

Camille HASLIN et Jean-Claude CHERMANN<sup>1</sup>

## Intérêt des anticorps anti-R7V comme marqueur de la non-progression des patients infectés par le VIH. Apport d'un test ELISA constituant une aide à la décision vis-à-vis du choix d'initier ou non une thérapeutique antirétrovirale

### RÉSUMÉ

Un test ELISA (Anti-R7V ELISA, IVAGEN, ref IVR 96000) a été mis au point afin de détecter dans le sérum des patients VIH positifs la présence d'anticorps anti-R7V protecteurs susceptibles de neutraliser toutes les souches de virus et de bloquer l'évolution de la maladie. Une étude réalisée sur 42 patients dont toutes les données biologiques étaient connues (charge virale, nombre de lymphocytes CD4, traitement...) a montré une corrélation de 85,7% entre la présence d'anticorps anti-R7V et la non-progression. Cinq patients non-progresseurs négatifs pour le test anti-R7V présentent d'autres mécanismes de protection comme des mutations au niveau des corécepteurs du VIH). Pour neuf patients, la réponse anti-R7V se situant dans la zone indéterminée, la concordance n'a pas pu être établie.

Les résultats de cette étude montrent que les patients produisant des anticorps anti-R7V sont protégés, asymptomatiques et ne nécessitent donc pas un traitement immédiat.

### MOTS-CLÉS

VIH, test ELISA, R7V, anticorps neutralisants

### Anti-R7V antibodies as one of the markers of non progression in HIV-infected patients : a new ELISA test as a new tool for the clinician to initiate or not an antiretroviral therapy

### SUMMARY

An ELISA test (Anti-R7V ELISA, IVAGEN, ref IVR 96000) has been developed for the detection of protective anti-R7V antibodies neutralizing all HIV clades and delaying AIDS disease evolution. A study on 42 patients (well-defined for viral load, CD4 count, treatment composition...) shows a correlation of 85,7% between the presence of anti-R7V antibodies and the protection. Five patients labelled as non-progressors negative for the anti-R7V test have other mechanisms of non-progression (HIV-coreceptors mutations). Nine patients having anti-R7V borderline results, no correlation was established. The results of this study show that patients with anti-R7V antibodies are protected, asymptomatic and their treatment could be delayed.

### KEYWORDS

HIV, ELISA test, R7V, neutralizing antibodies.

### I – Introduction

Devant les effets secondaires des traitements antirétroviraux et les résistances multiples qu'ils entraînent, il devient important pour la santé des patients infectés par le VIH d'en ajuster l'administration. La disponibilité de nouveaux marqueurs biologiques, en plus de la détermination du nombre de CD4 et de la charge virale, se révèle nécessaire pour permettre au clinicien de disposer d'informations pertinentes et l'aider à choisir d'initier ou non un traitement.

Il a été démontré que le VIH acquiert un antigène cellulaire, le R7V, lors de sa sortie par bourgeonnement

des lymphocytes CD4 (1-3). Cet épitope présenté à la surface membranaire du virus est un peptide de sept acides aminés, de séquence RTPKIQV (Arg-Thr-Pro-Lys-Ileu-Gln-Val). Malgré la grande variabilité génomique du VIH, tous les isolats connus présentent le R7V.

Parmi les patients VIH positifs, certains produisent des anticorps dirigés contre ce R7V. Ces anticorps anti-R7V neutralisent toutes les souches de virus quelles que soient leur origine géographique, leurs mutations ou leurs résistances aux substances antivirales (4-5). Le kit anti-R7V<sup>TM</sup> ELISA (IVAGEN, ref IVR 96000) produit et commercialisé par la société IVAGEN (Bernis, France) permet la détection des anticorps anti-

<sup>1</sup>URRMA R&D - ZI des Paluds - Centre de vie Agora - BP 1055 - 13781 Aubagne Cedex - Tél. : 04 42 82 42 12 - Fax : 04 42 70 38 66 - E-Mail : urrma@urrma.fr

Décision

## Intérêt des anticorps anti-R7V comme marqueur de la non-progression des patients infectés par le VIH. Apport d'un test ELISA constituant une aide à la décision vis-à-vis du choix d'initier ou non une thérapeutique antirétrovirale

R7V protecteurs dans le sérum des personnes infectées par le VIH. Ce test constitue donc un marqueur supplémentaire pouvant être pris en compte dans la décision d'instaurer ou non une thérapie antirétrovirale, les patients produisant des anticorps anti-R7V ne nécessitant pas de traitement immédiat.

Une étude rétrospective réalisée sur 42 patients suivis sur une durée moyenne de 2,5 années a été menée afin de déterminer la corrélation entre la présence d'anticorps anti-R7V et la non-progression vers la maladie. Nous rapportons dans cet article certains résultats clés de ce travail.

## II- Matériels et méthodes

### 1. Patients

L'étude a porté sur un ensemble de patients VIH positifs volontaires envoyés par leur clinicien. Un total de 42 patients a été enrôlé, représentant 25 hommes et 17 femmes, classés en non-progresseurs (n= 36) et en progresseurs (n= 6) suivis sur une période moyenne de 2,5 années (min.-max / 0,9-6,7 ans).

Pour chaque patient, les données suivantes ont été relevées durant toute la période d'étude :

- année du diagnostic de séropositivité ;
- valeur du nombre de lymphocytes CD4 et de la charge virale pour chaque prélèvement ;
- traitement antirétroviral suivi.

Les patients ont été séparés en deux groupes comme suit :

- Les patients non-progresseurs sont asymptomatiques avec un taux stable de lymphocytes CD4 et de charge virale.
- Les patients progresseurs présentent une diminution moyenne des lymphocytes CD4 de plus de 10 % sur la période donnée avec une charge virale élevée.

Une collaboration avec l'Etablissement Français du Sang de Marseille a permis d'enrôler dans cette étude un ensemble de 115 individus VIH-négatifs (hépatite A, B, C négatifs) ayant servi de groupe de contrôle.

### 2. Sérums

Les sérums ont été prélevés sur tube sec et collectés par centrifugation. Chaque prélèvement a été aliquoté et placé à - 80°C.

Les sérums présentant des possibilités d'interférer dans le test anti-R7V ont été obtenus auprès de la société Boston Biomedica (West Bridgewater, Etats-Unis).

### 3. Test Anti-R7V ELISA

Les anticorps anti-R7V ont été détectés par le kit Anti-R7V ELISA (IVAGEN, ref IVR 96000) en suivant les recommandations décrites dans la notice. Brièvement, les sérums et les contrôles du kit sont dilués et incubés dans une plaque préalablement coâtée avec le peptide R7V. Des anticorps anti-IgG humaines marqués à la peroxydase sont ajoutés après lavage et se lient à leur tour aux complexes anticorps anti-R7V/R7V retenus

par la phase solide. La présence de la peroxydase est révélée après lavage par une incubation en présence de son substrat chromogène. Après arrêt de la réaction par ajout d'acide chlorhydrique dilué, la densité optique est mesurée à 450/630 nm. L'absorbance observée, comparée à celle du calibrateur interne du kit, permet de conclure quant à la présence ou l'absence d'anticorps anti-R7V dans le sérum du patient avec :

- Rapport DOsérum/ DOcalibrateur < 0,8 : résultat négatif
- 0,8 < Rapport DOsérum/ DOcalibrateur < 1,2 : zone grise (borderline)
- Rapport DOsérum/ DOcalibrateur > 1,2 : résultat positif

## III- Résultats

### 1. Etude de répétitivité du kit Anti-R7V ELISA

La répétitivité du kit a été évaluée en testant 20 fois en double 4 échantillons : un négatif (n°1), un en zone grise (n°2) et deux positifs (n°3 et 4). Les résultats sont présentés dans le Tableau I, les coefficients de variation obtenus situés dans une fourchette de valeurs inférieures à 20 % attestent de la fiabilité du test.

Echantillon	1	2	3	4
Rapport moyen	0,2	0,8	1,4	1,9
CV (%)	18,5	8,3	4,7	5,0

**Tableau I**  
Répétitivité du kit  
Anti-R7V ELISA.

### 2. Etude de reproductibilité du kit Anti-R7V ELISA

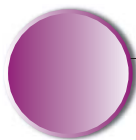
Les sérums utilisés dans cette étude ont consisté en sérums préalablement testés anti-R7V positifs (n°6 à 15) et négatifs (n°1 à 5). Ils ont été codés et répartis en 15 fois 15 tubes. L'étude est conduite par trois manipulateurs différents sur 5 jours consécutifs. Les résultats ont confirmé la fiabilité du test : 100 % de positifs reconnus, aucun faux positif détecté ; les sérums négatifs sont reconnus négatifs pour 75 % d'entre eux et 25 % sont dans la limite de la zone grise (*tableau II, voir page suivante*).

### 3. Recherche de la présence d'anticorps anti-R7V dans une population normale de donneurs de sang

Sur 115 sérums séronégatifs en provenance de l'EFS, 102 sont négatifs avec le test Anti-R7V ELISA (88,7 %), 13 sont en zone grise (11,3 %).

### 4. Essai du test Anti-R7V ELISA sur des sérums à potentialité interférente

Les sérums pouvant présenter une interférence possible avec les anticorps anti-R7V ont été choisis à partir de personnes non infectées par le VIH : sérums



**Tableau II**  
Etude de reproductibilité du kit Anti-R7V ELISA.

Echantillon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Rapport moyen	0,3	0,7	0,4	0,6	0,8	2,0	1,9	1,6	2,7	2,1	2,8	1,9	1,8	1,7	2,1
CV (%)	18,9	23,4	22,2	18,5	15,9	11,3	12	17,1	15,1	12,4	12,7	13	11	12,5	14,5

auto-immuns (lupus, polyarthrite rhumatoïde, maladie de Lyme), sérums provenant d'une infection virale (rubéole, herpès, Epstein-Barr) ou sérums particuliers (sérums de femmes à grossesse multiple, sérums hyperlipidémiques, sérums de patients sous anti-coagulant). Les résultats exprimés dans le Tableau III démontrent la spécificité du test pour les patients infectés par le VIH, en effet moins de 19 % des sérums testés dans chaque catégorie sont anti-R7V positifs, malgré un faible nombre d'échantillons (de 6 à 13 par catégorie).

## 5. Etude rétrospective de patients infectés par le VIH par le kit anti-R7V ELISA

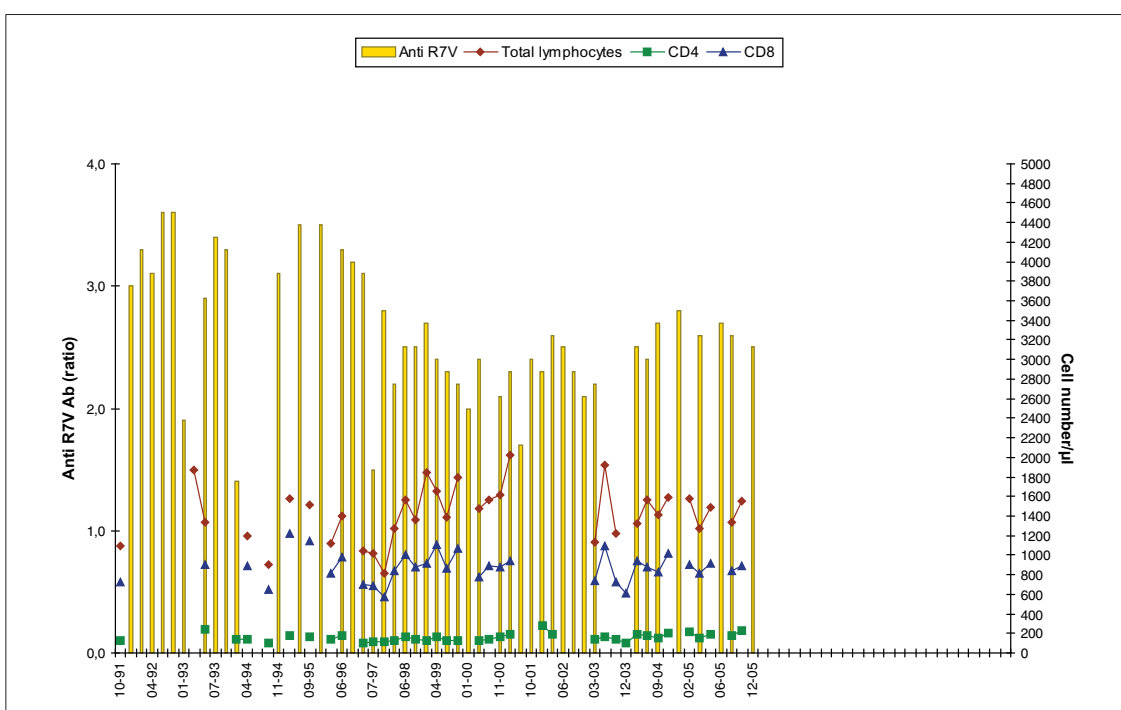
Les Figures 1 et 2 illustrent le suivi sur une période de plus de 10 ans de deux patients non-progresseurs. On peut y voir la stabilité des lymphocytes CD4 pendant la durée du suivi, et la présence constante des anticorps anti-R7V chez ces deux patients. La Figure 3 illustre le suivi d'un patient dénué d'anticorps anti-R7V où l'on constate une chute des CD4, suivie d'une remontée consécutive à un traitement antirétroviral.

Les éléments rapportés ici s'appuient sur des résultats obtenus lors de l'étude rétrospective menée sur l'ensemble de patients décrit au point II.1. Ces patients ont été suivis sur une période moyenne de 2,5 années.

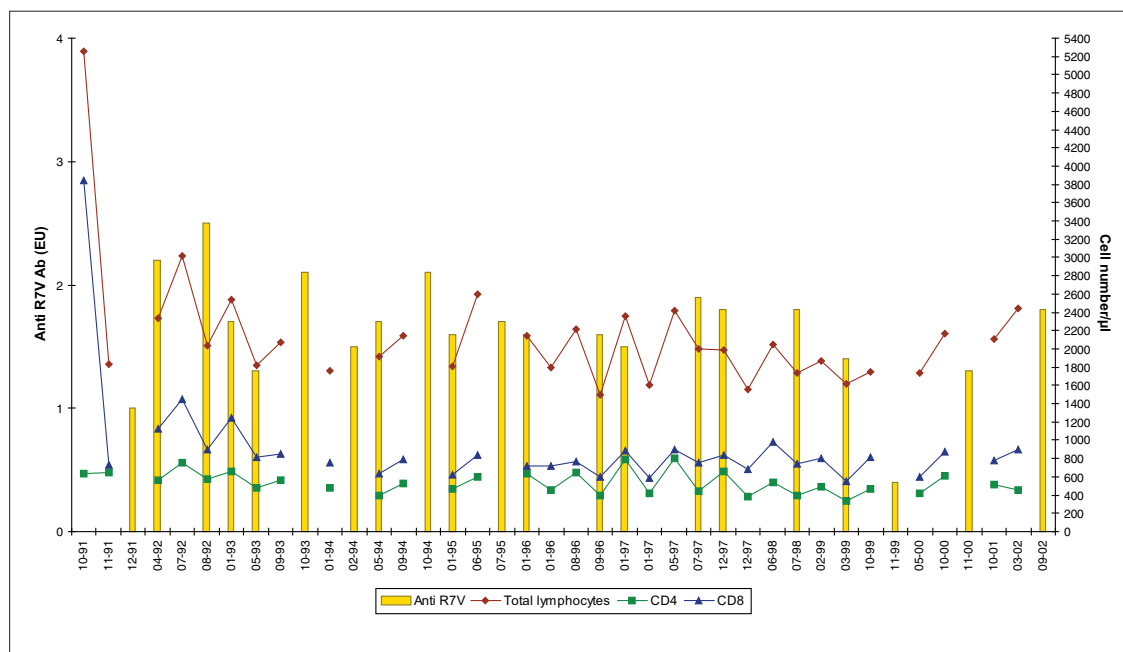
**Tableau III**  
Nombre de sérums potentiellement interférents positifs avec le kit Anti-R7V ELISA.

	Nombre testé	Résultat Anti-R7V ELISA		
		Négatif	Positif	Zone grise
Grossesse multiple	9	8	0	1
Maladie de Lyme	9	7	1	1
Lupus érythémateux disséminé	11	9	1	1
Polyarthrite rhumatoïde	7	7	0	0
Rubéole	11	5	2	4
Herpès	15	14	0	1
Hyperlipidémie	12	10	1	1
Anticoagulant	6	3	1	2
Epstein Barr	13	8	1	4

**Figure 1**  
Suivi d'un patient non-progresseur possédant des anticorps anti-R7V. Les anticorps anti-R7V sont présents tout au long de l'infection.



Intérêt des anticorps anti-R7V comme marqueur de la non-progression des patients infectés par le VIH. Apport d'un test ELISA constituant une aide à la décision vis-à-vis du choix d'initier ou non une thérapeutique antirétrovirale



**Figure 2**  
Suivi d'un patient non-progressif possédant des anticorps anti-R7V.

Cette période a été imposée par la nature du suivi : l'association simultanée du compte de CD4, de la mesure de la charge virale et des anticorps anti-R7V.

L'analyse de ces résultats permet de tirer plusieurs conclusions soulignant l'intérêt et les points clés associés à la détection et au suivi des anticorps anti-R7V.

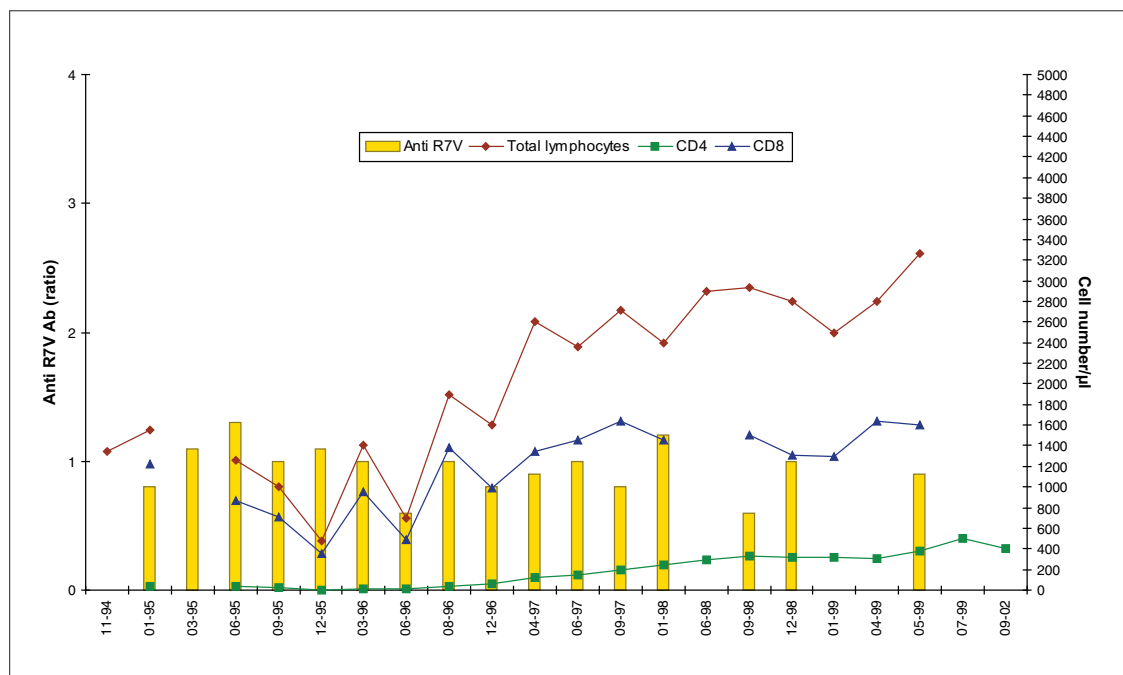
Un patient R7V positif garde ses anticorps anti-R7V tout au long de l'infection. Il peut les perdre en fonction d'un traitement antirétroviral notamment avec le Trizivir (figure 4, voir page suivante).

L'étude révèle que dans le suivi de certains patients R7V positifs, quelques points mesurés sont négatifs (voir figure 2) ; on peut émettre l'hypothèse qu'il s'agit de faux négatifs liés à la formation d'un complexe virus-anticorps anti-R7V. L'anticorps complexé n'est pas détectable par le test ELISA. L'anticorps libre peut

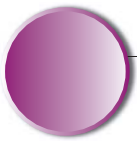
réapparaître lors d'un prélèvement ultérieur 2 à 3 mois après. On remarquera qu'il est important lors d'une première détermination présentant un résultat négatif de confirmer ce résultat lors d'un prélèvement ultérieur ; s'il est confirmé négatif le patient n'a pas d'anticorps protecteur, s'il est positif, c'est que l'anticorps était complexé.

Un patient qui ne possède pas d'anticorps anti-R7V restera négatif pour le R7V après deux analyses successives ; il n'y a pas d'apparition d'anticorps anti-R7V ultérieurement tel qu'il est montré dans l'étude de suivi et l'analyse séquentielle (figure 3).

Les anticorps anti-R7V sont neutralisants pour toutes les souches de virus y compris les virus résistants (résultats non montrés pouvant être fournis sur demande).

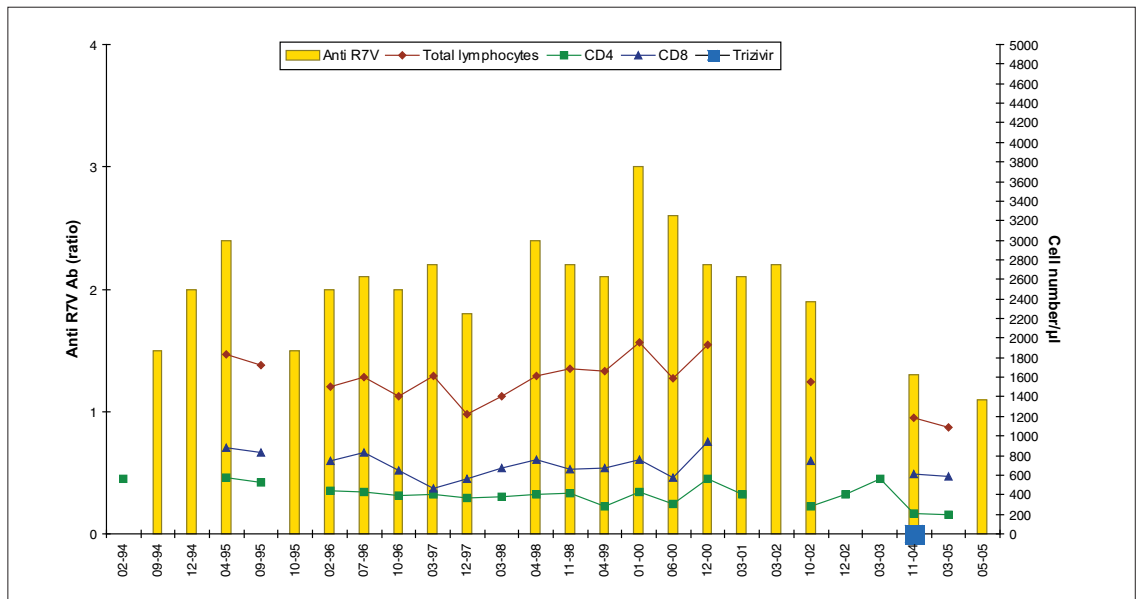


**Figure 3**  
Suivi d'un patient progressif traité ne possédant pas d'anticorps anti-R7V. Les anticorps anti-R7V n'apparaissent pas au cours de l'évolution de l'infection.



**Figure 4**

Suivi d'un patient dont le taux d'anticorps anti-R7V a diminué pour devenir « borderline » après administration de Trizivir.



La présence d'anticorps anti-R7V ne provoque aucune maladie auto-immune, les patients R7V positifs restent asymptomatiques, l'analyse de leurs sérums ne montre aucune réaction avec les tests sérologiques auto-immuns.

Des patients non-progresseurs R7V négatifs ont été inclus dans l'étude tout en sachant qu'il existe d'autres facteurs de non-progression ; quatre patients sur cinq présentent des corécepteurs modifiés (ont été recherchés les mutations suivantes: CCR5 Δ32 pb, CCR2 ou SDF1).

Concernant la corrélation entre la présence d'anticorps anti-R7V et la non progression, on relève parmi les 42 patients suivis sur des périodes déterminées :

- Dans un groupe de 28 patients (non progresseurs, n = 24 ; progresseurs, n = 4), pour lesquels dans les périodes décrites, le nombre de CD4, la charge virale et les anticorps anti-R7V étaient connus, les résultats montrent une corrélation entre la présence d'anticorps anti-R7V et la non-progression de 85,7%. On notera que ce pourcentage est très certainement sous-évalué du fait que n'ont pu être pris en compte que les patients pour lesquels le nombre de CD4 et la charge virale étaient connus. Or, les tests de mesure de la charge virale ne sont disponibles que depuis 1996.
- L'analyse de concordance n'est pas possible pour 14 patients :
  - 5 non progresseurs sont anti-R7V négatifs avec

d'autres mécanismes de protection ;

- pour 9 patients (7 non progresseurs, 2 progresseurs), la réponse anti-R7V se situe dans la zone grise ; la concordance reste indéterminée pour la période définie.

## IV – Conclusion

Le test Anti-R7V ELISA est à considérer comme un outil complémentaire aux analyses biologiques existantes. Son utilisation peut permettre au clinicien de disposer d'informations supplémentaires à considérer dans la prise de décision aboutissant à initier, ou non, un traitement antirétroviral. La détermination d'une absence d'anticorps anti-R7V indique une non-protection. Pour des patients déjà traités, la détermination de la présence d'anticorps anti-R7V constitue un argument permettant d'envisager une interruption transitoire du traitement.

La mise en évidence de l'épitope R7V puis la production d'anticorps anti-R7V ont ouvert de nouvelles pistes thérapeutiques, la production d'un vaccin (thérapeutique ou prophylactique), l'utilisation des anticorps anti-R7V recombinants comme anticorps thérapeutiques antiviraux. Dans le contexte, plus prospectif, de l'utilisation de ces nouvelles approches thérapeutiques, le test anti-R7V trouvera également une utilisation en permettant le suivi des patients traités.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) ARTHUR L.O., BESS J.W., SOWDER II R.C., BENVENISTE R.E., MANN D.L., CHERMANN J.C., HENDERSON L.E. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses : implications for pathogenesis and vaccines. *Science*, 1992, 258, 1935-1938.
- (2) LE CONTEL C., GALEA P., SILVY F. *et al.* Identification of the beta-2-microglobulin derived epitope responsible for neutralization of HIV isolates. *Cell. Pharmacol.*, 1996, 3, 68-73.
- (3) GALEA P., LE CONTEL C., COUTTON C. *et al.* Rationale for a vaccine using cellular-derived epitope presented by HIV isolates. *Vaccine*, 1999, 26, 1700-1705.
- (4) HASLIN C., CHERMANN J-C. Anti-R7V antibodies as therapeutics for HIV-infected patients in failure of HAART. *Curr. Opin. Biotech.*, 2002, 13, 621-624.
- (5) HASLIN C., CHERMANN J-C. Retrospective study of protective anti-R7V antibodies in HIV-infected patients for a new vaccine concept. *J. Hum. Virol.*, 2002, 5, 70. Abstract of the International Meeting of the Institute of Human Virology : sept 2002, Baltimore MD, USA.