

# Techniques de détection du VIH dans les milieux biologiques : Application à la recherche du virus dans le sperme

J.-C. TARDY\* - C. ROBERT\*\*

\* *UF Sérologie Virale - Laboratoire de Virologie* - \*\* *UF Biologie Cellulaire - Fédération de Biochimie - Hôpital Edouard Herriot - Lyon*

## RESUME

Actuellement, des demandes de plus en plus nombreuses sont effectuées par les couples "sérodiscordants" VIH pour avoir un enfant. Les techniques virologiques les plus sensibles pour prouver la présence du virus sont la coculture et la PCR-ADN, toutes deux capables de mettre en évidence l'ADN proviral intégré. En utilisant ces techniques, le VIH a été mis en évidence dans le liquide séminal, les cellules mononuclées du sperme. Il n'a jamais été trouvé in vivo dans les spermatozoïdes. Néanmoins, nous savons grâce à des études in vitro, que ce virus peut se lier et même entrer dans les spermatozoïdes. L'insémination artificielle d'une femme séronégative par le sperme de son conjoint séropositif présente donc un risque de contamination, même avec des préparations purifiées de spermatozoïdes. Actuellement, aucune technique virologique n'est en mesure d'affirmer qu'un prélèvement n'est pas infectieux.

**Mots clés :** VIH - Sperme - Identification virologique

## INTRODUCTION

La présence du virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) dans le sperme a été soupçonnée dès le début de l'épidémie, puis démontrée formellement en 1984 chez des patients asymptomatiques ou atteints de

SIDA [1, 2]. Plusieurs publications ont rapporté des cas de contamination par insémination artificielle [3, 4]. Actuellement, les praticiens en périconceptologie sont confrontés au problème du désir d'enfants chez les couples constitués d'un homme séropositif pour le VIH et d'une femme séronégative. Une insémination artificielle, avec le sperme du conjoint, présente pour la femme, et éventuellement pour l'enfant, un risque de contamination que certains auteurs [5] pensent réduire, voir annuler par un traitement préalable de l'éjaculat, suivi d'un contrôle virologique de l'absence d'infectivité du sperme ainsi traité. Nous présentons dans cette revue de la littérature, l'ensemble des techniques virologiques appliquées à l'identification du VIH, en précisant pour chacune d'entre elles, ses performances et ses limites. Tous les travaux présentés ici s'adressent au VIH type 1.

## RAPPEL VIROLOGIQUE

Le VIH est un virus à ARN, dont la multiplication dans la cellule, passe obligatoirement par une phase d'intégration dans le génome cellulaire grâce à l'action de la transcriptase inverse. Les cellules sensibles à l'infection par ce virus sont principalement celles exprimant la molécule CD<sub>4</sub> à leur surface (lymphocyte CD<sub>4</sub>, macrophage, monocytes) mais des cellules CD<sub>4</sub> -peuvent également être infectées.

Ce virus est à l'origine d'une infection persistante. On sait depuis les travaux de PAN-

TALÉO et al [5] et d'EMBRETSON et al [6] que si la charge virale est faible dans les lymphocytes périphériques pendant toute la phase asymptomatique, elle est cependant très importante dans les organes lymphoïdes dès les phases précoces de l'infection. Il ne s'agit donc pas d'une infection latente, mais une réplication virale active a lieu même quand la charge virale périphérique est très faible ou même absente.

Les techniques de recherche du VIH peuvent être classées en 2 groupes :

- 1) celles permettant d'identifier la présence du virus sans préjuger de son état répliatif (isolement du virus, mesure de l'ADN proviral intégré par PCR, hybridation in situ ou PCR in situ) ...
- 2) celles ayant pour but d'évaluer de façon quantitative la réplication virale (virémies cellulaire et plasmatique, mesure de l'ARN par PCR, mise en évidence de l'antigène P24).

La plupart de ces techniques ont été appliquées à l'identification du VIH dans le sperme tant à partir du liquide séminal, que dans les fractions mononuclées et parfois, les cellules germinales.

### **DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE L'INFECTION A VIH**

Avant d'aborder toutes les techniques de recherche du VIH dans les milieux biologiques, il est bon de rappeler que le diagnostic de certitude d'une infection à VIH (mis à part le diagnostic de l'infection congénitale ou néonatale) repose sur la mise en évidence d'anticorps sériques spécifiques du virus, avec confirmation par Western Blot (WB) sur un deuxième prélèvement.

Les anticorps anti VIH ont été dosés dans le sperme des patients infectés (7). Ils ont été retrouvés à des titres généralement 100 fois plus faibles que ceux observés dans le plasma. Ils sont toujours de classe IgG. Il n'existe aucune corrélation entre le titre en anti-

corps dans le plasma séminal et le stade de la maladie. La présence de ces anticorps peut vraisemblablement influencer la transmission sexuelle soit par un effet neutralisant, soit au contraire, en augmentant le pouvoir infectieux du virus. En aucun cas, des IgA spécifiques du virus n'ont été mises en évidence. Ce marqueur est donc inutile pour apporter une preuve indirecte de la présence du virus dans le sperme. Sur un plan qualitatif, l'analyse comparative des profils en WB à partir du sang et du sperme révèle la quasi absence d'anticorps anti P17 dans le sperme. Ceci a son importance puisque SEMPRINI et al [8] ont utilisé un anticorps monoclonal anti P17 pour vérifier l'absence du VIH dans le sperme traité avant insémination.

### **DOSAGE DE L'ANTIGENE P24**

Ce marqueur de réplication virale est utilisé depuis de nombreuses années. Il s'agit de techniques immunoenzymatiques de capture dont la sensibilité est actuellement de l'ordre de 5 à 10 pg d'antigène VIH1/ml. Un traitement préalable, acide ou basique, de l'échantillon permet la détection de la protéine après dissociation d'éventuels complexes immuns. MERMIN et al [8] ont analysé le liquide séminal de 23 patients infectés par le VIH. L'antigène P24 n'a jamais été détecté, y compris chez les patients antigénémiques asymptomatiques ou en SIDA, alors que, dans le même temps, l'ARN du virus était mis en évidence traduisant une réplication virale active. Ce marqueur manque donc de sensibilité. De plus, en cas d'infection non productive (virus sous forme d'ADN proviral intégré) il ne sera jamais détecté. Sa négativité ne permet en aucun cas d'affirmer la non infectivité d'un prélèvement.

### **ISOLEMENT DU VIRUS**

A partir du sang, la technique consiste à séparer les cellules mononuclées et à réaliser une co-culture avec des lymphocytes frais provenant d'un donneur séronégatif

stimulés par la PHA. La preuve de l'existence du virus est apportée par la mise en évidence dans le surnageant de la culture, d'antigène P24 ou d'une activité transcriptase inverse. En utilisant cette technique, KRIEGER et al [9] ont isolé le VIH dans le sperme de 11/34 patients (plasma sérial et/ou cellules mononuclées). L'auteur n'observe aucune corrélation entre la positivité de l'isolement et le stade clinique, la numération des CD<sub>4</sub>, l'existence ou non d'un traitement anti-rétroviral. Curieusement, aucune tentative d'isolement n'a été réalisée à partir des cellules germinales. Bien que standardisé maintenant, les inconvénients majeurs de l'isolement sont la lourdeur technique et une variation possible dans la sensibilité des cellules utilisées.

### **ETUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE**

Des études menées in vitro en incubant des spermatozoïdes avec le VIH ont révélé que le virus était capable de s'adsorber à la surface cellulaire [10]. Des particules virales ont été détectées également à l'intérieur de la cellule avec ou sans leur enveloppe [11, 12]. Bien que ces études aient été critiquées, par la méthodologie utilisée (forte concentration en virus, temps de contact prolongé), elles ont néanmoins l'intérêt d'avoir démontré formellement que les cellules germinales pouvaient être infectées en dépit de l'absence de récepteur CD<sub>4</sub> à leur surface et qu'elles pouvaient à leur tour infecter secondairement une culture de lymphocytes activés.

Seule la particule virale peut être mise en évidence par microscopie électronique ; le virus, sous forme de provirus ne sera pas détecté.

### **MISE EN EVIDENCE DU GENOME VIRAL**

Par la technique de Polymerase Chain Reaction (PCR), il est possible de détecter soit l'ADN proviral intégré soit l'ARN libre du virus (RT - PCR). MERMIN et al [8] ont

utilisé ces 2 types de techniques pour l'identification du génome viral dans les cellules mononuclées, les cellules germinales et le liquide sérial. L'auteur a ainsi montré que chez 74 % (17/23) des patients, le provirus était présent dans les cellules mononuclées du sperme et que pour 12 de ces 17 patients, une multiplication virale active existait (PCR ARN positive dans le liquide sérial). Notons l'existence des 3 cas pour lesquels la PCR ADN est négative et la PCR ARN positive. Cette observation surprenante pose le problème soit de la fiabilité des techniques utilisées, soit d'une multiplication virale dans d'autres types cellulaires que les cellules mononuclées. Il n'a jamais été possible de mettre en évidence l'ADN proviral dans les spermatozoïdes.

### **CONCLUSION**

Sous l'égide de l'ANRS, l'action coordonnée n°11 par la mise en place de contrôles de qualité inter-laboratoires a très largement contribué à la mise au point et la standardisation des techniques virologiques pour le suivi des personnes atteintes par le VIH.

Des techniques consensus ont été ainsi décrites. Très utilisées pour la détermination de la charge virale périphérique chez les patients traités ou non, elles ont été appliquées dans quelques études à l'identification du virus dans le sperme. Il est parfaitement clair que les techniques de diagnostic les plus sensibles sont l'isolement du virus et la recherche du génome viral par PCR. En cas de positivité répétée sur deux prélèvements, la présence du virus dans un milieu biologique peut être affirmé. L'inverse n'est pas vrai.

Rappelons que ces deux techniques présentent une sensibilité de 40 % pour le diagnostic de l'infection congénitale pendant les 15 premiers jours de vie. Leur négativité ne permet donc, en aucun cas, d'affirmer l'absence de VIH et donc, dans le cas d'un don de sperme, la non infectivité de la préparation. Il est également important de ne pas oublier que le développement de techniques de plus en plus

sensibles remet en cause des données qui semblaient pourtant bien établies. Ainsi, l'utilisation de techniques comme la PCR in situ, dont les performances pour l'identification du VIH dans les ganglions viennent d'être récemment démontrées, pourraient avoir un grand intérêt dans la recherche du virus dans d'autres milieux biologiques et tout particulièrement le sperme.

## COUTS

### • Actes inscrits à la nomenclature :

Dépistage VIH (2 techniques ELISA) B70  
 Western-Blot B180  
 Recherche et titrage de l'antigène P25 B70

### • Actes hors nomenclature

(proposition du Groupe de Virologie Médicale, Mai 1994)

Culture sur lymphocytes : équivalent B1000  
 (1760 francs)

PCR (ADN ou ARN) : équivalent B500  
 (880 francs)

## REFERENCES

- ZAGURY D; BERNARD J; LEIBOWITCH J et al. : HTLV III in cells culturels from semen of two patients with AIDS. *Science*, 1984, vol 226, p 449-451.
- HO H; SCHOOLEY RT; ROTA TR et al. : HTLV III in the semen and blood of a healthy homosexual man. *Science*, 1984, vol 226, p 451-453.
- STEWART G; TYLER JP; CUNNINGHAM AL et al. : Transmission of human T. Cell lymphotropic virus type III (HTLV III) ley artificial insemination by donor. *Lancet*, 1985, ii, p 581-585.
- CHIASSEON MA; STONEBURNER RL; JOSEPH SC et al. Human immunodeficiency virus transmission through artificial insemination. *J Acq. Imm. D*, 1990, 3, p 69-72.
- PANTALEO G; GRAZIOSI C; DEMAREST JF et al : HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature (London)*, 1993, 362, p 355-358.
- EMBRETSON J; ZUPANCIC M; RIBAS JL et al. : Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature (London)*, 1993, 362, p 359-362.
- WOLFF H; MAYER K; SEAGE G et al. : A comparison of HIV-1 antibody classes, titers, and specificities in paired semen and blood samples from HIV-1 seropositive men. *J. of AIDS*, 1992, 5, p 65-69.
- MERMIN JH; HOLODNIY M; KATZENSTEIN D An et al. : Detection of human immunodeficiency virus DNA and RNA in semen by polymerase chain reaction. *J. Inf. Dis.*, 1991, 164, p 769-772.
- KRIEGER JN; COOMBS RW; COLLIER AC et al. : Recovery of human immunodeficiency virus type 1 from semen : minimal impact of stage of infection and current antiviral chemotherapy. *J. Inf. Dis.*, 1991, 163, p 386-388.
- DUSSAIX E; GUETARD D; DAUGUET C et al. : Spermatozoa as potential carriers of HIV. *Res. Viral*, 1993, 144, p 487-495.
- BACETTI B; BENEDETTO A; BURRINI AG et al. : HIV particles detected in spermatozoa of patients with AIDS. *J. Submicrosc Cytol. Pathol.*, 1991, 23, p 339-345.
- BARGASRA O; FREUND M; WEIDMANN J et al. : Interaction of human immunodeficiency virus with human sperm in vitro. *J of AIDS*, 1988, 1, p 431-435.

## ABSTRACT

### Detection of HIV in Semen

J.C. TARDY, C. ROBERT

**Growing numbers of HIV seronegative women want to have children with HIV infected partners by artificial insemination. The most sensitive assays for showing the presence of the virus are the coculture method and the DNA-PCR that are able to detect proviral load. HIV is detected from non spermatozoal mononuclear cells, seminal fluid but it was not found in spermatozoa fraction. But we know, by in vitro studies, that HIV can bound to and enter spermatozoa. Thus artificial insemination between HIV seropositive man and seronegative woman lead to a risk of contamination even with purified spermatozoa. Today, any virological assay is able to affirm that specimen is not infectious.**

**Keys words :** HIV - Sperm - Virological assay.