



Silvia Pei

Le pyroséquençage pour détecter les résistances aux traitements antirétroviraux

Une application importante du séquençage à très haut débit réside dans la détection de mutations avec un seuil de sensibilité supérieur aux techniques classiques, à moindre coût. Aujourd'hui, un intérêt croissant est porté à l'optimisation des traitements antirétroviraux à travers le pyroséquençage.

La révolution du séquençage de nouvelle génération (*next generation high throughput DNA sequencing technologies* en anglais) ne fait que commencer et rares sont encore les laboratoires de biologie médicale dotés de tels équipements. L'emploi de ces technologies commence tout juste à emprunter le chemin de l'utilisation en routine, un pari relevé par le laboratoire de virologie de Bordeaux et présenté par le Pr Hervé Fleury aux Journées internationales de biologie en novembre 2012. L'exploitation clinique des renseignements obtenus soulève encore des questions, qui nécessitent des études complémentaires.

Une sensibilité accrue

Un panel important de tests génotypiques visant à détecter des résistances aux traitements antirétroviraux (TARV) est déjà recommandé en pratique clinique chez les patients infectés par le VIH. Il est estimé en effet qu'au sein d'une population de patients nouvellement infectés, une proportion significative présente d'emblée une résistance aux TARV, estimée à 14-18 % aux États-Unis et à 8 % en Europe. Cependant, les tests cliniquement disponibles, exploitant les techniques classiques dérivées du séquençage par la technique de Sanger, ne permettent pas de détecter un taux de mutation présent chez moins de 20 % des virus circulants. L'avènement de techniques plus sensibles, initié en 2005 avec le pyroséquençage et rapidement suivi par d'autres stratégies de séquençage massivement parallèle, permet désormais d'obtenir des centaines de milliers de cycles de séquençage en parallèle



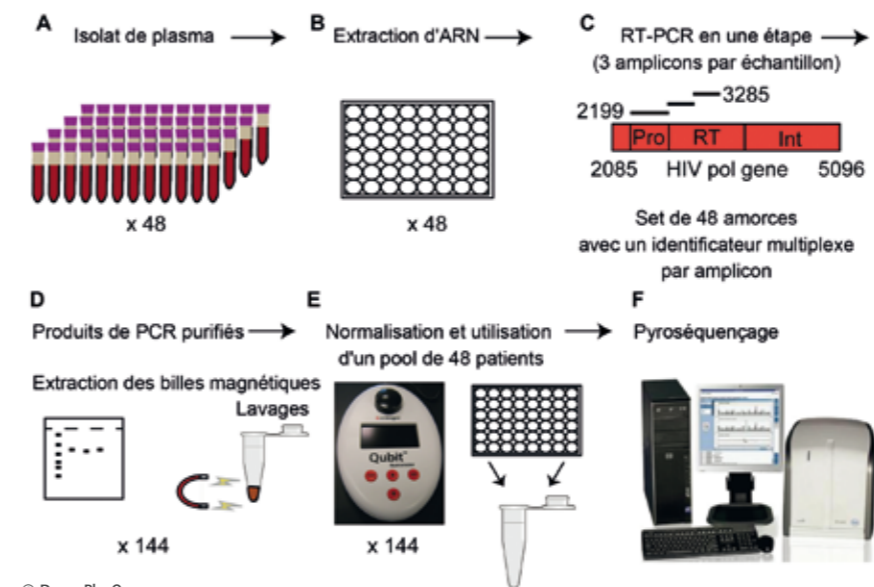
« Avec le nombre croissant de services qui se mettent à développer ces techniques de séquençage, la prise en charge du VIH va traverser une révolution d'ici trois à quatre ans », estime le Pr Fleury du CHU de Bordeaux.

pour chaque molécule d'acide nucléique, avec un effet direct sur la sensibilité de détection, dont la limite se situe entre 0,3 et 5 % selon les techniques. Un nombre croissant d'études montre ainsi que certaines mutations faiblement représentées sont un facteur prédictif de l'échec ou du succès des TARV. C'est le cas par exemple d'une étude multicentrique menée depuis 2010, à laquelle ont collaboré, entre autres, les CHU de Toulouse et de Bordeaux [1].

Optimiser les traitements

« Un an après l'achat de l'appareil 454 fourni par Roche, nous avons souhaité le passer en routine au CHU de Bordeaux chez les nouveaux patients, avant le démarrage du traitement. Nous sommes les seuls à le faire actuellement », explique le Pr Fleury. Le

seuil fixé de détection a été fixé à 1 % : « Lorsque nous ne détectons pas de mutation, les cliniciens sont sereins. Au-dessus de 1 %, un suivi intensif du patient est justifié pour détecter une éventuelle inefficacité du traitement ». A l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus vis-à-vis de la valeur du seuil, qui varie en fonction de différents paramètres : le type de mutation, la barrière génétique (le nombre de mutations requises pour entraîner



© Dawn-PlosOne

RÉFÉRENCES

- [1] Simen BB *et al.*, Low-cost ultra-wide genotyping using Roche/454 pyrosequencing for surveillance of HIV drug resistance. *Antiviral Therapy*, 2010, 15(Suppl 2), A37
 [2] Dudley DM *et al.*, Low-cost ultra-wide genotyping using Roche/454 pyrosequencing for surveillance of HIV drug resistance. *PLoS One*, 2012, 7(5):e36494

de services qui se mettent à développer ces techniques de séquençage, la prise en charge du VIH va traverser une révolution d'ici trois à quatre ans », affirme le Pr Fleury.

Cinq fois moins cher que le génotypage classique

La mise en place des traitements de première ligne, actuellement rendue complexe par l'existence de plus de 200 mutations connues et par la nécessité de pouvoir en détecter de nouvelles, se voit désormais confrontée à un changement de paradigme, grâce à la détection de mutations faiblement représentées. Le pyroséquençage est à ce jour la technique la plus utilisée dans cette intention et possède également des applications intéressantes dans l'étude du tropisme du VIH et dans l'analyse des résistances aux traitements contre l'hépatite B, deux domaines qui font l'objet de recherches intensives. ■

Les étapes du pyroséquençage

1. Préparation d'une librairie d'ADN à partir des ARN circulants : amplification des gènes avec la transcriptase inverse (RT).
2. Amplification clonale des amplicons de 300-400 paires de bases dans une émulsion eau/huile : chacun des brins d'ADN est immobilisé sur une bille, puis amplifié.
3. Chaque bille est isolée dans un puits, puis l'ADN est séquençé par addition successive de nucléotides (250 000 copies d'ADN séquençées en parallèle).
4. L'addition de chaque nucléotide génère un signal lumineux détecté par une caméra, les résultats sont analysés par un logiciel permettant de reconstituer la séquence initiale.