

Séquençage du génome du VIH sur la série MiSeq^{MC} i100

Détection et caractérisation précises du VIH-1



Interrogation rapide
du gène *pol* du VIH
avec Illumina Microbial
Amplicon Prep pour la
détection virale et la
détection de la résistance
aux médicaments



Séquençage complet du
génomome du VIH avec Viral
Surveillance Panel v2
pour le suivi de l'évolution
virale et la détection
de > 200 autres agents
pathogènes viraux



Flux de travail flexible
de bout en bout avec
séquençage sur la série
MiSeq i100 et analyse
secondaire DRAGEN^{MC}

Introduction

Les symptômes du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ont été identifiés pour la première fois en 1981, puis attribués au cours des années suivantes à une infection par les virus de l'immunodéficience humaine de type 1 et 2 (VIH-1 et VIH-2)¹⁻⁴. La pandémie de VIH a touché plus de 88 millions de personnes dans le monde et causé la mort de plus de 42 millions de personnes⁵. Environ 1,3 million de nouvelles infections et 630 000 décès ont été signalés rien qu'en 2023⁶.

Les progrès dans la prévention des maladies et le développement de médicaments antirétroviraux efficaces ont grandement contribué à transformer la pandémie de VIH en une maladie chronique gérable, réduisant considérablement le risque de transmission du VIH et de progression de la maladie vers le SIDA⁷⁻⁹. Cependant, la transmission continue et soutenue du VIH parmi les populations vulnérables dans les régions du monde entier souligne le besoin constant d'une surveillance du VIH⁸. La surveillance moléculaire par séquençage de nouvelle génération (SNG) permet la détection de variants conférant une résistance aux médicaments antirétroviraux, le suivi de la transmission du VIH, notamment la transmission du VIH résistant aux médicaments, la détection de variants associés au tropisme du VIH et le suivi de l'évolution virale intra-hôte^{10,11}. En particulier, les mutations du gène *pol* du VIH peuvent conférer une résistance aux inhibiteurs de protéase (IP), aux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) et aux inhibiteurs de transfert de brin de l'intégrase (ITBI)¹². Ainsi, le gène *pol* du VIH est une cible importante pour la détection génotypique de la résistance aux médicaments antirétroviraux.

Cette note d'application démontre la détection et la caractérisation du VIH dans le plasma sanguin séropositif pour le VIH et les échantillons artificiels à l'aide d'un flux de travail de SNG qui intègre la préparation de bibliothèques Illumina, le séquençage sur la série MiSeq i100 et l'analyse secondaire DRAGEN (figure 1).

Méthodes

Échantillons

Des échantillons de plasma séropositifs pour le VIH ont été obtenus sur [BIOFLUIDS.com](https://www.biofluids.com) et l'ARN a été extrait à l'aide de la trousse QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, référence n° 52904), en utilisant la procédure Mini Spin et en omettant l'ajout d'ARN porteur au tampon AVL*. Les échantillons artificiels ont été formulés pour être testés à l'aide d'ARN purifié extrait de virus propagés dans les cellules mononucléées de sang périphérique (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cell) fournies par SeraCare (tableau 1). Les contrôles représentant quatre sous-types de VIH-1 prévalents ont été ajoutés à un fond de 10 ng d'ARN de référence humaine universelle (UHRR, Universal Human Reference RNA) pour une entrée totale de 690 copies virales/µl pour Illumina Microbial Amplicon Prep et de 1 176 copies virales/µl pour Illumina RNA Prep with Enrichment with the Viral Surveillance Panel v2 pour évaluer la performance des différents sous-types de VIH-1 appartenant au groupe M (tableau 1)¹³.

* Une entrée suffisante d'acides nucléiques viraux est essentielle pour une bonne performance. Des considérations sur la méthode d'extraction, telles que la centrifugation avec sucrose (gradient de sucrose) ou l'ajout d'ARN porteur, pourraient améliorer la sensibilité, en particulier pour les échantillons à titre faible¹⁴.



Figure 1 : Flux de travail de SNG complet pour la surveillance du VIH

Combinez la préparation de bibliothèques d'Illumina en utilisant une approche basée sur les amplicons ou l'enrichissement ciblé avec le séquençage sur la série MiSeq i100 et l'analyse secondaire DRAGEN pour une caractérisation génomique précise du VIH.

Tableau 1 : ARN purifiés pour les contrôles de sous-types

Nom du produit SeraCare	N° de matériel	ID d'isolat
HIV-1 Purified RNA subtype C	0400-0079	DJ259
HIV-1 Purified RNA subtype B	0400-0078	US1
HIV-1 Purified RNA subtype CRF01-AE	0400-0084	POC30506
HIV-1 Purified RNA subtype CRF02-AG	0400-0076	POC44951

Préparation des bibliothèques

Le séquençage ciblé du VIH a été effectué par séquençage d'amplicons à l'aide d'Illumina Microbial Amplicon Prep (Illumina, référence n° 20097857) et par enrichissement de la cible à l'aide d'Illumina RNA Prep with Enrichment with the Viral Surveillance Panel v2 (Illumina, référence n° 20108081).

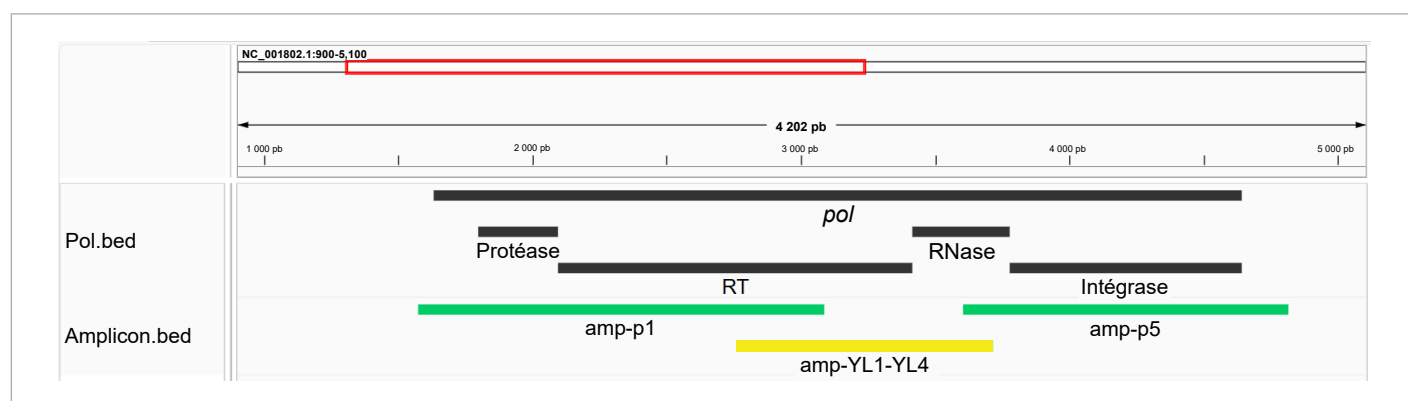
Séquençage des amplicons

Pour Illumina Microbial Amplicon Prep, les primers personnalisés, y compris les primers précédemment publiés¹⁵ et les primers supplémentaires conçus par les scientifiques d'Illumina pour assurer l'amplification du gène *pol* du VIH pour plusieurs sous-types de VIH-1, ont été obtenus auprès d'Integrated DNA Technologies (IDT) et dilués à 10 µM par regroupement (tableau 2). Étant donné que les amplicons ciblant le gène *pol* se chevauchent en position par rapport au génome du VIH-1, les primers ont été regroupés dans deux tubes distincts et utilisés pour la PCR d'amplicons dans deux réactions indépendantes. Cette approche est nécessaire pour empêcher la génération de petits amplicons et permet des schémas d'amplicons de type ARTIC¹⁶ (figure 2).

Tableau 2 : Primers personnalisés utilisés pour l'amplification du VIH-1 avec Illumina Microbial Amplicon Prep

Nom du primer	Séquence de primers 5' à 3'
P1-F v2	AAGGGYTGTTGAAATGYGG
P1-R v2	CTGTADTTCTGCTAYTAAMTCTTTTGATGG
P1-F	TTGAAATGTGAAAGGAAGGAC
P1-R	CTGTATTTCTGCTATTAAGTCTTTTGATGGG
P5-F	GGAATCATTCAAGCACAACCAGA
P5-F v2	TATGCAYTAGGAATYATTCARGCACA
P5-R	TCTCCTGTATGCAGACCCCAATAT
P5-R v2	TCTCCTGTATGCAGACCCCAATATG
Nom du primer	Séquence de primers 5' à 3'
YL1	AGAACCYCCATTCTTYGGATGGG
YL1 v2	AAGCATCAAAAGGAACCTCCCTT
YL4	CCTTTGTGTGCTGGTACCCATG
YL4 v2	CCACATGGACAGCAACTATTATG

Les primers supplémentaires conçus par les scientifiques d'Illumina pour une couverture taxonomique accrue sont indiqués par « v2 » dans le nom du primer et fournis par Integrated DNA Technologies.

Figure 2 : Conception de primers Illumina Microbial Amplicon Prep pour le gène *pol* du VIH-1

Les primers pour les amplicons p1 et p5 (vert) ont été utilisés dans une réaction PCR tandis que les primers pour l'amplicon YL1-YL4 (jaune) ont été utilisés dans une deuxième réaction PCR pour couvrir le gène *pol* (noir).

Les bibliothèques prêtes pour le séquençage ont été préparées en apportant de légères modifications au protocole d'Illumina Microbial Amplicon Prep, notamment en réduisant les volumes d'entrée d'hexamères aléatoires (2,5 µl au lieu de 8,5 µl), d'entrée d'ARN (14,5 µl au lieu de 8,5 µl) et d'entrée d'amplicons de réaction de tagmentation (10 µl provenant des réactions d'amplification p1 et p5, 5 µl provenant de la réaction d'amplification YL1-YL4 et 5 µl de DEPC H₂O).

Enrichissement de la cible

Illumina RNA Prep with Enrichment with the Viral Surveillance Panel v2 cible l'ensemble du génome du VIH-1 et du VIH-2, fournissant un séquençage du génome entier (WGS, Whole-genome Sequencing) du VIH et d'environ 200 virus supplémentaires. Les bibliothèques prêtes pour le séquençage ont été préparées conformément au protocole du fabricant.

Séquençage

Les bibliothèques préparées ont été séquençées sur MiSeq i100 Plus System à l'aide d'une Flow Cell 25M et d'une configuration d'analyse de 2 × 150 pb.

Analyse des données

Une fois le séquençage terminé, les données ont été normalisées à 0,5 million d'amplifiats/1 million de lectures appariées (PE, Paired-end) et à 1 million d'amplifiats/2 millions de lectures PE pour Illumina Microbial Amplicon Prep et Illumina RNA Prep with Enrichment with Viral Surveillance Panel v2, respectivement, à l'aide de l'application FASTQ Toolkit. Les données normalisées ont été analysées à l'aide des applications DRAGEN Microbial Amplicon et DRAGEN Microbial Enrichment Plus dans le nuage dans BaseSpace[™] Sequence Hub. Ces applications sont également accessibles depuis MiSeq i100 Plus System. Pour déterminer les renseignements sur la résistance aux médicaments, des fichiers FASTQ normalisés ont été utilisés comme entrée dans la base de données de Stanford accessible au public¹⁷.

L'application DRAGEN Microbial Enrichment Plus effectue un assemblage guidé par les références; par conséquent, le panel approprié et l'ensemble associé de séquences de référence génomiques de virus ciblés par le panel sont nécessaires. Viral Surveillance Panel v2 doit donc être sélectionné dans le menu déroulant du panel d'enrichissement de l'application. Malgré l'ensemble important et diversifié de génomes de référence du VIH-1 utilisés dans le flux de travail d'application sélectionné pour la détection et l'alignement, il est possible qu'un génome de référence plus représentatif pour un échantillon donné soit disponible et plus approprié à utiliser pour l'analyse. Une approche itérative a donc été adoptée, en réexécutant les flux de travail DRAGEN Microbial Enrichment Plus ou DRAGEN Microbial Amplicon (figure 3).

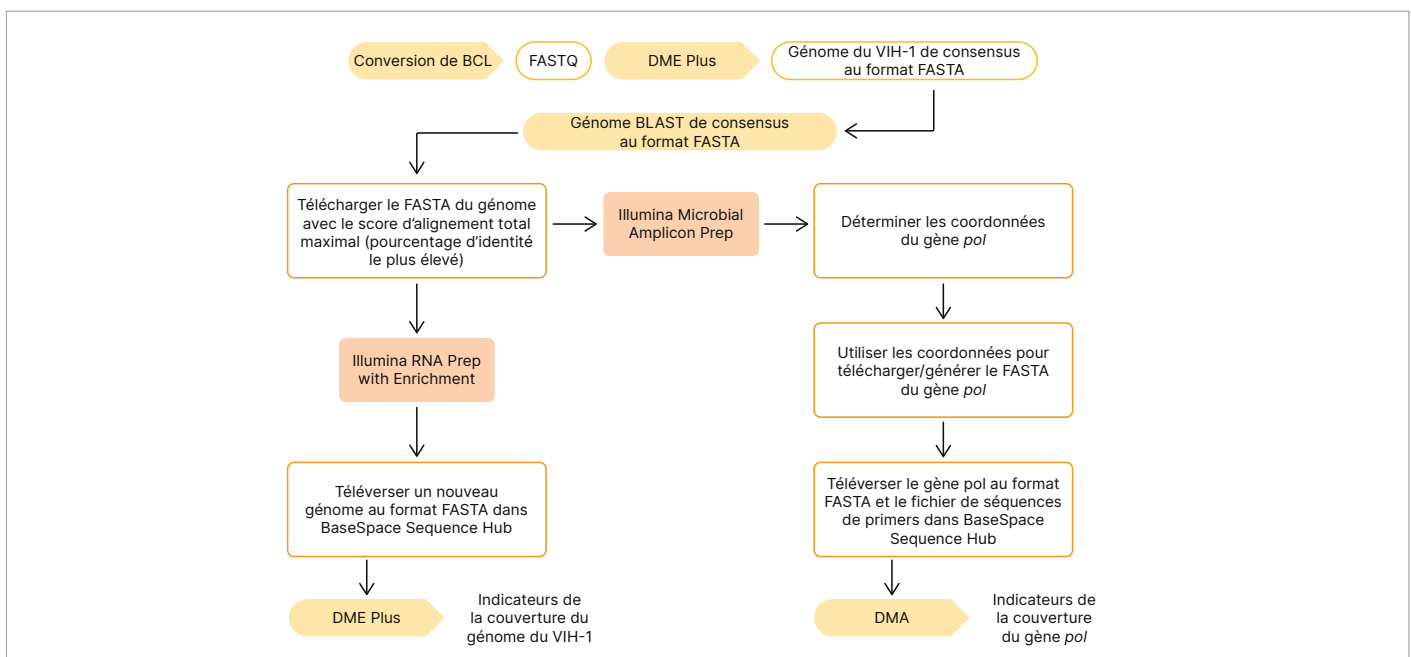


Figure 3 : Flux de travail d'analyse itératif de DRAGEN Microbial Enrichment Plus/DRAGEN Microbial Amplicon

En plus des indicateurs de couverture, l'appel des variants et la génération de séquences de consensus sont également effectués dans les flux de travail DRAGEN Microbial Amplicon (DMA) et DRAGEN Microbial Enrichment Plus (DME plus).

Résultats

Couverture du gène *pol* du VIH-1 avec Illumina Microbial Amplicon Prep

L'analyse des données de séquençage d'Illumina Microbial Amplicon Prep à partir d'un échantillon de plasma sanguin à l'aide de l'application DRAGEN Microbial Enrichment Plus a entraîné la détection du VIH-1 et la génération d'un fichier consensus FASTA du VIH-1 qui a ensuite été utilisé pour l'analyse BLAST afin de déterminer un fichier FASTA d'accès représentatif. Pour obtenir des indicateurs spécifiques au gène *pol*, l'outil Gene Cutter de la [base de données de séquences du VIH du Los Alamos National Laboratory](#) a été utilisé pour analyser la séquence du génome du VIH-1 uniquement dans la région du gène *pol*. L'alignement des résultats associés au gène *pol* sur une séquence de référence à l'aide de l'application DRAGEN Microbial Amplicon a montré une couverture de 100 % sur le gène *pol* (figure 4).

Pour les échantillons artificiels, l'analyse avec DRAGEN Microbial Enrichment Plus a détecté le VIH-1 dans tous les réplicats techniques de la librairie Illumina Microbial Amplicon Prep. Une nouvelle analyse avec DRAGEN Microbial Amplicon a été effectuée pour tous les échantillons à l'aide du flux de travail d'analyse itératif. L'analyse avec DRAGEN Microbial Amplicon démontre une couverture complète du gène *pol* pour chaque échantillon artificiel testé (figure 5).

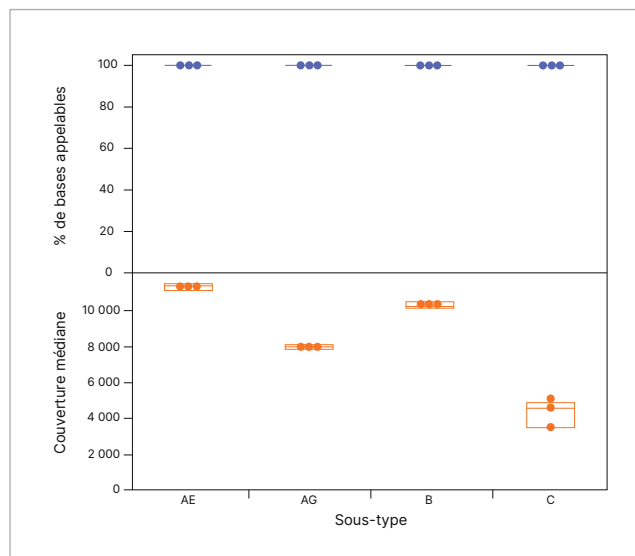


Figure 5 : Indicateurs de couverture pour les sous-types de VIH-1 avec Illumina Microbial Amplicon Prep

Pourcentage de bases appelables et profondeur de couverture médiane pour le gène *pol*. Les résultats montrent que le regroupement de primers sélectionné amplifie les souches de VIH-1 représentant divers sous-types.

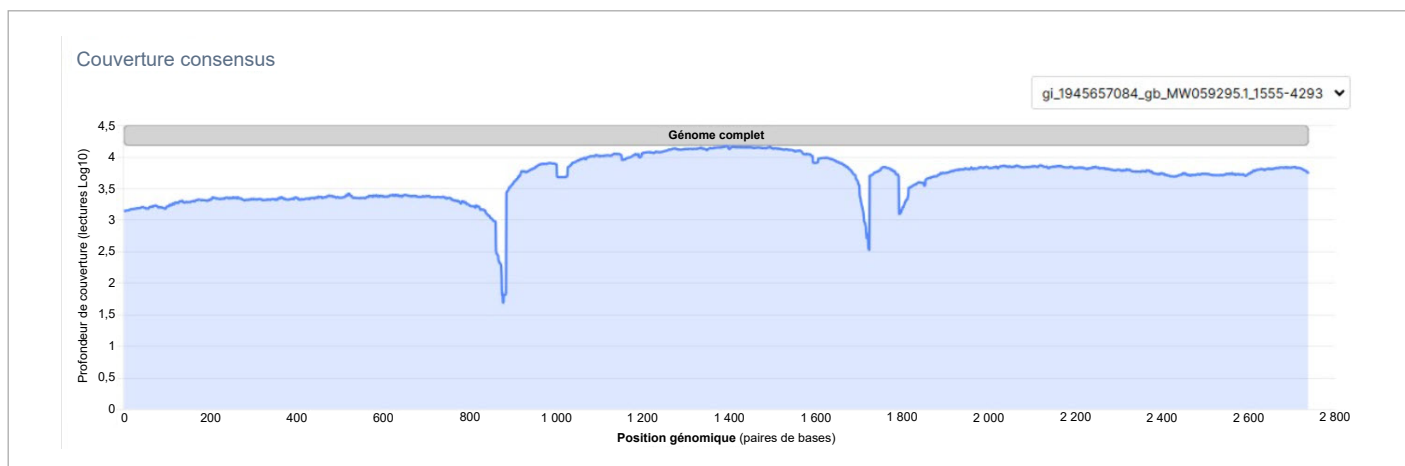


Figure 4 : Couverture génomique de la région *pol* du VIH-1 avec Illumina Microbial Amplicon Prep

Courbe de la couverture génomique pour un échantillon de plasma représentatif analysé avec l'application DRAGEN Microbial Enrichment Plus. Les résultats montrent une couverture complète (100 %) dans le gène *pol*.

Couverture du génome du VIH-1 avec Illumina RNA Prep with Enrichment

L'analyse avec DRAGEN Microbial Enrichment Plus a détecté le VIH-1 dans certaines bibliothèques non enrichies et dans toutes les bibliothèques enrichies par Viral Surveillance Panel v2 à différentes entrées de copies virales (figure 6). L'analyse initiale avec DRAGEN Microbial Enrichment Plus a produit des courbes de couverture pour les échantillons dans lesquels le VIH-1 a été détecté. Pour un échantillon de plasma représentatif, 95,27 % du génome du VIH-1 a été couvert (profondeur $\geq 1\times$) avec une profondeur médiane de 757,5 \times et 114 150 lectures alignées (figure 7A). La séquence de consensus génomique de cette analyse a été analysée à l'aide de BLAST et de la base de données de nucléotides. Le génome du VIH-1 ayant obtenu le score le plus élevé a été utilisé comme entrée dans le flux de travail d'analyse itératif DRAGEN Microbial Enrichment Plus. Cela a entraîné de meilleurs indicateurs de couverture avec 99,11 % du génome couvert (profondeur $\geq 1\times$) (figure 7B).

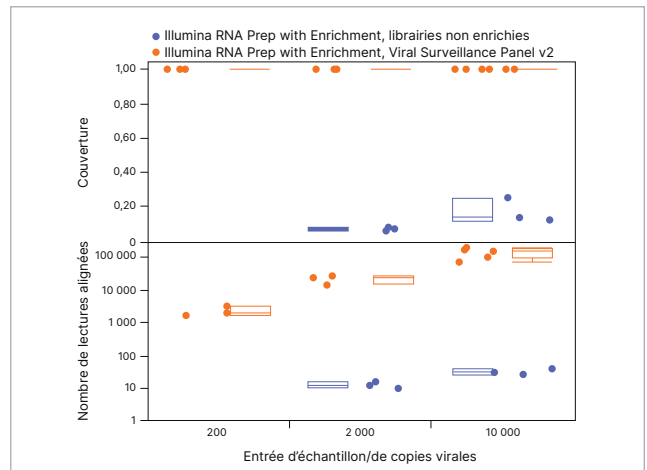


Figure 6 : Couverture accrue avec Illumina RNA Prep with Enrichment par rapport aux bibliothèques non enrichies

Couverture du génome du VIH-1 pour l'échantillon artificiel de sous-type B. Les faibles lectures virales détectées dans les bibliothèques non enrichies démontrent l'utilisation d'une amplification ou d'un enrichissement.

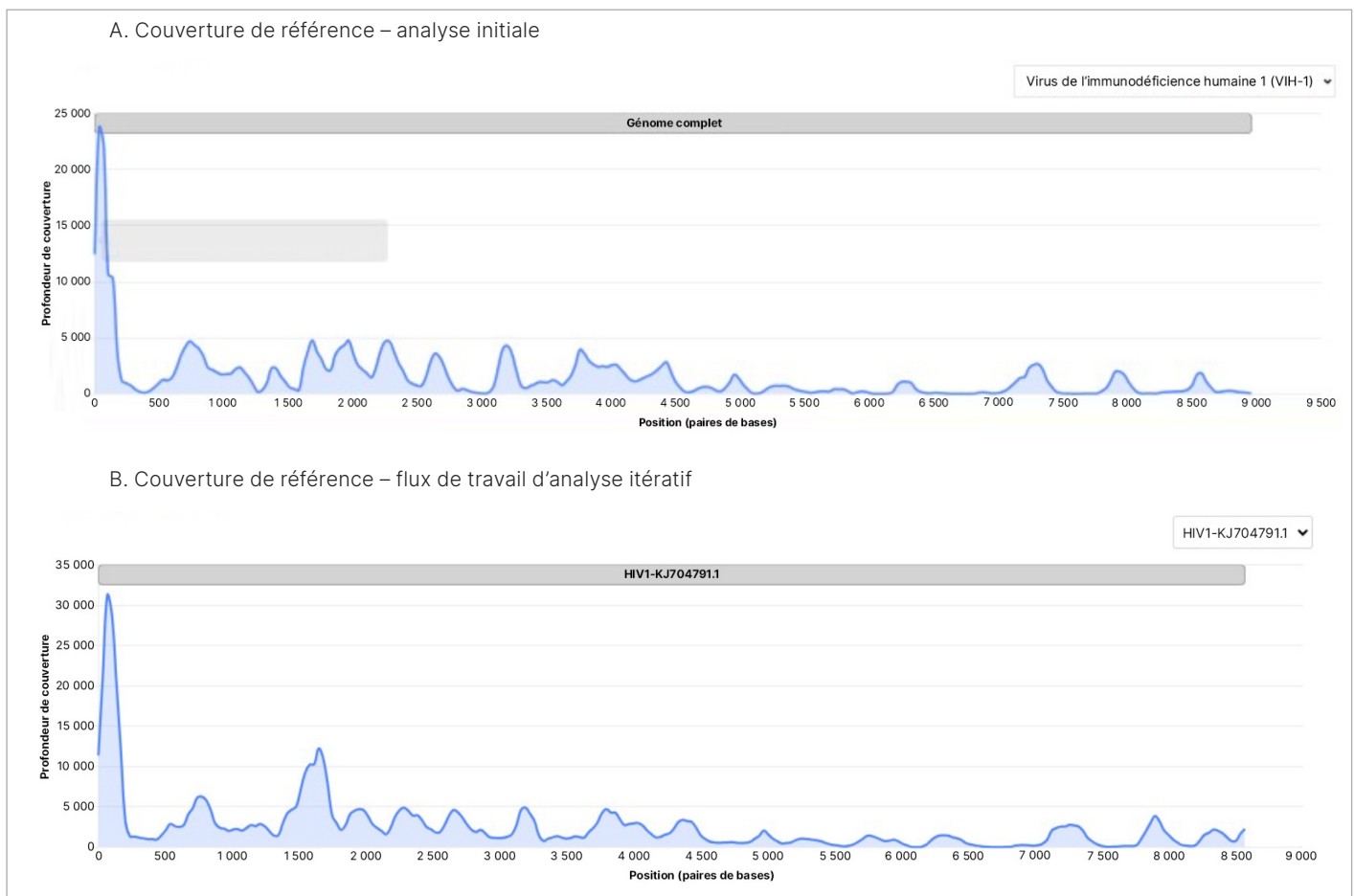


Figure 7 : Couverture génomique du VIH-1 avec Illumina RNA Prep with Enrichment

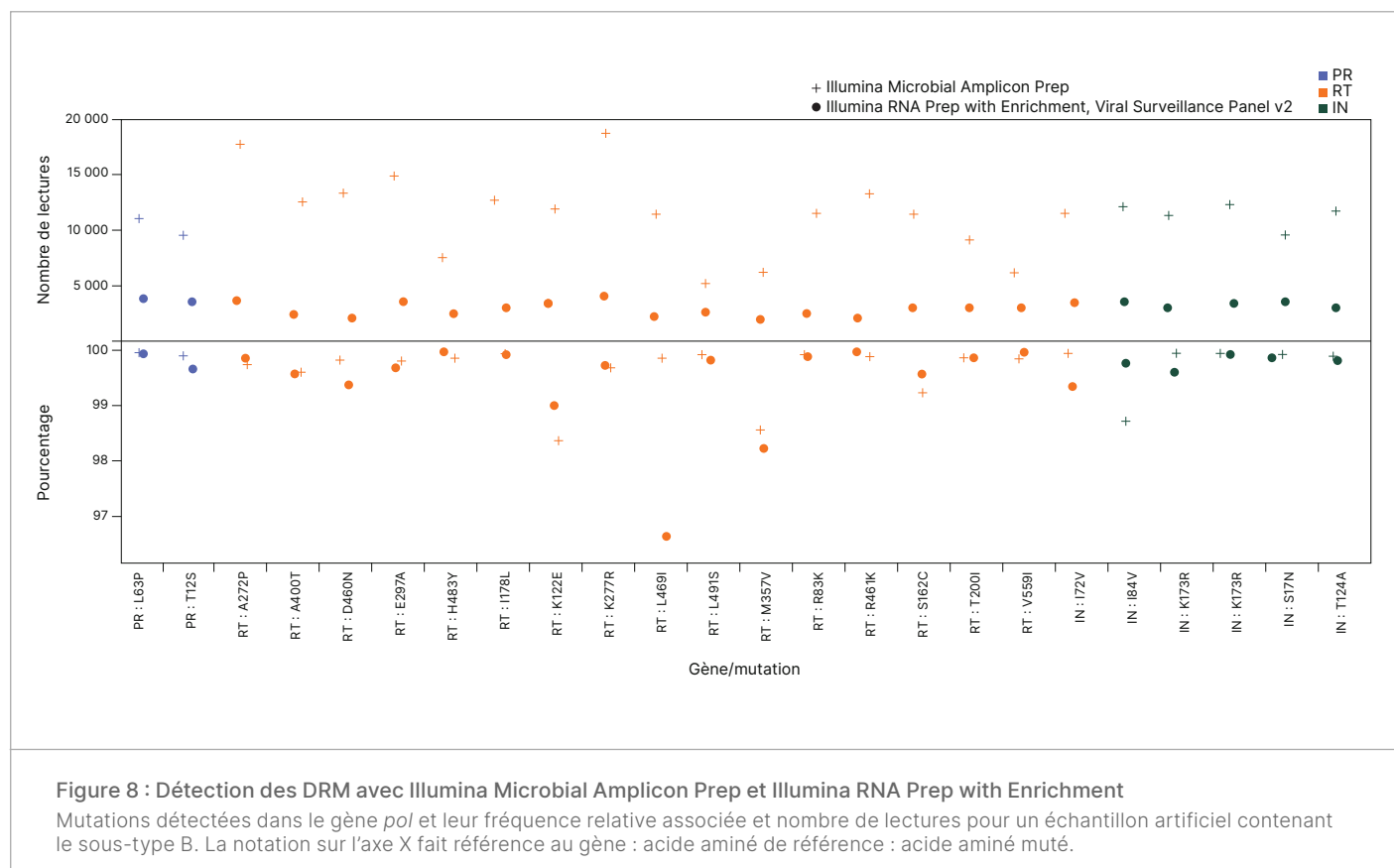
Courbes de la couverture génomique pour un échantillon de plasma sanguin représentatif (A) analysé avec l'application DRAGEN Microbial Enrichment Plus et (B) analysé avec le flux de travail itératif DRAGEN Microbial Enrichment Plus. Les résultats montrent que le flux de travail itératif a amélioré la couverture du génome du VIH-1 de 95,27 % à 99,11 %.

Test de détection des mutations de résistance aux médicaments

Les fichiers FASTQ normalisés des tests Illumina Microbial Amplicon Prep et Illumina RNA Prep with Enrichment pour le sous-type B, entrée de 10 000 copies virales, ont été analysés à l'aide de la [base de données Stanford HIV Drug Resistance Database](#) pour évaluer la présence de mutations de résistance aux médicaments (DRM, Drug-resistant Mutations) avec les paramètres par défaut (seuil de profondeur de lecture minimale ≥ 50 , seuil de mélange de nucléotides $\leq 2\%$, seuil de détection de mutation $\geq 10\%$). Aucune mutation majeure ou mineure d'IP, d'INTI/INNTI ou d'ITBI n'a été détectée dans les données générées à partir de ces tests. D'autres mutations (n = 24) prédites par la séquence du génome du VIH-1 fournies par SeraCare ont été détectées à l'aide des deux tests ([figure 8](#)).

Résumé

La série MiSeq i100, combinée à une préparation de bibliothèques de haute qualité à l'aide d'Illumina Microbial Amplicon Prep et d'Illumina RNA Prep with Enrichment with the Viral Surveillance Panel v2, a démontré des capacités de séquençage ciblé pour la détection du VIH-1 et le profilage de la résistance aux médicaments. Bien qu'Illumina Microbial Amplicon Prep ait fourni une couverture plus profonde du gène *pol* du VIH avec un flux de travail plus simple, l'enrichissement avec Illumina RNA Prep with Enrichment with the Viral Surveillance Panel v2 a permis une couverture génomique complète des souches du VIH. Cette note d'application démontre que la série MiSeq i100 fait partie d'un flux de travail de SNG flexible et complet pour la caractérisation du VIH qui peut être adapté aux besoins de l'utilisateur.



En savoir plus →

Série MiSeq i100

Illumina Microbial Amplicon Prep

Viral Surveillance Panel v2

Références

- Greene WC. [A history of AIDS: looking back to see ahead](#) [published correction appears in *Eur J Immunol*. 2008 Jan;38(1):309]. *Eur J Immunol*. 2007;37 Suppl 1:S94-S102. doi:10.1002/eji.200737441
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. [Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome \(AIDS\)](#). *Science*. 1983;220(4599):868-871. doi:10.1126/science.6189183
- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. [Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses \(HTLV-III\) from patients with AIDS and at risk for AIDS](#). *Science*. 1984;224(4648):500-503. doi:10.1126/science.6200936
- Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. [Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses \(HTLV-III\) from patients with AIDS and pre-AIDS](#). *Science*. 1984;224(4648):497-500. doi:10.1126/science.6200935
- World Health Organization. The Global Health Observatory HIV. [who.int/data/gho/data/themes/hiv-aids](#). Publié en juillet 2024. Consulté le 20 mai 2025.
- World Health Organization. HIV data and statistics. [who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/hiv/strategic-information/hiv-data-and-statistics](#). Publié en juillet 2024. Consulté le 20 mai 2025.
- Sharp PM, Hahn BH. [Origins of HIV and the AIDS pandemic](#). *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1(1):a006841. doi:10.1101/cshperspect.a006841
- Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. [HIV infection](#). *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15035. Publié le 1er octobre 2015. doi:10.1038/nrdp.2015.35
- Swinkels HM, Nguyen AD, Gulick PG. [HIV and AIDS](#). [Mis à jour le 27 juillet 2024]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-.
- Yu F, Wen Y, Wang J, et al. [The Transmission and Evolution of HIV-1 Quasispecies within One Couple: a Follow-up Study based on Next-Generation Sequencing](#). *Sci Rep*. 2018;8(1):1404. Publié le 23 janvier 2018. doi:10.1038/s41598-018-19783-3
- Ouyang F, Yuan D, Zhai W, Liu S, Zhou Y, Yang H. [HIV-1 Drug Resistance Detected by Next-Generation Sequencing among ART-Naïve Individuals: A Systematic Review and Meta-Analysis](#). *Viruses*. 2024;16(2):239. Publié le 2 février 2024. doi:10.3390/v16020239
- Jones LR, Moretti F, Calvo AY, et al. [Drug resistance mutations in HIV pol sequences from Argentinean patients under antiretroviral treatment: subtype, gender, and age issues](#). *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(8):949-955. doi:10.1089/AID.2011.0287
- Hemelaar J, Elangovan R, Yun J, et al. [Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990-2015: a systematic review, global survey, and trend analysis](#) [published correction appears in *Lancet Infect Dis*. 2020 Mar;20(3):e27. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30747-9.]. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(2):143-155. doi:10.1016/S1473-3099(18)30647-9
- Chaillon A, Gianella S, Dellicour S, et al. [HIV persists throughout deep tissues with repopulation from multiple anatomical sources](#). *J Clin Invest*. 2020;130(4):1699-1712. doi:10.1172/JCI134815
- Winters MA, Coolley KL, Girard YA, et al. [A 6-basepair insert in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1 confers resistance to multiple nucleoside inhibitors](#). *J Clin Invest*. 1998;102(10):1769-1775. doi:10.1172/JCI4948
- Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, et al. [Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples](#). *Nat Protoc*. 2017;12(6):1261-1276. doi:10.1038/nprot.2017.066
- Rhee SY, Gonzales MJ, Kantor R, Betts BJ, Ravela J, Shafer RW. [Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database](#). *Nucleic Acids Res*. 2003;31(1):298-303. doi:10.1093/nar/gkg100



Numéro sans frais aux États-Unis : + (1) 800 809-4566 | Téléphone : + (1) 858 202-4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 Illumina, Inc. Tous droits réservés. Toutes les marques de commerce sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page [www.illumina.com/company/legal.html](#).
M-GL-03571 FRA v1.0