et celles qui ne la portent pas.

5) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la séquence portant la mutation utilisée pour réaliser le standard de l'étape (c) est une séquence en acide nucléique d'un virus portant la mutation, ou une séquence en acide nucléique d'un virus sauvage dans lequel la mutation a été introduite par mutagenèse dirigée ou tout autre séquence capable de fournir par amplification avec les mêmes amorces que pour l'étape (b) un produit présentant les mêmes caractéristiques que la séquence en acide nucléique d'un virus portant la mutation.

6) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que les étapes (d) et (e) sont réalisées avec une sonde conjuguée à ses extrémités 5' et 3', respectivement, avec un colorant

fluorescent reporteur et un composé de réduction d'intensité de fluorescence, ladite sonde étant spécifique d'une séquence présente aussi bien dans les produits d'amplification des étapes (d) et (e).

7) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la fluorescence émise lors des étapes (d) et (e) est mesurée en continu et le nombre de cycles d'amplification nécessaires pour que la fluorescence dépasse un seuil donné (Cs) est déterminé auxdites étapes (d) et (e) et en ce que la quantification du nombre total de séquences d'acide nucléique virales portant ou non la mutation dans l'échantillon de l'étape (d) et celle du nombre de séquences d'acide nucléique mutées présentes dans l'échantillon de l'étape (e) sont réalisées en comparant le Cs avec une courbe étalon de Cs obtenue avec des dilutions du standard soumis à des amplifications dans les conditions des étapes (d) et (e).

8) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'à l'étape (e) l'amorce sens spécifique de la séquence mutée présente au moins un ou deux mésappariements supplémentaires autre que la mutation.

9) Méthode selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'à l'étape (e) l'amorce sens spécifique de la séquence mutée présente un mésappariement moyennement déstabilisant, autre que la mutation, en position -2 par rapport à l'extrémité 3' de ladite amorce sens.

10) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que les PCR en temps réel des étapes (d) et (e) sont réalisées en présence de 3 à 5 mM de $MgCl_2$, avec plus de 100 mM de chacun des dNTP, avantageusement 200 mM de chacun des dNTP et à une température équivalente aux Tm des amorces utilisées.

11) Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle comprend un contrôle supplémentaire correspondant à un standard identique à celui préparé à l'étape (c) mais ne présentant pas la mutation qui est amplifié par PCR en temps réel dans les mêmes conditions que celles des étapes (d) et (e).

12) Application d'une méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes à la détection et/ou la quantification de variants minoritaires du VIH portant au moins une mutation de résistance aux antirétroviraux.

13) Méthode de détection et/ou de quantification de variants minoritaires portant au moins une mutation, selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que lesdits variants minoritaires sont des virus VIH et en ce que ladite mutation est une mutation de résistance aux antirétroviraux présente dans la séquence de la protéase.

14) Méthode selon la revendication 13, caractérisée en ce que ladite mutation est la mutation de résistance V82A ou L90M.

15) Méthode de détection et/ou de quantification de variants minoritaires du VIH portant au

moins une mutation de résistance aux antirétroviraux V82A ou L90M dans la séquence de la protéase, au sein d'une population virale hétérogène contenue dans un échantillon biologique, selon l'une quelconque des revendications 13 ou 14, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes:

a) l'extraction des ARN contenus dans l'échantillon biologique,

b) l'amplification par RT PCR des ARN de l'étape (a) avec une paire d'amorces encadrant une séquence d'acide nucléique virale susceptible de porter la mutation V82A ou L90M, cette paire d'amorces étant SEQ ID No.1 et SEQ ID No.2 dans la liste de séquences en annexe,

c) la préparation d'un standard par amplification PCR avec la même paire d'amorce qu'à l'étape (b) d'une séquence d'acide nucléique portant la mutation V82A ou L90M,

d) l'amplification par PCR en temps réel des produits d'amplification de l'étape (b) et du standard de l'étape (c) avec une paire d'amorces hautement conservées ne discriminant pas les séquences portant ou non la mutation V82A ou L90M,, cette paire d'amorces étant SEQ ID No. 3 et SEQ ID No. 4 dans la liste de séquences en annexe, et quantification du nombre de séquences d'acide nucléique virales portant ou non la mutation V82A ou L90M présentes dans l'échantillon,

e) l'amplification par PCR en temps réel des produits d'amplification de l'étape (b) et du standard de l'étape (c) avec une paire d'amorces spécifiques d'une séquence portant la mutation V82A ou L90M, et quantification du nombre de séquences d'acide nucléique virales portant la mutation V82A ou L90M présentes dans l'échantillon,

f) la comparaison des quantifications des étapes (d) et (e) pour déterminer la proportion de virus portant la mutation V82A ou L90M dans l'échantillon.

16) Méthode selon la revendication 15, caractérisée en ce que la mutation est la mutation de résistance V82A dans la séquence de la protéase et en ce que l'étape (e) est réalisée avec la paire d'amorces de séquence SEQ ID No.4 et SEQ ID No.6 dans la liste de séquences en annexe.

17) Méthode selon la revendication 15, caractérisée en ce que la mutation est la mutation de résistance L90M dans la séquence de la protéase et en ce que l'étape (e) est réalisée avec la paire d'amorces de séquence SEQ ID No.4 et SEQ ID No.7 dans la liste de séquences en annexe.

18) Une paire d'amorces susceptible d'être mise en œuvre à l'étape (b) d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 13 à 17, caractérisée en ce qu'elle comprend les amorces de séquences SEQ ID No.1 et SEQ ID No.2 dans la liste de séquences en annexe.

19) Une paire d'amorces susceptible d'être mise en œuvre à l'étape (d) d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 13 à 17, caractérisée en ce qu'elle comprend les amorces de séquences SEQ ID No.3 et SEQ ID No.4 dans la liste de séquences en annexe.

20) Une paire d'amorces susceptible d'être mise en œuvre à l'étape (e) d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 13 à 17, caractérisée en ce qu'elle

comprend les amorces de séquences SEQ ID No.4 et SEQ ID No.6 dans la liste de séquences en annexe.

21) Une paire d'amorces susceptible d'être mise en œuvre à l'étape (e) d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 13 à 17, caractérisée en ce qu'elle comprend les amorces de séquences SEQ ID No.4 et SEQ ID No.7 dans la liste de séquences en annexe.

22) Une sonde susceptible d'être mise en œuvre aux étapes (d) et (e) d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 13 à 17, caractérisée en ce que sa séquence correspond à SEQ ID No.5 dans la liste de séquences en annexe.

23) Un kit pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 et 13 à 17, caractérisé en ce qu'il comprend les réactifs suivants :

- une paire d'amorces encadrant le segment susceptible de porter une mutation,
- une paire d'amorces hautement conservées ne discriminant pas les séquences mutées et non mutées,
- une paire d'amorces spécifiques des séquences mutées,
- une sonde conjuguée à ses extrémités 5' et 3', respectivement, avec un colorant fluorescent reporteur et un composé de réduction d'intensité de fluorescence, spécifique des produits d'amplification des étapes (c) et (d) d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 et 13 à 17,
- une séquence d'acide nucléique portant la mutation pour la préparation d'un standard par

amplification PCR avec la paire d'amorces encadrant le segment susceptible de porter une mutation,

- les produits et réactifs nécessaires pour réaliser les différentes amplifications par PCR.

24) Un kit selon la revendication 23, pour la détection et/ou la quantification de variants minoritaires du VIH portant la mutation de résistance aux antirétroviraux V82A ou L90M dans la séquence de la protéase, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la paire d'amorces encadrant le segment susceptible de porter une mutation de séquence SEQ ID No.1 et SEQ ID No.2 dans la liste de séquences en annexe,

- la paire d'amorces hautement conservées ne discriminant pas les séquences mutées et non mutées de séquence SEQ ID No.3 et SEQ ID No.4 dans la liste de séquences en annexe,

- la paire d'amorces spécifiques des séquences portant la mutation V82A de séquence SEQ ID No.4 et SEQ ID No.6 dans la liste de séquences en annexe et la paire d'amorces spécifiques des séquences portant la mutation L90M de séquence SEQ ID No.4 et SEQ ID No.7 dans la liste de séquences en annexe,

- la sonde conjuguée à ses extrémités 5' et 3', respectivement, avec un colorant fluorescent reporteur et un composé de réduction d'intensité de fluorescence de séquence SEQ ID No.5 dans la liste de séquences en annexe.

Fig.1

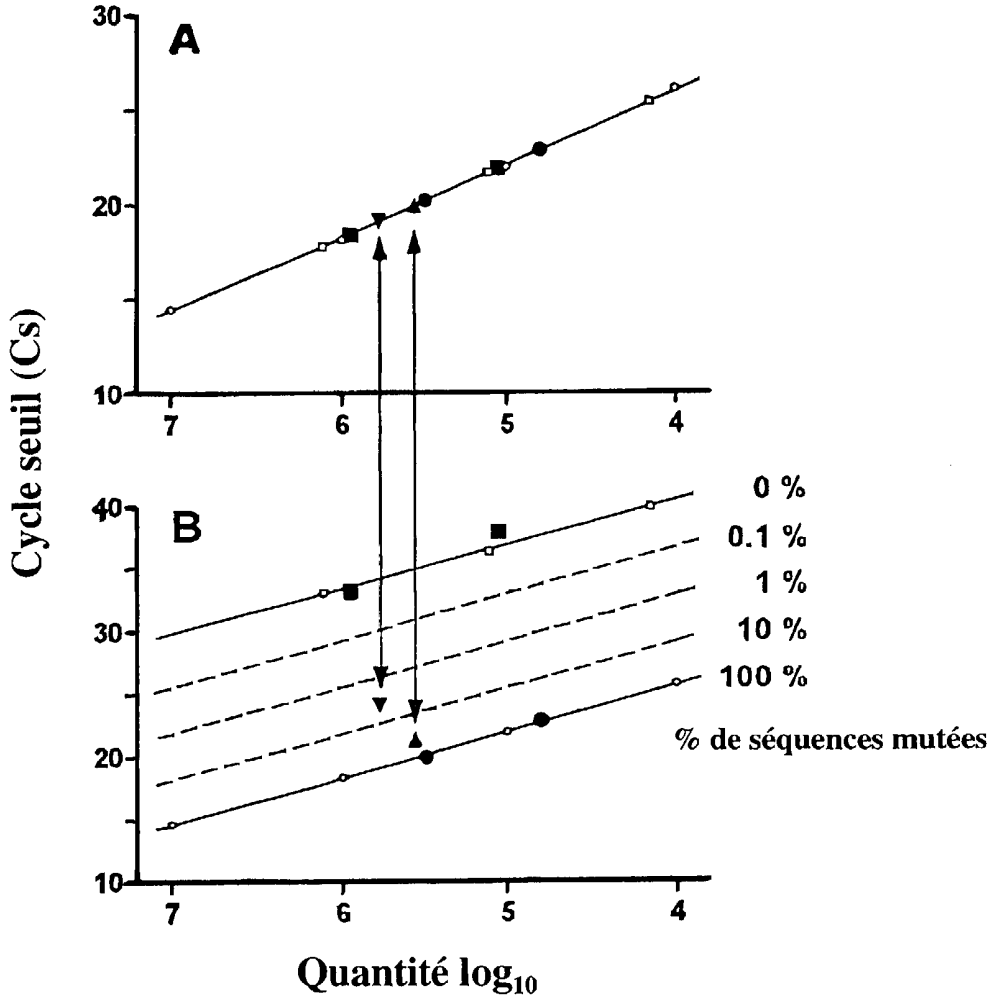
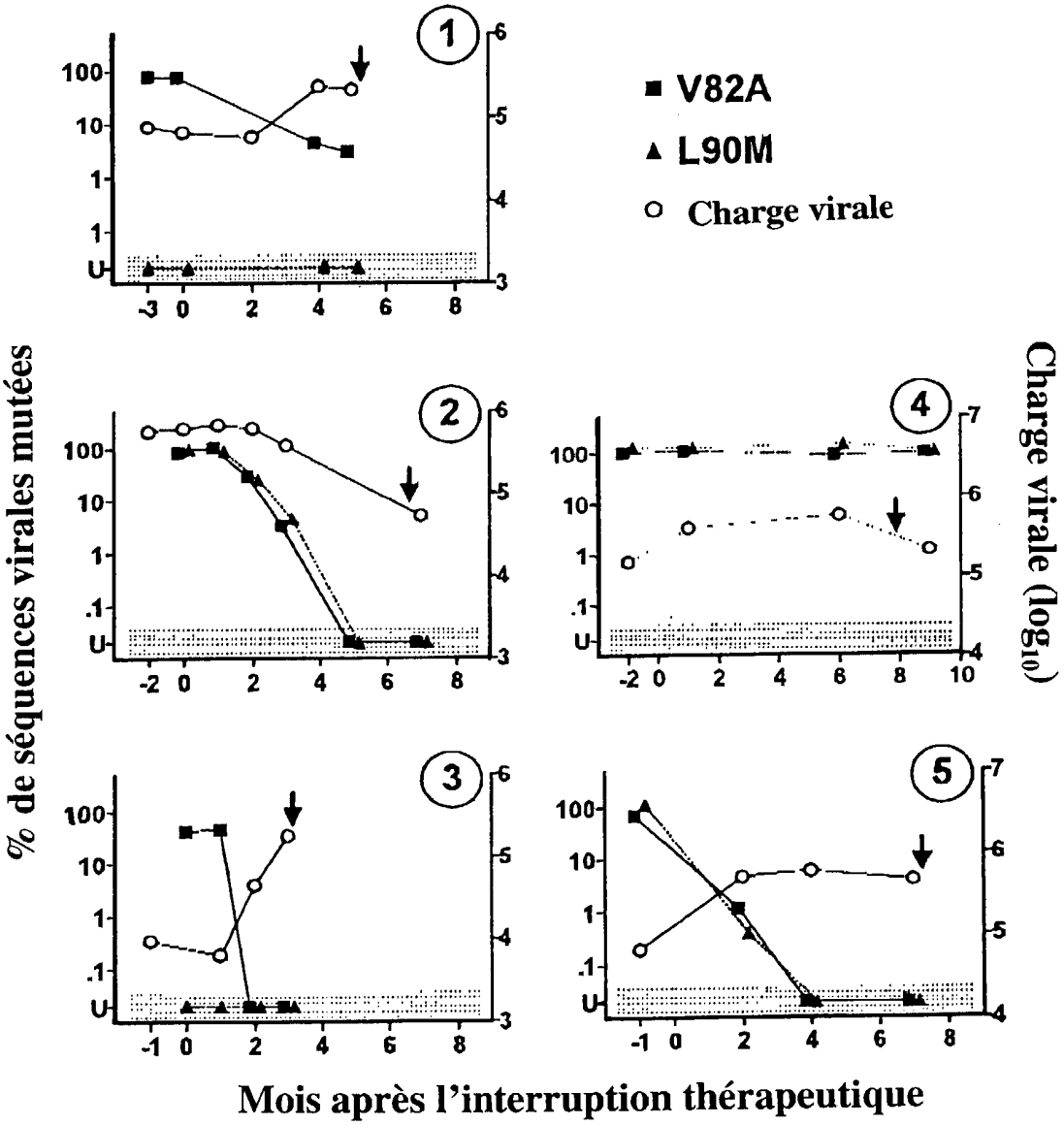

A
B
30
20
10
40
30
20
10
7
6
5
4
Cycle seuil (Cs)
Quantité log10
0 %
0.1 %
1 %
10 %
100 %
% de séquences mutées

Fig.2


1
2
3
4
5
V82A
L90M
Charge virale
% de séquences virales mutées
Charge virale (log10)
Mois après l'interruption thérapeutique

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE M

<120> Méthode de détection et/ou de quantification de variants minoritaires au sein d'une population virale hétérogène dans un échantillon biologique

<130> 7908FRInsermVIH

<140> 7908
<141> 2000-06-09

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 23
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(23)
<223> Amorce sens pour RT PCR, amorce ProtF1

<400> 1
ctttagcttc cctcagatca ctc 23

<210> 2
<211> 24
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> Amorce antisens RT PCR, amorce ProtR1

<400> 2

cctggcttta attttactgg taca 24

<210> 3
<211> 24
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> Amorce sens pour l'amplification des séquences portant ou non la mutation V82A et/ou L90M, amorce F3

<400> 3
ggtacagtat tagtaggacc taca 24

<210> 4
<211> 24
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> Amorce antisens utilisée pour toutes les amplifications PCR, amorce R1

<400> 4
tggtacagtt tcaataggac taat 24

<210> 5
<211> 28
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: sonde

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(28)
<223> Sonde pour les PCR en temps réel conjuguée à ses extrémités 5' et 3' respectivement avec le FAM et le TAMRA

<400> 5
ctcagattgg ttgcacttta aattttcc 28

<210> 6
<211> 22
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Amorce sens pour l'amplification spécifique de la séquence portant la mutation V82A, amorce M2-V82A

<400> 6
tattagtagg acctacacca gc 22

<210> 7
<211> 22
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> Amorce sens pour l'amplification spécifique de la séquence portant la mutation L90M, amorce M2-L90M

<400> 7
aacataattg gaagaaatca ga 22

<210> 8

<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> Amorce sens F4

<400> 8
ctcagatcac tctttggca 19

INPI
INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

2810049

N° d'enregistrement national

FA 594968
FR 0007441

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 99 40219 A (KLEIN DIETER ;MUELLER MATHIAS (AT); STEINBORN RALF (AT); BREM GOTT) 12 août 1999 (1999-08-12) * revendications 1-4 * * page 2, ligne 21 - page 4, ligne 16 * * page 5, ligne 1 - page 6, ligne 24 * * page 7, ligne 14 - ligne 22 *	1-14,23	C12Q1/70 C12Q1/68 C07H21/00
Y	* page 9, ligne 15 - ligne 30 *	15-22,24	

Y	WO 99 67428 A (INNOGENETICS NV ;STUYVER LIEVEN (BE)) 29 décembre 1999 (1999-12-29) * page 2, ligne 9 - ligne 16 *	15-22,24	
A	* revendications 4,7 *	15-17, 19-21,24	

A	DE 44 33 194 A (MEIER EWERT HERBERT UNIV PROF) 21 mars 1996 (1996-03-21) * colonne 1, ligne 33 - colonne 2, ligne 39; revendications 1-5 *	1-24	

A	WO 95 14109 A (US ARMY) 26 mai 1995 (1995-05-26) * page 3, ligne 14 - ligne 30; revendication 1 *	1-24	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) C12Q

1

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
9 mai 2001	Gabriels, J

CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

X : particulièrement pertinent à lui seul
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
A : arrière-plan technologique
O : divulgation non-écrite
P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention
E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.
D : cité dans la demande
L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)