



Analyse des régions LTR du génome d'un VIH-1 recombinant inter-groupes M et O : étude de l'émergence des points de cassure et caractérisation des différentes populations

Alice Moisan, Juliette Caron, Fabienne de Oliveira, Jean-Christophe Plantier

► To cite this version:

Alice Moisan, Juliette Caron, Fabienne de Oliveira, Jean-Christophe Plantier. Analyse des régions LTR du génome d'un VIH-1 recombinant inter-groupes M et O : étude de l'émergence des points de cassure et caractérisation des différentes populations. 3ème Journée Normande de Recherche Biomédicale, Sep 2018, Rouen, France. hal-02268783

HAL Id: hal-02268783

<https://hal-normandie-univ.archives-ouvertes.fr/hal-02268783>

Submitted on 21 Aug 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Analyse des régions LTR du génome d'un VIH-1 recombinant inter-groupes M et O : étude de l'émergence des points de cassure et caractérisation des différentes populations

Alice Moisan^{1,2}, Juliette Caron¹, Fabienne De Oliveira², Jean-Christophe Plantier^{1,2}

¹Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne (GRAM 2.0), Normandie Université, UNIROUEN, UNICAEN

²Laboratoire de Virologie associé au CNR VIH, CHU de Rouen

Introduction :

Les VIH sont caractérisés par une forte diversité génétique, liée notamment à leurs origines simiennes et à leur mode de réplication, et accentuée par le phénomène de recombinaison. Malgré leur importante divergence génétique, le VIH-1 de groupe M (VIH-1/M), pandémique, et le VIH-1 de groupe O (VIH-1/O), endémique au Cameroun, peuvent générer des formes recombinantes inter-groupes M et O (VIH-1/MO). Depuis 1999, 23 recombinants MO ont ainsi été décrits. Aux extrémités du génome du VIH, se situent deux séquences répétitives identiques : le 5'LTR et le 3'LTR, tous deux composés des régions U3, R et U5. Ces LTRs constituent un point chaud de la recombinaison. Des travaux préliminaires ont permis la génération artificielle, par un système de génétique inverse, de virus recombinants VIH-1/MO. L'étude de leurs LTRs, initialement différents, a montré qu'ils avaient recombiné au cours du temps pour devenir identiques.

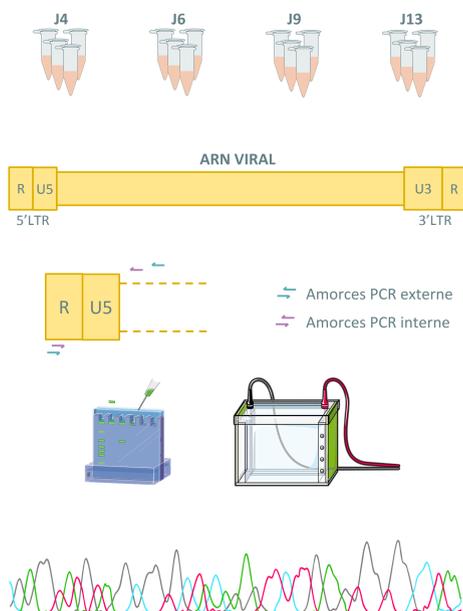
Objectifs :

1. Analyser l'émergence d'un point de cassure dans le 5'LTR d'une forme recombinante VIH-1/MO
2. Caractériser les différentes populations présentes au cours de sa mise en culture sur lignée cellulaire

Etude de l'émergence d'un point de cassure dans le 5'LTR

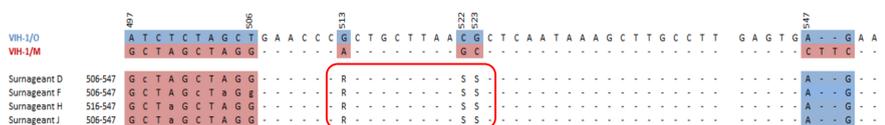
Matériels & Méthodes :

- Décongélation de 16 surnageants issus des 4 transfections
- Extraction automatisée (EZ-1) de l'ARN des surnageants
- Amplification des régions 5'LTR recombinantes par PCR nichées
- Révélation par migration sur gel d'agarose
- Séquençage des régions 5'LTRs par la méthode de Sanger



Résultats :

- ⇒ Emergence d'un point de cassure dans le 5'LTR dès le début de la culture à J4
- ⇒ Localisation de la zone de recombinaison dans la 2^{ème} moitié de la région R du 5'LTR
- ⇒ Coexistence de plusieurs populations dans les différents surnageants de culture

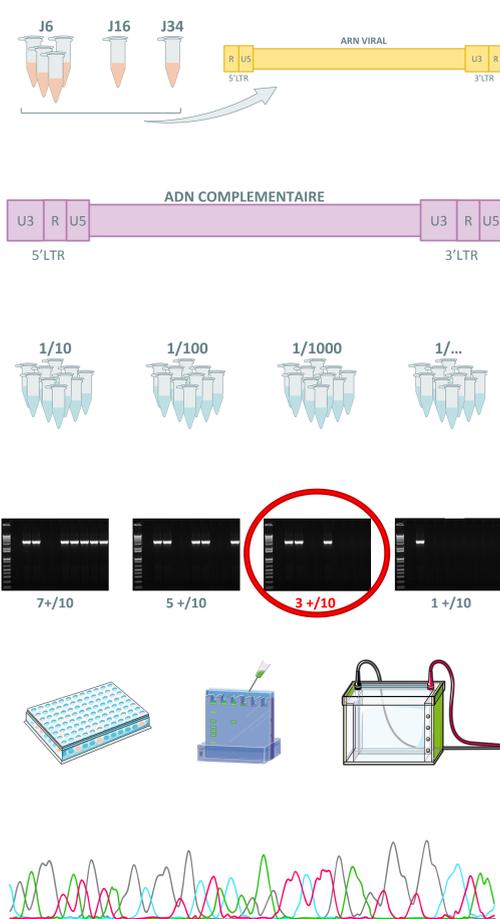


Caractérisation des populations présentes

Matériels & Méthodes :

SINGLE GENOME AMPLIFICATION (SGA)

- Décongélation de surnageants et extraction de l'ARN viral
- Obtention de l'ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse
- Dilutions en série (x10 réplicats) et amplification 5'LTRs par PCR nichées
- Détermination de la dilution limite (3 puits positifs sur 10 = un clone unique amplifié par puits)
- PCR réalisée 96 fois à cette dilution et révélation sur gel d'agarose
- Séquençage des amplicons par la méthode de Sanger



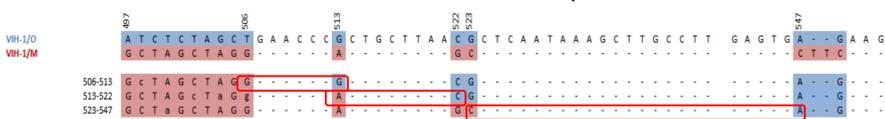
Résultats :

- ⇒ A J6 (début de culture) : émergence du LTR recombinant avec persistance de LTRs non recombinants (= plasmide de départ).

Surnageant	Dilution limite	Pourcentage puits positifs	5'LTR non recombinants = VIH-1/O	5'LTR recombinants = VIH-1/MO	
				n LTRs recombinants	Point de cassure
D	1/300	16,70 %	11	5	1 : 506-513 2 : 513-522 2 : 523-547
				2	1 : 506-513 1 : 513-522
					0
F	1/300	16,70 %	12	2	1 : 513-522
H	1/100	7 %	7	0	3 : 506-513 4 : 513-522
					3
J	1/100	25 %	10	10	1 : 506-513 4 : 513-522 3 : 523-547
				10	1 : 506-513 4 : 513-522
					3

- ⇒ A J16 et J34 (milieu et fin de culture) : LTR recombinant uniquement
- ⇒ Trois motifs distincts de recombinaison, dès J6

Surnageant	Dilution limite	Pourcentage puits positifs	5'LTR non recombinants = VIH-1/O	5'LTR recombinants = VIH-1/MO	
				n LTRs recombinants	Point de cassure
D	1/175000	15 %	0	11	1 : 506-513 5 : 513-522 5 : 523-547
				11	1 : 506-513 14 : 513-522
					5
D	1/190000	22%	0	20	1 : 506-513 14 : 513-522 5 : 523-547



- ⇒ Comparaison aux données *in vivo* disponibles :
 - les 3 motifs sont retrouvés pour 3 virus recombinants *in vivo*
 - 2 autres motifs présents *in vivo* (396-545 pb & 489-497 pb), non retrouvés *in vitro* (contraintes techniques)

Conclusions & Perspectives :

La caractérisation par SGA des 3'LTRs-ARN (surnageants de culture) et des 5' et 3'LTRs-ADN (cellules de fin de culture) doit être réalisée. Néanmoins, notre étude a permis de :

- décrire l'émergence de la recombinaison dans les 5'LTRs de virus recombinants VIH-1/MO, avec un point de cassure dans la région R,
- caractériser les populations présentes avec trois motifs distincts de recombinaison, retrouvés dès le début de la culture cellulaire,
- valider notre protocole en comparant ces données *in vitro* aux données *in vivo* de patients infectés par des virus recombinants MO,
- améliorer nos connaissances sur les mécanismes de recombinaison inter-groupes M et O.