

Ministère de l'Enseignement Supérieur, République du Mali
Et de la Recherche Scientifique **Un Peuple – Un But – Une Foi**

FACULTE DE

Année Universitaire 2013 – 2014

Thèse N° _____ /

TITRE

Résistance aux antirétroviraux chez les enfants et adolescents infectés par le VIH, suivis au service de pédiatrie du CHU GABRIEL TOURE. ETUDE DE L'UTILISATION DU IADELLE DANS LA VILLE DE SEGOU

THESE

Présentée et soutenue le / / 2014 devant la Faculté de Pharmacie

Par

Monsieur DOLO Oumar

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (diplôme d'état)

JURY

PRESIDENT : **Pr Souleymane Diallo II**

MEMBRES DU JURY : **Docteur Sadio SARRO dit Yeya**

Docteur Almoustapha Issiaka

MAIGA

Docteur Yacouba A COULIBALY

CO-DIRECTEUR : **Dr Almoustapha Issiaka MAIGA**

DIRECTEUR DE THESE: **Pr Ousmane KOITA**

Mis en forme : Police :22 pt, Italique

Mis en forme : Police :22 pt

Mis en forme : Police :22 pt, Gras, Couleur de police : Automatique

Mis en forme : Police :Gras

Mis en forme : Centré

Mis en forme : Police :22 pt, Gras, Couleur de police : Automatique

Mis en forme : Police :Arial Black, 12 pt

Mis en forme : Police :Arial Black, 12 pt

Mis en forme : Police :Arial Black, Non Gras

Mis en forme : Interligne : simple

Mis en forme : Police :Arial Black, 12 pt, Non Gras

Mis en forme : Police :Arial Black, 12 pt

Mis en forme : Police :Arial Black

Mis en forme : Police :Arial Black, 12 pt

Mis en forme : Police :Arial Black, 12 pt, Anglais (États Unis)

Mis en forme : Normal, Espace Après : 6 pt, Sans numérotation ni puces

Mis en forme : Police :(Par défaut) Arial Black, 12 pt, Gras, Anglais (États Unis)

Mis en forme : Police :(Par défaut) Arial Black, Gras, Anglais (États Unis)

Mis en forme : Police :(Par défaut) Arial Black, Anglais (États Unis)

Mis en forme : Police :Arial Black, 12 pt, Anglais (États Unis)

Mis en forme : Police :Arial Black, Anglais (États Unis)

Mis en forme : Police :Arial Black, 12 pt, Anglais (États Unis)

Mis en forme : Interligne : simple

Mis en forme : Police :Arial Black, Anglais (États Unis)

Mis en forme : Espace Après : 10 pt, Interligne : Multiple 1.15 li

Mis en forme : Police :Arial Black, Anglais (États Unis)

Mis en forme ... [1]

Mis en forme ... [2]

Mis en forme : Interligne : simple

Mis en forme ... [3]

Mis en forme : Police :Arial Black

Mis en forme ... [4]

Mis en forme : Police :Arial Black

DEDICACE

Cette thèse est un Hommage à mon regretté frère

A mon frère : Lt Laya DOLO

Il a quitté ce monde corrompu en 2012 et dont le souvenir bienveillant illumine chacun de mes jours, qu'il se repose en paix chère frère, amen !!!

A ma maman : Yama TRAORE

Humble, laborieuse, tu nous as élevé avec amour, courage, patiente, sagesse et dignité .Tes prières ont été pour moi d'un grand soutien moral tout au long de ma vie. Qu'Allah te prête encore longue vie afin qu'a notre tour, nous puissions te témoigner notre reconnaissance. Trouve en ce modeste travail, la consécration de tes multiples efforts et le symbole de mon profond attachement.

A mon papa : Doguelou DOLO

Tu as compris très vite que le meilleur héritage qu'on peut offrir à ses enfants est l'éducation et tu n'as ménagé aucun effort pour notre formation. Je pense qu'une fois de plus ton vœu est exaucé. Ce travail est le résultat de ton courage et de ton sacrifice. Je te suis reconnaissant pour les efforts consentis pour moi. Que le bon Dieu me donne la chance pour combler tes attentes et qu'il te donne longue vie. Amen.

A ma mère : Yadiouro DOLO

Chère mère tu nous as élevé avec amour, toi à cote de qui, nous n'avions jamais souffert d'une carence d'affection maternelle, je vous rends le produit de vos conseils.

C'est le lieu pour moi de vous attester toutes ma gratitude, je souhaite être un garçon exemplaire, qui mérite toutes votre confiance pour toujours. Merci pour tout ce que tu as fait pour nous, je vous en serai reconnaissant.

A ma mère : feu Rokia CISSE

Chère mère tu nous as quitté très tôt, mais la bonne image que tu as laissé derrière toi nous éclaire le chemin combien fastidieux de la vie. Que ton âme repose en paix !

A mon père : feu Tiemoko DIARRA

Père je n'ai pas eu la chance de te connaître mais à travers mes frères je suis convaincue que vous étiez dévoué pour l'éducation de tes enfants. Dors en paix père !!!

A ma tante : Feu Aissata DOLO

Plus qu'une tante, vous avez été un symbole pour moi. Le destin ne nous a pas laissé le temps pour jouir ce bonheur ensemble et de vous exprimer toute ma reconnaissance et tout mon respect. Puisse Dieu tout puissant vous accorde sa clémence, sa miséricorde et vous accueille dans son saint paradis.

A mes frères /sœurs, cousins/cousines et neveux/nièces :

Vous m'avez apporté un grand soutien moral et matériel durant ces longues années d'études .ce travail est le votre.

A ma fiancé : Fanta Goita

Tu as été une amie fidèle pour le soutien, sans faille, qu'elle n'a jamais cessé de m'apporter. Chérie, merci pour l'amour et la tempérance que tu as toujours témoigné à mon endroit. Ce travail porte ta marque. Je remercie DIEU de t'avoir fait mien. Puisse-t-il nous assister dans notre ménage. Amen !

Mis en forme : Gauche

REMERCIEMENT

A ALLAH et son prophète MOHAMED (PSL)

Je rends grâce a DIEU (louer soit il), par sa permission munificente et l'assistance salvatrice de son messager MOHAMED (PSL de DIEU sur lui) de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail qui me tenait tant au cœur.

A tout le corps professoral de FAPH : ce travail est avant tout le votre

Au Pr Souleymane DIALLO II

AU Pr Ousmane GOITA

A toute l'équipe de l'unité d'épidémiologie moléculaire de résistance du VIH aux ARV

Dr Almoustapha, Dr AAO, Dr Boucoum Dr Balde, Dr DIAWARA, Ban

A toute l'équipe TB de SEREFO

Dr Bass, Dr Moumine, Dr George, Sady, OUATT

A toute l'équipe d'immunologie SEREFO

Dr KONE, Dr Sarro, Dr DEMBELE, KONE, Nadjé, Coulibaly

A tous mes camarades de la VI^{ème} promotion du numerus clausus

A tous mes camarades du lycée Michelle Allaire de Ségou

A Soli jeune

A toute le personnel du laboratoire CHU Gabriel TOURE

A tout le personnel du laboratoire de l'HNF de SEGOU

A tous le personnel du CESréf de Koulouba

Au Dr Ouane et tout le personnel de la pharmacie Madina BA sarl

A tout mes tontons et a toutes mes tantes

A mes beaux frères et belles sœurs

A tous mes amis

A tous mes aînés ainsi qu'à tous cadets de la FMPOS

A toutes les personnes vivant avec le VIH

A tous ceux dont j'ai omis le nom ici

Je vous remercie pour le soutien et les conseils. Ce travail est le votre.

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DU JURY

- **Pr Souleymane Diallo II, Pharmacien biologiste**
- **Maître de Conférences en Bactériologie à la faculté de pharmacie**
- **Colonel Major des services de santé des armées**
- **Directeur Général du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux, Bamako**

Cher maître,

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de ce modeste travail. Nous avons beaucoup admiré vos qualités humaines, scientifiques et pédagogiques. Votre discrétion et votre dynamisme font de vous un maître exemplaire, admiré de tous.

Permettez-nous cher maître de vous réitérer, l'expression de notre profonde gratitude et de notre indéfectible disponibilité.

A notre maître et juge

- **Docteur Sadio SARRO dit Yeya,**
- **Dr en pharmacie,**
- **Master en Santé Publique,**
- **Assistant chercheur à SEREFO,**
- **Epidémiologiste du CRLD.**

Cher maître,

C'est le lieu de vous remercier pour votre modestie, votre disponibilité constante, vos qualités scientifiques et pédagogiques, votre esprit d'équipe et votre rigueur pour le travail bien fait.

Permettez nous cher maître de vous adresser l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre maître et juge

- **Docteur Issouf Alassane MAIGA,**
- **Médecin diplômé d'état de la FMPOS,**
- **Aspirant Master II Diplômé d'étude supérieure et spécialisé en management et suivi évaluation des projets et programme,**
- **Coordinateur du programme pays du GIP ESTHER au Mali.**

Cher maître, vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples occupations.

Nous vous avons rencontré dans le cadre de ce travail, votre amabilité, et votre amour du travail bien fait force l'admiration. Nous gardons de vous l'image d'un homme de science rempli d'esprit de recherche.

Cher maître trouvez ici toute notre profonde reconnaissance.

A notre maître et juge

- **Docteur Yacouba A COULIBALY,**
- **Médecin pédiatre au CHU GT,**
- **Responsable de la PEC des enfants infectés par le VIH au**
- **CEP du CHU GT**

Cher Maître, votre simplicité, votre rigueur dans le travail et votre disponibilité, nous ont profondément impressionnés.

Permettez nous, cher maître, de vous réitérer toute notre reconnaissance et veuillez trouver ici notre profond respect et nos sincères remerciements.

A notre maître et co-directeur

- **Dr Almoustapha Issiaka MAIGA**
- **Docteur en pharmacie et PhD en virologie à l'Ecole doctorale Complexité du Vivant (CdV) de l'Université Pierre et Marie Curie UPMC, Paris 6 en France.**
- **Responsable de l'unité d'épidémiologie moléculaire de résistance du VIH aux ARV au SEREFO**
- **Pharmacien biologiste au laboratoire d'analyses médicales du CHU Gabriel Touré**

Cher maître, malgré vos multiples occupations, vous avez accepté de codiriger ce travail.

Permettez-nous de vous remercier cher maître de la confiance que vous nous aviez faite en nous confiant ce travail.

Plus qu'un co-directeur, vous aviez fait de ce travail le votre. Vous nous aviez guidé, encouragé et conseillé tout au long de ce travail. Vous aviez cultivé en nous le sens du travail bien fait et la rigueur scientifique.

Veillez accepter cher maître, l'expression de notre profonde gratitude.

A notre maître et directeur de thèse

- Pr Ousmane KOITA
- PhD en parasitologie moléculaire,
- Responsable des cours de biologie moléculaire appliquée a la faculté des sciences techniques et biologie animale a la faculté de pharmacie,
- Responsable du laboratoire de biologie moléculaire appliqué a la faculté des sciences technique,
- Directeur intérimaire du programme de recherche sur le VIH/SIDA et la tuberculose. (SEREFO)

Cher maître, vous nous faites un grand honneur en acceptant de diriger ce travail.

Permettez nous de vous remercier, pour la confiance que vous nous aviez faite en nous acceptant dans votre centre. Nous gardons de vous l'image d'un homme de sciences rigoureux, appliqué et attaché au travail bien fait. Nous avons été permanemment animés par le souci de produire un travail à la hauteur de vos attentes. Malgré vos multiples occupations vous aviez été disponible pour nous tout au long de ce travail.

Cher maître, vous resterez pour nous une référence et un bel exemple à suivre.

Recevez ici, nos sincères remerciements et notre profonde gratitude.

Liste des Tableaux

Tableau I : Classification CDC selon le statut immunologique du patient.....	9
Tableau II : <i>liste des molécules ARV commercialisées.....</i>	<i>21</i>
Tableau III : <i>Les alternatives de seconde ligne possibles en fonction des schémas utilisés en première ligne et en cas de contre-indications ou de toxicité de l'une des molécules du schéma préférentiel.....</i>	<i>25</i>
Tableau IV : Résumé des recommandations d'utilisation des tests de résistance en France.....	38
Tableau V : interprétation des résultats obtenus sur le m2000rt (en utilisant les volumes 1,0 et 0,6 ml).....	48
Tableau VI : Répartition des patients en fonctions de l'âge.....	61
Tableau VII : Répartition des patients en fonction du taux de Lymphocytes T CD4+ au moment de l'échec virologique.....	61
Tableau VIII : Répartition des patients en fonction de la charge virale plasmatique au moment de l'échec virologiqu.....	62
Tableau IX : Répartition des patients en fonction de la durée du traitement ARV.....	62
Tableau X : Répartition des patients en fonction du traitement ARV de 1 ^{ère} ligne.....	62
Tableau XI : Répartition des patients en fonction du Traitement ARV de 2 ^{ème} ligne.....	63
Tableau XII : Répartition de nos patients en fonction de l'exposition aux Inhibiteurs nucléosidique de la transcriptase inverse.....	63
Tableau XIII : Répartition de nos patients en fonction de l'exposition aux Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la transcriptase inverse.....	63
Tableau XIV : Croisement statistique de la résistance aux ARV en fonction de la charge virale.....	68
Tableau XV : Croisement statistique de la résistance aux ARV en fonction de la tranche d'âge.....	69
Tableau XVI : Croisement statistique de la charge virale en fonction de la tranche d'âge....	70

<u>Tableau XVII : Croisement statistique de la charge virale en fonction de la durée sous traitement antirétroviral.....</u>	<u>70</u>
<u>Tableau XIII : Croisement statistique du taux de Lymphocytes CD4 en fonction de la durée sous traitement antirétroviral.....</u>	<u>71</u>

Liste des Figures

Figure 1 : Structure morphologique du VIH.....	5
Figure 2 : Structure génomique de l'ADN proviral des VIH-1.....	5
Figure 3 : Cycle réplicatif du VIH-1 dans un lymphocyte T CD4+.....	8
Figure 4 : Arbre phylogénétique des VIH.....	12
Figure 5 : Distribution géographique des VIH-1 dans le monde. Les sous-types les plus fréquents de façon décroissante sont C, A, B, CRF02_AG et CRF01_AE.....	14
Figure 6 : Deux principaux mécanismes de résistance du VIH-1 aux INTI.....	31
Figure 7 : Position des principales mutations de résistance aux IP.....	33
Figure 8 : Schéma de la méthodologie du génotypage.....	59
Figure 9 : Exemple d'alignement des séquences nucléotiques.....	59
Figure 10 : Répartition des patients en fonction du sexe.....	61
Figure 11 : Répartition de nos patients en fonction des sous types de VIH-1.....	64
Figure 12 : Fréquence des mutations associées aux INTI.....	64
Figure 13 : Fréquence de la résistance par rapport à l'exposition aux INTI.....	65
Figure 14 : Fréquence des mutations associées aux INNTI.....	65
Figure 15 : Fréquence de résistance par rapport à l'exposition aux INNTI.....	66
Figure 16 : Fréquence de mutations associées aux IP.....	66
Figure 17 : Fréquence de résistance par rapport à l'exposition aux IP.....	67

Mis en forme : Couleur de police : Automatique

Mis en forme : Police : Non Gras, Couleur de police : Automatique

Abréviations

3TC : Lamivudine

ABC : Abacavir

Ac : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIDS: Acquired Immuno Deficiency Syndrome

ANRS : Agence nationale de recherche sur le Sida

ARN: Acide Ribonucléique

ARV : Antirétroviraux

AZT : Zidovudine

CA : Capside

CCR5 : chimiokine receptor type 5

CD: Cluster of Differentiation

CDC: Center for Disease Control and prevention

CEPCP : Centre d'Excellence de prise en charge pédiatrique

CESAC : Centre d'Ecoute, de Soins, d'Animation et de Conseils

CHU-GT: Centre Hospitalier Universitaire Gabriel Touré

CI : Contrôle Interne

CRFs: Circulating Recombinant Forms

CROI : Conférence sur les Rétrovirus et les Infections Opportunistes

CSLS : Cellule Sectorielle de Lutte contre le Sida

CV : Charge Virale

CXCR4: CX Chimiokine receptor type 4

d4T: Stavudine

DRV : Darunavir

DCI : dénomination commune internationale

EDSM: Enquête démographique et de santé au Mali

EFV: Éfavirenz

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ETR : Etravirine

EV : Echec Virologique

ESTHER : Ensemble pour une solidarité thérapeutique hospitalière en réseau

Mis en forme : Espace Après : 0 pt

[FAPH : Faculté de Pharmacie](#)

[FMOS : Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie](#)

[FTC: Emtricitabine](#)

[Gag: Group antigen](#)

[gp: Glycoprotéine](#)

[GIP: Groupement d'intérêt public](#)

[GRID: Gay-Related immune Disorder](#)

[HR : Heptad Repeat](#)

[HTLV : Human T lymphocyte virus](#)

[IF: Inhibiteur de fusion](#)

[Ag : Antigène](#)

[Ig: Immunoglobuline](#)

[IMAARV : Initiative Malienne d'Accès aux ARV](#)

[IN : intégrase](#)

[INNTI: Inhibiteur Non-Nucléosidique de la transcriptase inverse](#)

[INTI: Inhibiteur Nucléosidique de la transcriptase inverse](#)

[IP/r: Inhibiteur de la protéase/ritonavir](#)

[ISBS : Institut supérieur de biosciences de Paris](#)

[IST: Infection Sexuellement Transmissible](#)

[LPV /r: Lopinavir/ritonavir](#)

[LTR: Long Terminal Repeat](#)

[M1: Un Mois de Traitement Antirétroviral](#)

[M 3 : Trois Mois de Traitement Antirétroviral](#)

[MA : matrice](#)

[MDR : Mutation Drug Resistance](#)

[MRV : Maraviroc](#)

[NC : nucléo capside](#)

[NIAID : Institut National de l'Allergie et des Maladies Infectieuses](#)

[NIH : Instituts Nationaux de la Santé des Etats-Unis](#)

[NRE : négative regulatory élément](#)

[NVP : Nevirapine](#)

[OMS : Organisation mondiale de la Santé](#)

[ONUSIDA : organisation des nations unies contre le Sida](#)

Mis en forme : Police :Non Gras, Couleur de police : Automatique, Anglais (États Unis)

Mis en forme : Anglais (États Unis)

Mis en forme : Police :Français (France)

Mis en forme : Police :Non Gras, Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Police :Français (France)

Mis en forme : Police :Non Gras, Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Police :Couleur de police : Automatique, Français (France)

Mis en forme : Police :Non Gras, Couleur de police : Automatique, Français (France)

Mis en forme : Français (France)

Mis en forme : Police :Couleur de police : Automatique, Français (France)

Mis en forme : Police :Non Gras, Couleur de police : Automatique, Français (France)

Mis en forme : Français (France)

[PCR : Polymerase Chain Reaction](#)

[Pol : Polymérase](#)

[PTME : Prévention de la transmission Mère-Enfant](#)

[PV VIH : Personnes vivant avec le VIH](#)

[RAL: Raltegravir](#)

[RLFP: Restriction Fragment Length Polymorphism](#)

[RT : Retrotranscriptase](#)

[RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymrease Chain Reaction](#)

[SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquis](#)

[SEREF0 : Centre de Recherche et de Formation sur le VIH et la tuberculose](#)

[TAM : Mutations Analogue de la Thymidine](#)

[TAR : Traitement Antirétroviral](#)

[TCD4 : Cellule de Différenciation T4](#)

[TI: Transcriptase Inverse](#)

[TPV : Tipranavir](#)

[TDF : Tenofovir](#)

[TDR : Test de Diagnostic Rapide](#)

[UFRs : Unique Recombinant Forms](#)

[VHB : Virus de l'Hépatite B](#)

[VHC : Virus de l'Hépatite C](#)

[VIH : Virus de l'immunodéficience Humaine](#)

[WB : Western Blot](#)

Tables des Matières

1. Introduction.....	1
2. Objectifs.....	3
2.1. Objectif Général.....	3
2.2. Objectifs Spécifiques.....	3
3. Généralités.....	5
3.1 Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH).....	5
3.1.1 Historique de découverte du VIH/Sida.....	5
3.1.2 Définition et classification du VIH/Sida.....	5
3.1.3 Structure et morphologie du VIH.....	5
3.1.4 Stabilité physico-chimique.....	7
3.1.5 Cycle de réplication.....	7
3.1.6 Cellules cibles et réservoir du virus.....	8
3.1.7 Mode de transmission et Evolution naturelle de la maladie.....	9
3.1.7.1 Mode de transmission.....	9
3.1.7.2 Evolution naturelle de la maladie.....	9
3.2 Epidémiologie.....	10
3.3 Diversité génétique.....	11
3.3.1 Mécanismes de la diversité génétique.....	12
3.3.2 Conséquences de la diversité génétique.....	13
3.4 Répartition géographique.....	14
3.5 Diagnostique biologique au laboratoire.....	15
3.5.1 Diagnostic indirect ou sérologique.....	15
3.5.2 Diagnostique directe.....	15
3.5.3. Séquençage.....	15
3.5.3.1 Séquençage de l'ADN.....	15
3.5.3.2. Les outils bioinformatiques d'analyse des séquences de l'ADN.....	16

3.5.4.2.1. Objet de la bioinformatique.....	16
3.5.4.2.2. Analyse des séquences.....	16
3.6 .Traitement.....	16
3.6.1. Objectifs du traitement antirétroviral.....	17
3.6.2. Obstacles.....	17
3.6.3. Différentes classes thérapeutiques.....	18
3.6.4. Nouvelles molécules antirétrovirales.....	21
3.6.5 Stratégies de traitement antirétroviral.....	24
3.6.6. Echec thérapeutique.....	27
3.6.6.1. Echec virologique... :	27
3.6.6.2. Echec immunologique.....	28
3.6.6.3. Echec clinique..... :::	28
3.6.7. Observance.....	28
3.6.8. Résistance du VIH aux antirétroviraux.....	28
3.6.8.1 Définition.....	28
3.6.8.2 Mécanisme d'apparition des mutations de résistance.....	29
3.6.8.3 Mécanisme de la résistance aux antirétroviraux.....	29
3.6.8.4 Les analogues nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI).....	29
3.6.8.5 Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI).....	31
3.6.8.6 Inhibiteurs de protéase (IP).....	32
3.6.8.7 Les inhibiteurs d'entrée.....	33
3.6.8.8 Inhibiteurs d'intégrase (INT).....	35
3.6.8.9 Les tests de résistance.....	36
3.6.8.10 Indications et critères d'utilisation des tests de résistance	38
3.6.8.11 Critères de demande de génotypage (cas du Mali).....	38
4. Méthodologie.....	40
4.1 Type et période d'étude.....	40
4.2 Cadre et lieu d'étude.....	40
4.3 Population d'étude.....	43
4.4 Critères d'inclusion.....	43
4.5 Critères de non inclusion.....	43

Mis en forme : Police :Gras

Mis en forme : Police :Non Gras,
Couleur de police : Automatique

<u>4.6 Méthodes utilisées.....</u>	<u>43</u>
<u>4.6.1 Technique Abbott HIV-1 Real Time TM.....</u>	<u>44</u>
<u>4.6.1.1 Principe.....</u>	<u>44</u>
<u>4.6.1.3 Procédure de la technique.....</u>	<u>44</u>
<u>4.6.2 La technique VIROSEQTM.....</u>	<u>49</u>
<u>4.6.2.1 Principe de la technique.....</u>	<u>49</u>
<u>4.6.2.2 Organisation de la paillasse.....</u>	<u>49</u>
<u>4.6.2.3 Réactifs et matériels.....</u>	<u>50</u>
<u>4.6.2.4 Préparation des échantillons.....</u>	<u>53</u>
<u>4.6.2.5 Réaction de la RT-PCR.....</u>	<u>54</u>
<u>4.6.2.6 Réaction de la PCR.....</u>	<u>55</u>
<u>4.6.2.7 Préparation des produits de PCR pour la réaction de séquence.....</u>	<u>56</u>
<u>4.6.2.8 Réaction de séquence.....</u>	<u>57</u>
<u>4.6.2.9 Préparation des échantillons à charger dans le séquenceur.....</u>	<u>58</u>
<u>4.6.2.10 Détection des mutations et analyse des données.....</u>	<u>58</u>
<u>4.6.3 Prélèvement et stockage des échantillons.....</u>	<u>60</u>
<u>4.7 Echantillonnage.....</u>	<u>60</u>
<u>4.8 Analyse des données.....</u>	<u>60</u>
<u>5. Résultats.....</u>	<u>61</u>
<u>6. Commentaires et Discussion.....</u>	<u>72</u>
<u>7. Conclusion et Recommandations.....</u>	<u>79</u>
<u>7.1 Conclusion.....</u>	<u>79</u>
<u>7.2 Recommandations.....</u>	<u>80</u>
<u>8. Références Bibliographiques.....</u>	<u>81</u>

1. Introduction

Epidémie virologique majeure, trois décennies après sa découverte, le virus de l'immunodéficience humaine responsable du syndrome de l'immunodéficience acquis (Sida) reste un problème majeur de santé publique dans le monde entier et particulièrement en Afrique.

Isolé à l'institut Pasteur de Paris par l'équipe de Luc Montagnier, le VIH fait partie de la famille des rétrovirus (virus à ARN, capable de rétrotranscrire celui-ci en ADN proviral grâce à l'activité d'une enzyme, la transcriptase inverse)[1].

Le VIH reste très répandu dans le monde, l'Organisation des Nations Unies contre le Sida(ONUSIDA) et l'organisation mondiale de la santé (OMS) indiquaient dans leur rapport annuel 2013, sur 35,3 millions de personnes vivant avec le VIH dans le monde, les enfants représenteraient 3,3 millions avec 260 000 enfants nouvellement infectés soit 35% de moins qu'en 2009. De 2001 à 2012, le nombre de nouvelles infections chez les enfants a enregistré une baisse de 52% dans les pays à revenu faible et intermédiaire. L'Afrique subsaharienne représentait 88% (2,9 millions) des cas de VIH avec 230000 enfants nouvellement infectés. Dans la même région le nombre de décès dû au Sida était de 190000 enfants en 2012 au Mali.[2].

Au Mali, la cinquième enquête démographique et de santé (EDS M-V), réalisée en 2012 a montré une baisse du taux de prévalence de 1,3% à 1,1% faisant du Mali un pays à faible prévalence avec une tendance à la stabilisation[3].

Le traitement antirétroviral repose sur des molécules agissant à différents niveaux du cycle de réplication du virus. Plus d'une vingtaine de molécules sont actuellement utilisées.

L'avènement de la trithérapie en 1996 avec l'apparition des molécules antirétrovirales, telles que les inhibiteurs de la protéase, a permis d'atteindre l'objectif du traitement antirétroviral. Cet objectif est de réduire considérablement la morbidité et la mortalité liées au sida en ralentissant la prolifération du VIH de tel point que la charge virale plasmatique baisse en dessous des seuils de détection des automates d'analyse (≤ 50 copies/ml ou ≤ 20 copies/ml selon des appareils) afin de reconstituer les défenses immunitaires[4].

Des progrès considérables ont été réalisés au cours des dernières années en matière de prise en charge des enfants infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), l'accès élargi aux services de prévention de la transmission mère-enfant a permis de prévenir l'infection à

VIH chez plus de 670000 enfants au cours de la période 2009-2012[2].

Lancée en 2004, l'IMAARV (Initiative Malienne d'Accès aux ARV) a été marquée par un engagement politique fort en faveur de la lutte contre le VIH qui s'est traduit par la gratuité des ARV. A ce jour, le pays compte 85 sites de traitement, 347 sites PTME et 74 sites de prise en charge pédiatrique. A la fin de l'année 2012, 28.571 patients étaient suivis régulièrement[5]. Les traitements antirétroviraux reposent sur 2 INTI +1 INNTI en première intention et en deuxième intention 2INTI+1 IP/r. Certains patients commencent à être en échec (probablement) dans leur traitement de deuxième intention et le pays est en phase d'acquérir des nouvelles molécules telles que le Raltegravir et le Darunavir pour les traitements de 3ème intention[6].

Cependant il est important de noter que les déterminants de l'échec précoce chez les enfants sont dus à des particularités pédiatriques, de la pharmacocinétique des antirétroviraux, et des difficultés accrues d'observance et d'accession à des formulations réellement pédiatriques. Qui auront comme conséquences une induction des mutations de résistance.

Dans les pays à ressources limitées, où le suivi biologique (Numération des LTCD4, charge virale, test de résistance) et la prise en charge sont insuffisants voir inexistantes, peu de données sont disponibles sur les échecs virologiques et la résistance chez les enfants.

La prise en charge pédiatrique a commencé depuis 2001 au Mali. Plusieurs enfants sont en échec virologique et ne bénéficient pas d'un suivi virologique régulier pour la détection des échecs et la prévention de la survenue des résistances. Très peu de données sont disponibles sur la prévalence de la résistance chez les enfants au Mali.

Il est donc nécessaire, sinon fondamental, de mener une étude sur le suivi à long terme des schémas ARV chez les enfants pour améliorer les recommandations nationales et internationales[2].

HYPOTHESE : Depuis plusieurs années les enfants nés de mère séropositive reçoivent des ARV dans un contexte de suivi biologique très limité. Pour cela nous formulons l'hypothèse que les enfants suivis dans le contexte de suivi biologique limité vont développer et accumuler des mutations de résistance qui vont impacter des molécules non prises.

2. Objectifs

2.1. Objectif général

Evaluer la prévalence des mutations de résistance chez des enfants infectés par le VIH-1, traités et en échec virologique de leur traitement antirétroviral au centre d'excellence de prise en charge pédiatrique au service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré (CEPCP au CHU GT)

2.2. Objectifs spécifiques

- Décrire le profil immunovirologique des enfants au moment du test génotypique de résistance,
- Déterminer le profil de mutations de résistance associées aux différents régimes thérapeutiques chez les enfants,
- Evaluer la diversité génétique des différents sous-types du VIH-1 circulant chez les enfants
- Déterminer la proportion de patients dont les virus restent sensibles aux nouveaux antirétroviraux (Darunavir, Etravirine et Rilpivirine)

3. Généralités

3.1 Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)

3.1.1 Historique de la découverte du VIH /Sida

C'est en 1981 que M. Gottlieb, à Los Angeles, est amené à observer une pneumonie à "*Pneumocystis carinii*" chez un sujet masculin jeune sans antécédents médicaux notables. La Pneumocystose était alors une maladie exceptionnelle rencontrée chez les grands Immunodéprimés iatrogéniques. Ce patient présentait un effondrement d'une population Lymphocytaire jouant un rôle majeur dans l'orchestration des défenses immunitaires : le Lymphocytes T porteurs des récepteurs CD4 (T CD4). En quelques semaines, d'autres cas de Pneumocystose parfois associés à un sarcome de Kaposi vont être répertoriés chez des Hommes jeunes qui sont tous homosexuels. Cette pathologie nouvelle, le « gay syndrome » va faire l'objet de publications et immédiatement des mises en alerte vont apparaître. Le terme de SIDA va alors être retenu pour cette infection.[1]

3.1.2 Définition et classification du VIH/Sida

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine responsable du syndrome d'Immunodéficience Acquis appartient à la famille des *Retroviridae*, Virus à **ARN** monocaténaire, à capsid polyédrique, à enveloppe membranaire, les rétrovirus ont en commun le fait que **leur génome doit être transcrit en ADN** par une ADN polymérase ARN dépendante (synthétisant l'ADN sur une matrice qui est l'ARN génomique), autrement dit une transcriptase inverse (TI ou RT pour *reverse transcriptase* en anglais).[7]

3.1.3 Structure et morphologie du VIH

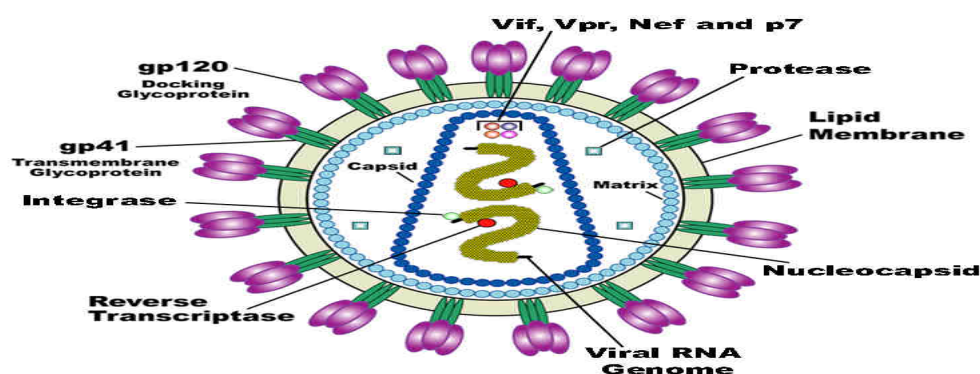


Figure 1 : Structure morphologique du VIH [8]

Le VIH-1 est un virus enveloppé qui contient à sa surface une protéine de fusion ainsi qu'une molécule servant à lier les récepteurs de la cellule cible. C'est sous la bicouche lipidique que se trouve la MA qui elle-même protège la CA de forme conique. Cette dernière protège à son tour la NC, les deux copies du génome viral ainsi que la protéase, la TI et l'IN. Le diamètre de la particule virale varie de 90 à 120 nm.

✓ L'organisation génomique du VIH-1

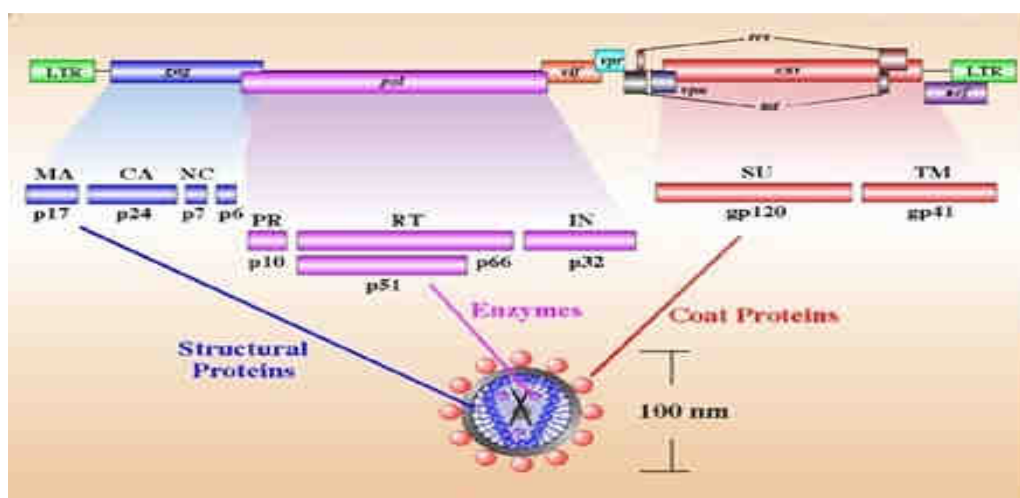


Figure 2 : Structure génomique de l'ADN proviral des VIH-1[8]

Le génome du VIH-1 est présent en deux copies d'ARN identiques de 9200 nucléotides. Ce génome contient trois gènes principaux, *gag*, *Pol*, *env*. qui mènent ensuite à la formation de diverses autres protéines. Le gène *gag* mène à la production du précurseur Gag (Pr55) qui, suite à son clivage, produit la matrice (MA) (p17), la capsid (CA) (p24), la nucléocapsid (NC) (p7) et une petite protéine p6. Ces protéines structurales sont essentielles pour obtenir une particule virale complète. De son côté, le gène *Pol* code pour les enzymes telles que la transcriptase inverse (TI) (rétrotranscription (RT) de l'ARN en ADN), l'intégrase (IN) (intégration de l'ADN viral au génome cellulaire) et la protéase (maturation des particules virales). Finalement, le gène *env*. permet la production des protéines qui constituent l'enveloppe soient la glycoprotéine gp120 et la protéine transmembranaire gp41.

[11]

3.1.4 Stabilité physico-chimique

Le VIH étant un virus enveloppé, il est sensible aux solvants des lipides et aux détergents. Il ne résiste pas à la chaleur puisqu'il est inactivé à 56°C pendant 30 minutes et également par traitement pendant 5 minutes à l'hypochlorite de sodium à 0,2%, l'éthanol à 70 %, le glutaraldéhyde à 0,2 %.[12]

3.1.5 Cycle de réplication

Les cellules cibles du VIH sont celles présentant des récepteurs CD4 à leur surface. Ainsi les lymphocytes T CD4+, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules micro gliales cérébrales peuvent être infectées par le VIH .La réplication virale a lieu dans plusieurs tissus.

La réplication du virus se déroule en plusieurs étapes :

Le virus entre en contact avec le récepteur CD4 via sa glycoprotéine gp120, qui va subir certaines modifications lui permettant de se fixer à un corécepteur (CCR5 ou CXCR4). Cette fixation dévoile la gp41, permettant ainsi la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Il y a peu de temps, il était acquis que la transcription inverse de l'ARN viral n'avait lieu qu'après la décapsidation. Or, de récentes études ont montré que cette étape pouvait avoir lieu également dans la capsid, présente dans le cytoplasme[13]

L'ARN génomique y est ainsi rétro-transcrit en ADN par la TI. L'ADN migre ensuite dans le noyau sous forme de complexe de pré-intégration pour être intégré dans le génome de la cellule hôte sous forme proviral grâce à l'intégrase. L'ADN proviral reste ensuite soit à l'état latent, soit est transcrit en ARN par la machinerie cellulaire. Les ARN produits sont destinés à plusieurs étapes: certains serviront de matériel génétique pour les nouveaux virions, d'autres seront traduits en poly protéines, en ayant subi une étape d'épissage au préalable ou non. Les poly protéines produites vont subir certaines modifications; la gp160 est clivée par une protéase cellulaire en gp120 et gp41, protéines qui vont ensuite migrer vers la membrane cellulaire. Les précurseurs gags et gag-pol vont ensuite être clivés par la protéase virale, qui se sera auto-clivée de gag-pol au préalable. Tous ces éléments vont ensuite se rapprocher de la membrane cellulaire pour être empaquetés. Le virion ainsi formé, après bourgeonnement, entre dans un processus de maturation grâce à la protéase pour aboutir à un virus mature dont la capsid est définitivement assemblée[14]

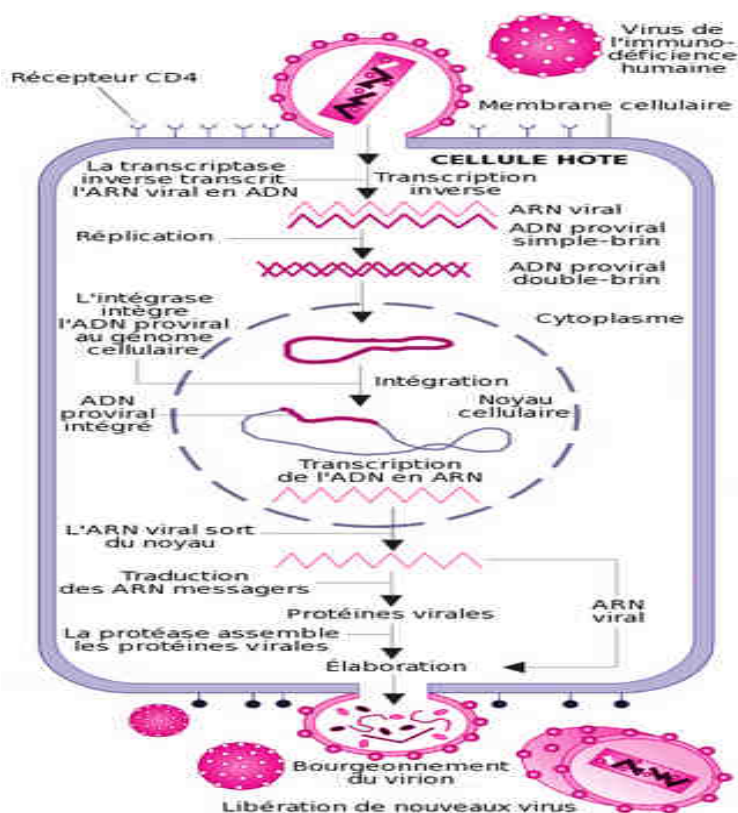


Figure 3: Cycle réplcatif du VIH-1 dans un lymphocyte T CD4+[8].

3.1.6 Cellules cibles et réservoir du virus

Les cellules sensibles à l'infection par le VIH expriment le récepteur CD4 à la surface de leur membrane. Ce récepteur, découvert en 1984, s'avère insuffisant pour permettre l'entrée du virus. Dix ans plus tard, les récepteurs aux chimiokines, CXCR4 et CCR5, ont été désignés comme corécepteurs indispensables à l'entrée du VIH-1 dans sa cellule cible. Parmi les cellules cibles, on retrouve principalement les lymphocytes T CD4+ auxiliaires, mais également les cellules présentatrices d'antigènes, telles que les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans et les cellules micro gliales du cerveau. La majorité des infections (99%) a lieu dans les cellules lymphocytaires activées CD4+ des organes lymphoïdes, réservoir principal du virus. En effet, il semble que le processus de pathogénicité du VIH soit initié précocement dans les organes lymphoïdes.

De plus, une des particularités du VIH est de persister sous forme d'ADN proviral dans les cellules T4 mémoires. Certaines d'entre elles entrent en phase quiescente après infection et intégration du provirus; la réplication cellulaire, donc celle du provirus, est inhibée par un certain nombre de facteurs cellulaires, résultant en un ADN proviral silencieux dans la cellule, et ce jusqu'à plusieurs mois. Ce n'est que lors d'une stimulation immunitaire que les réplifications cellulaires et virales reprennent, aboutissant ainsi à la production de virions capables d'infecter de nouvelles cellules.[16]

3.1.7 Mode de transmission et Evolution naturelle de la maladie

3.1.7.1 Mode de transmission

Le virus est présent dans les liquides biologiques de l'organisme des personnes Infectées. On le retrouve donc dans : le sang, le sperme, le liquide séminal, les sécrétions anales, les sécrétions vaginales et le lait maternel.

Les trois principaux modes de transmission sont donc : la transmission par voie sexuelle, la Transmission par voie sanguine et la transmission verticale (mère/enfant). [17]

3.1.7.2 Evolution naturelle de la maladie

Evolution de l'infection virale selon CDC dans le tableau ci-dessous [9] [19]

Tableau I : Classification CDC selon le statut immunologique du patient (OMS, 1993).

Tableau 3 : Classification CDC 1993 pour les adultes et adolescents			
Nombre de CD4/mm ³	A :	B :	C :
	• Asymptomatique • Primo-infection • Lymphadénopathie	• Symptomatique • Sans critère A ou C	• Sida
> 500	A1	B1	C1*
200-499	A2	B2	C2*
< 200	A3	B3	C3*

Il n'y a pas eu une harmonisation de la définition du SIDA, ainsi la définition du SIDA aux

Etats-Unis correspond aux C* et en France, elle se justifie par un nombre de CD4 inférieur à 200/mm³.

3.2 Epidémiologie

Bien que le sida demeure l'un des défis de santé les plus importants du monde, la solidarité internationale qui s'est mise en place au cours de la dernière décennie pour lutter contre ce fléau continue de générer d'extraordinaires progrès.

Combinée à l'émergence de nouveaux outils efficaces conçus pour prévenir les nouvelles infections et les décès liés au sida, la réussite spectaculaire de l'élargissement et de l'intensification des programmes liés au VIH a permis de jeter les bases de l'éradication définitive de cette maladie.[2]

À l'échelle mondiale, 34 millions [31,4 – 35,9 millions] de personnes vivaient avec le VIH à la fin de l'année 2012. Selon les estimations, 1,12 % des enfants (<15 ans) dans le monde entier vit avec le VIH bien que les circonstances de l'épidémie qui pèsent sur les pays et les régions continuent de varier considérablement.[2]

L'Afrique subsaharienne reste l'une des régions les plus gravement touchées avec près de 2,9 millions des cas de VIH, ce qui représente 88% des personnes vivant avec le VIH dans le monde. La prévalence régionale de l'infection à VIH est près de 25 fois plus élevée en Afrique subsaharienne qu'en Asie mais environ 5 millions de personnes vivent avec le virus dans l'ensemble de l'Asie du Sud, du Sud-est et de l'Est.

À l'échelle mondiale, le nombre de nouvelles infections continue de diminuer : le nombre de personnes (adultes et enfants confondus) infectées par le VIH en 2012 (2.3 million [1.9 million – 2.7 million]) Était de 20 % inférieur à celui de 2001. Là encore, les variations sont flagrantes. Les baisses les plus importantes du nombre de nouvelles infections à VIH depuis 2001 ont été observées dans les Caraïbes (42 %) et en Afrique subsaharienne (25 %).[2]

Au Mali, les résultats de la dernière étude de séroprévalence de l'infection à VIH réalisée en 2012 dans la population générale adulte au cours de l'Enquête Démographique et de Santé (EDS M-V), ont montré une baisse du taux de prévalence du sida de 1,3% à 1,2% faisant du Mali un pays à faible prévalence. Globalement, les femmes sont plus touchées que les hommes (respectivement 1,3% et 0,8%). Le pic de séroprévalence se situe, aussi bien chez les femmes que chez les hommes, dans la tranche d'âge 30-34 ans (2,2%), témoignage d'une épidémie bien installée[3].

3.3 Diversité génétique : Celle-ci tient au processus même de multiplication de ces virus qui sont obligés de transformer leur ARN génomique en ADN pour s'intégrer dans la cellule hôte. Dès 1985, une variabilité génétique importante des VIH a été mise en évidence; il n'existe pas deux virus identiques, même au sein d'un même individu. Cette diversité génétique, due à différents mécanismes (faible fiabilité de la TI, haut niveau de réplication, recombinaison génétique) peut avoir des conséquences sur la réponse aux traitements antirétroviraux.

Le VIH est divisé en deux "groupes", VIH-1 et VIH-2 qui proviennent de 2 événements de transmission inter-espèces différents, issus respectivement du Chimpanzé et du Sootey Mangabey.

Les analyses phylogénétiques du VIH-1 à partir de différents isolats ont permis de le classer en 4 groupes génétiques M (main), O (outlier), N (non-M, non-O) et le dernier groupe P découvert récemment par l'équipe de Plantier[20]

La majorité des infections par le VIH est causée par le groupe M, les infections par les groupes N et O étant restreintes à l'Afrique centrale. Dans le groupe M, 9 sous-types sont reconnus et désignés par les lettres A-D, F-H, J et K, les variations génétiques entre les sous-types allant de 25 à 35% selon les sous-types et les régions du génome considérés[21].

Il existe également des variations au sein d'un sous-type, entre 15 et 20%, tels que le sous-type F, divisé en sous sous-types F1 et F2 et le sous-type A en A1, A2 et A3. Les analyses de tout le génome ont révélé l'existence de virus recombinants inter sous-types, issus de patients surinfectés ou Co-infectés. Ces virus recombinants sont appelés CRFs (Circulating Recombinant Forms) lorsqu'ils ont été identifiés chez au moins 3 individus non liés épidémiologiquement et caractérisés sur tout le génome.

Dans le cas contraire, ils sont appelés URFs (Unique Recombinant Forms), plus de 200 actuellement[22].

A ce jour 51 CRFs ont été identifiés, les recombinants CRF01_AE et CRF02_AG jouant un rôle important dans les épidémies régionales[23]

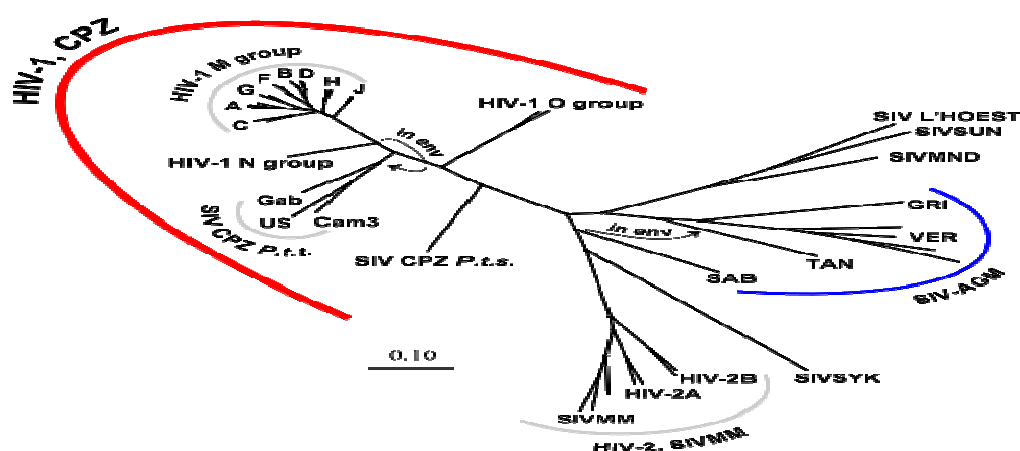


Figure 4: Arbre phylogénétique des VIH[24]

3.3.1. Mécanismes de la diversité génétique

Ces mécanismes sont essentiellement dus à trois aspects :

- **Faible fiabilité de la transcriptase inverse :**

Qui est incapable de corriger les mésappariements introduits lors de la polymérisation de l'ADN proviral et commet un taux d'erreur d'environ un par cycle, soit une erreur introduite par cycle.

- **Grande capacité de réplication :**

Le haut niveau de la réplication du VIH (estimé à $10^9 - 10^{10}$ virions produits par jours chez un individu infecté) induit une variabilité de la population virale au sein même de l'individu appelé quasi-espèce, à cause de la faible fiabilité de la TI.

- **Recombinaison génétique :**

La production de virus recombinants nécessite deux cycles viraux successifs. Lors du premier cycle viral, deux virus différents infectent une même personne, simultanément ou non. Il en résulte une cellule hébergeant deux provirus au sein de son génome.

En effet le génome du VIH étant composé d'un ARN dimérique, la TI a la capacité de passer d'une molécule d'ARN à l'autre lors de la transcription inverse, créant ainsi un ADN proviral chimérique[15]

3.3.2 Conséquences de la diversité génétique

La diversité génétique du VIH-1 résulte d'un taux élevé de la réplication couplé à une faible fidélité de la TI et au phénomène de recombinaison génétique, elle est due à différents mécanismes, et a des impacts multiples sur le diagnostic (sérologique, charge virale) et notamment sur la réponse au traitement antirétroviral.

Les tests de dépistage, reposant sur des antigènes du VIH-1 du sous-type B prévalent en occident et qui peuvent avoir une sensibilité moindre vis-à-vis des autres sous-types de groupe M appelé non B.

- Certaines études laissent entendre que la résistance aux ARV varierait selon les sous-types : par exemple, le groupe O du VIH-1 pourrait présenter une sensibilité moindre aux INNTI.
- Ainsi des études ont montré que plus de 50% des virus non B infectant des patients naïfs portent au moins trois mutations mineures de résistances aux IP, alors qu'elle n'est que 8% pour le B[15] La question de la sensibilité aux ARV, et particulièrement aux inhibiteurs de protéase des souches présentant un grand polymorphisme génétique reste posée.
- La diversité génétique du VIH constitue un obstacle à la mise au point de vaccins efficaces. En effet, la majorité des candidats vaccins, faisant actuellement l'objet d'essais cliniques ont été créés au moyen de souches de VIH-1 de sous-type B (prédominant en Amérique du Nord et en Europe). Cependant, on ignore jusqu'à quel point ces vaccins pourraient conférer une protection Croisée entre les autres sous-types, notamment ceux prédominant en Afrique.
- La recombinaison entre différents types et sous-types peut induire des conséquences génétiques et biologiques de loin plus importantes que celle résultant de l'accumulation stable d'une simple mutation au sein d'un type ou d'un sous-type unique.
- La sélection des mutations à l'échec, les profils d'échappement peuvent également être différent selon le sous type de VIH-1. En effet, certaines mutations spécifiques aux sous-types peuvent être sélectionnées lors du traitement, par exemple le sous-type C, qui présente de nombreuses spécificités[25]

3.4 Répartition géographique

Le VIH est très répandu au niveau mondial, les VIH-1 de sous types non B représentent au moins 90% des virus circulants. Les sous types prédominants sont le sous type C, responsable de 50 % des infections, principalement en Afrique de l'Est, en Asie, le sous type A et le D en Afrique de l'Est, le sous type CRF02_AG en Afrique de l'ouest et le sous type B aux Etats-Unis, en Europe et en Australie[26].

En Afrique centrale, circulent les différents groupes du VIH-1 (M, N et O), l'ensemble des sous-types du groupe M et la majorité des formes recombinantes.

La très grande majorité des infections à VIH-1 groupe O est retrouvée en Afrique de l'Ouest et, plus particulièrement, au Cameroun où différentes études montrent la présence de 3,4 % de patients infectés par le virus de groupe O, soit une prévalence de 0,5 % dans la population générale.

Des études récentes ont démontré qu'en France, des sous types non B circulent, et que la moitié de ces virus isolés sont des virus CRF02_AG, ce qui témoigne des liens existant entre la France et l'Afrique de l'Ouest.

Le VIH-2 a une diffusion beaucoup plus limitée, et est essentiellement présent en Afrique de l'Ouest, en particulier en Guinée-Bissau, Gambie, Sénégal, Côte d'ivoire, Burkina Faso, Mali. Il a atteint le Mozambique et l'Angola, à partir de la Guinée-Bissau et hors d'Afrique la France, l'Inde, le Portugal et le Brésil[26].

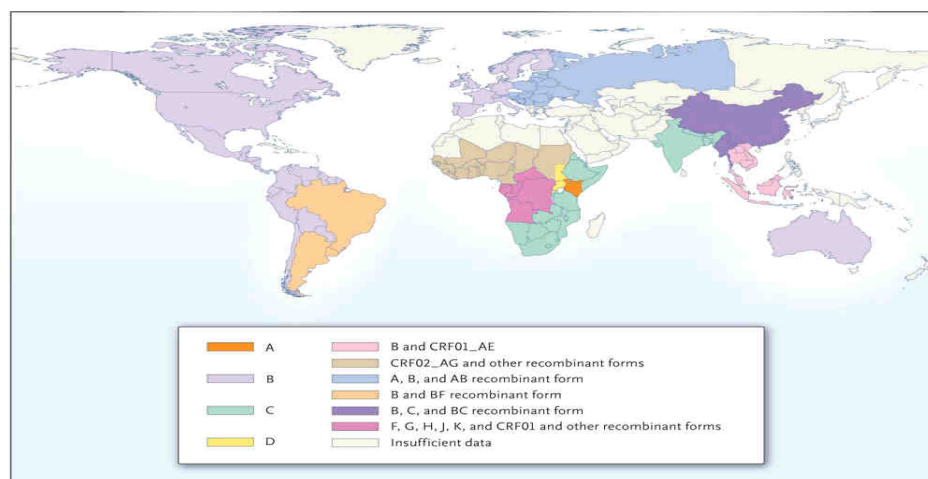


Figure 5 : Distribution géographique des VIH-1 dans le monde. Les sous-types les plus fréquents de façon décroissante sont C, A, B, CRF02_AG et CRF01_AE

3.5 Diagnostique biologique au laboratoire[27]

Le diagnostic d'infection transmise chez l'enfant né de mère séropositive au VIH est actuellement posé avant l'âge de 6 mois par les techniques de diagnostic direct. Le diagnostic indirect ou sérologique, permet d'apporter la confirmation définitive de non infection. Tout nouveau-né de mère séropositive au VIH est « séropositif au VIH » à la naissance, qu'il soit ou non infecté. Cela est dû au transfert passif des anticorps maternels de type IgG à travers la barrière placentaire. De fait, la sérologie reste positive jusqu'à la disparition des anticorps maternels (environ 18 - 24 mois) quel que soit le statut de l'enfant. Le diagnostic d'infection transmise le plus précoce possible repose sur la mise en évidence directe du virus ou de son génome dans l'organisme de l'enfant.

3.5.1 Diagnostic indirect ou sérologique

Il se fait en deux étapes avec un test de dépistage ELISA réalisé au moyen de deux techniques différentes qui doivent être utilisées en parallèle. Si l'un des tests ELISA est positif, il sera confirmé par un test de Western-Blot (WB).

3.5.2 Diagnostique directe

Il repose sur plusieurs techniques toutes réalisées à partir d'un simple prélèvement sanguin qu'il convient de répéter. La PCR-RNA plasmatique met en évidence le génome du virus dans le plasma par RT-PCR. C'est la « charge virale », réalisée également dans le suivi des adultes infectés. Le DNA Provirale recherche le provirus intégré dans les cellules mononucléées réceptives (CD4 essentiellement). A Nice, le laboratoire de virologie effectue, sur le même prélèvement, une PCR-RNA plasmatique et une recherche quantitative de DNA proviral (par PCR quantitative, en temps réel). La conjugaison des deux techniques augmente la sensibilité.

3.5.3 Séquençage

3.5.3.1 Séquençage de l'ADN :

✓ Principe :

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre des nucléotides sur la molécule d'ADN. C'est le niveau de résolution le plus élevé pour rechercher la présence de mutations ponctuelles dans un gène. La méthode utilisée aujourd'hui, proposée par F. Sanger en 1977 (prix Nobel de chimie en 1980), repose sur l'utilisation de nucléotides particuliers appelés di-

désoxynucléotides, qui bloquent la synthèse d'ADN par les ADN polymérase après leur incorporation. Ce blocage est dû à l'impossibilité qu'ont ces nucléotides de former une liaison phosphodiester avec un autre nucléotide en raison de l'absence du groupement hydroxyle sur le carbone 3'.

Depuis 1977, la méthode a considérablement évolué grâce à la mise au point de séquenceurs automatiques et de marquages des nucléotides à l'aide de fluorochromes. Elle est devenue aujourd'hui une technique rapide et fiable utilisée fréquemment dans le diagnostic de certaines maladies héréditaires mais, reste néanmoins coûteuse et réservée à certains gènes en nombre limités et de petites tailles[31]

3.5.4.2 Les outils bioinformatiques d'analyse des séquences de l'ADN :

3.5.4.2.1 Objet de la bioinformatique:

La bioinformatique est une discipline basée sur les acquis de la biologie, des mathématiques, et de l'informatique. Elle consiste en l'ensemble des méthodes et programmes pour gérer, organiser, comparer, analyser, explorer, l'information génique et génomique stockée dans les bases de données dans le but de prédire et produire de nouvelles connaissances et de développer aussi de nouveaux concepts[32]

3.5.4.2.2 Analyse des séquences :

L'analyse bioinformatique fondamentale et principale réalisée sur les séquences d'ADN est l'alignement. Il s'agit de comparer des séquences grâce à des algorithmes.

L'objet d'un alignement de séquences est en général pour :

- Quantifier et localiser la similarité
- Trouver la meilleure mise en correspondance des résidus qui conservent l'ordre des séquences. (Score de l'alignement)
- Prendre en compte des mutations ponctuelles qui se résument en trois événements majeurs : Insertion, Délétion et Substitution.

3.6 Traitement ;

Les antirétroviraux sont des molécules virostatiques de synthèses de différentes natures chimiques regroupées en trois grandes classes selon leur mode d'action : les INTIs, les INNTIs et les IP. Une quatrième classe d'inhibiteurs de la fusion est actuellement en cours de développement.

En 1996 arrive le concept de trithérapie, avec la disponibilité de nouvelles molécules antirétrovirales telles que les inhibiteurs de la protéase, montrant une réduction significative de la mortalité liée au SIDA. En effet, l'objectif principal du traitement antirétroviral est d'empêcher la progression vers le SIDA en restaurant le nombre de lymphocytes T CD4+; il doit rendre la charge virale plasmatique indétectable permettant une meilleure restauration du système immunitaire[33].

3.6.1. Objectifs du traitement antirétroviral

Le traitement de l'infection à VIH a pour objectif la réduction maximale de la réplication virale (charge virale plasmatique < 50 copies/ml permettant d'empêcher la progression vers le SIDA et de restaurer un nombre de lymphocytes CD4 > 500/mm³), garant principal de la durabilité de l'effet antirétroviral, de la restauration des fonctions immunitaires et de l'absence de développement de la résistance du virus en présence de médicaments antirétroviraux. Si l'efficacité immunovirologique du traitement est essentielle, d'autres objectifs doivent être recherchés simultanément :

- La meilleure tolérance possible, à court, moyen et long terme ;
- L'amélioration ou la préservation de la qualité de vie ;
- La réduction de la transmission mère-enfant du VIH.

3.6.2. Obstacles

Les avancées thérapeutiques ne doivent cependant pas laisser place aux triomphalismes car, les raisons suivantes peuvent constituer des obstacles :

- une minorité de patients infectés par le VIH dans le monde entier a accès aux antirétroviraux. En Afrique subsaharienne, seulement 30% des personnes ayant besoin d'ARV en bénéficient réellement.[2]
- les difficultés d'accès aux soins (précarité sociale, désorganisation des structures sanitaires, contexte psychologique...), concernent un nombre significatif de patients,
- les contraintes de traitement au long cours sont réelles,
- les phénomènes de résistance acquise aux antirétroviraux actuellement disponibles surviennent chez un nombre croissant de patients,

- les complications métaboliques (syndrome lypodystrophique, anomalies glucidolipidiques) laissent présager une incidence accrue de complications vasculaires à moyen ou à long terme.

- L'observance chez l'enfant pose des difficultés particulières. Elle peut être influencée par de nombreux facteurs : le choix limite des formulations pédiatriques ; le mauvais goût des formulations liquides ; le grand nombre de comprimés ou la grande quantité de sirop à prendre ; la grosseur des comprimés ; la nécessité de prises médicamenteuses fréquentes ; les restrictions alimentaires ; la perte de la personne principale s'occupant de l'enfant ; les difficultés à avaler les comprimés ; et les effets indésirables. Pour que le traitement d'un enfant soit un succès, une personne qui s'occupe de lui doit être pleinement engagée et impliquée. Les parents et les autres membres de la famille des enfants vivant avec le VIH peuvent eux-mêmes être infectés ; des soins et un traitement sous-optimaux des membres de la famille peuvent donc se traduire par des soins sous-optimaux de l'enfant.[2]

3.6.3. Différentes classes thérapeutiques

Appartenant à six classes d'ARV, plus d'une vingtaine (20) de molécules sont disponibles de nos jours.

✓ Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

-Les inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques (INTI)

Les INTI (ou NRTI pour nucléoside reverse transcriptase inhibitor) sont des pro médicaments qui doivent être triphosphorylés dans la cellule pour être actifs. Ils subissent une activation en nucléoside triphosphate par les kinases cellulaires. Les formes triphosphates (et di phosphate pour le Tenofovir) possèdent une forte affinité pour la transcriptase inverse du virus VIH-1 et entrent en compétition avec les désoxynucléosides triphosphates naturels. Ils sont donc incorporés préférentiellement dans la chaîne de l'ADN en croissance causant une terminaison précoce de celle-ci (en raison du manque 3'-hydroxyl pour former le lien phosphodiester entre nucléotides). Le groupe OH 3' libre est nécessaire pour former une liaison avec le prochain nucléotide de la chaîne nucléotide en formation. Une fois phosphorylée, ces analogues trompent la transcriptase inverse en la faisant incorporer dans la chaîne de nucléotides en formation où ils servent de terminateur de chaîne.[34]

-Les inhibiteurs non nucléosidiques de la Transcriptase inverse (INNTI)

Ces sont des composés de structure chimique complètement différentes de celles des nucléosides normaux. Ce sont des inhibiteurs non compétitifs allostériques.

Les INNTI occupent une poche hydrophobe voisine du site ADN-polymérase. Leur complexation modifie la géométrie de l'enzyme, ce qui diminue considérablement son efficacité catalytique.

Cela provoque un changement de conformation du site actif en déplaçant les résidus d'aspartate catalytiques (en relation avec le site de liaison) de la polymérase de telle façon qu'il ne peut plus se lier à un substrat nucléotide, rendant ainsi l'enzyme inactif [36].

Contrairement aux INTI, les INNTI n'ont pas besoin d'une activation cellulaire puisqu'ils n'ont pas besoin de phosphorylation pour être actifs.

Par conséquent, ces molécules ont un potentiel plus élevé que les INTI et inhibent la transcriptase inverse du VIH-1 de façon irréversible mais pas celle du VIH-1 de groupe O et du VIH-2.

✓ **Les inhibiteurs de la protéase (IP)**

Les inhibiteurs de la protéase (IP ou PI pour protéase inhibitor) bloquent la phase tardive de la maturation virale. La protéase du VIH clive les polypeptides précurseurs, produits des gènes *gag* et *pol* codant les protéines de structure et les enzymes du virion. Les virions produits sous IP sont immatures et incapables d'infecter de nouvelles cellules.

Métabolisés par le cytochrome P450, les IP sont l'objet d'interactions avec d'autres médicaments utilisant les mêmes voies métaboliques. Certains de ces autres médicaments sont contre-indiqués avec les IP, d'autres imposent des ajustements de doses. Les associations de deux IP et d'INNTI peuvent également nécessiter de tels ajustements. L'utilisation des IP est associée, à des degrés divers à une redistribution des graisses, à des troubles de la glycorégulation et à des hyperlipidémies[36].

✓ **Les inhibiteurs d'entrée**

Les inhibiteurs d'entrée ont plusieurs avantages sur les inhibiteurs de la transcriptase inverse et les inhibiteurs de la protéase principalement parce qu'ils agissent de façon extracellulaire. Par conséquent, ils n'ont pas besoin de traverser la membrane cellulaire, ni besoin d'une activation intracellulaire.

-Les inhibiteurs d'attachement

Après la fixation du VIH sur le récepteur CD4, des interactions ont lieu entre le virus et des corécepteurs protéiques, faisant partie de la famille de chimiokines, en particulier le CCR5 et le CXCR4 [37].

Les antagonistes du CCR5 (Maraviroc[®]) sont de petites molécules qui se fixent de façon non compétitives sur la partie transmembranaire du corécepteur et induisent alors une modification des domaines extracellulaires du corécepteur qui empêche la fixation de la gp120[38].

-Les inhibiteurs de fusion

Le seul inhibiteur de fusion actuellement disponible est un polypeptide, devant donc être injecté, dont la séquence correspond à une région de la gp41 (HR2, heptadrepeatregion).

Il se lie de façon spécifique à l'ectodomaine (domaine HR1) de la protéine gp41, au moment où celle-ci est découverte par la liaison de gp120 au récepteur CD4 et aux récepteurs des chémokines.

Les inhibiteurs de fusion empêchent le changement de conformation de gp41 qui mènerait à la fusion des membranes du virus et de la cellule-hôte. En fait, ils seraient liés à la gp41 sous sa conformation de « repos » et l'empêcherait ainsi d'adopter une conformation en épingle à cheveux favorable à la fusion [39].

✓ Les inhibiteurs de l'intégrase

L'intégrase est une enzyme nécessaire à la catalyse de l'étape d'insertion et de transfert de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. Cette étape d'intégration est fondamentale pour le maintien et la stabilité du génome viral, ainsi que pour une expression optimale des gènes viraux.

Les inhibiteurs de l'intégrase constituent une nouvelle classe d'agents antirétroviraux qui bloquent l'activité de l'intégrase du VIH-1[40].

Les inhibiteurs de l'intégrase sont actifs sur les virus résistants aux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI), aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI), aux inhibiteurs de la protéase (IP) et aux inhibiteurs d'entrée. Les inhibiteurs d'intégrase disponibles ou en développement empêchent le transfert de brins. L'ADN non intégré est ensuite dégradé.

3.6.4. Nouvelles molécules antirétrovirales

Tableau II : liste des molécules ARV commercialisées[41]

Dénomination commune Internationale(DCI)	Abréviation	Nom commercial	Autorisation de mise sur le marché
Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse			
Zidovudine	AZT	Retrovir [®]	1987
Lamivudine	3TC	Epivir [®]	1996
Stavudine	d4T	Zerit [®]	1996
Didanosine	ddI	Videx [®]	1992
Abacavir	ABC	Ziagen [®]	1999
Emtricitabine	FTC	Emtriva [®]	2003
Inhibiteur Nucléotidique de la Transcriptase Inverse			
Tenofovir	TDF	Viread [®]	2002
Inhibiteurs non Nucleosidiques de la Transcriptase Inverse			

Résistance aux antirétroviraux chez les enfants et adolescents infectés par le VIH, suivis au service de pédiatrie du CHU GABRIEL TOURE.

Nevirapine	NVP	Viramune [®]	1998
Efavireuz	EFV	Sustiva [®]	1999
Etravirine	ETR	Entelence [®]	2008
Combinaisons d'inhibiteurs de la Transcriptase Inverse			
Zidovudine Lamivudine	/ AZT / 3TC	Combivir [®]	1998
Tenofovir Emtricitabine	/ TDF / FTC	Truvada [®]	2005
Abacavir Lamivudine	/ ABC / 3TC	Kivexa [®]	2004
Zidovudine Emtricitabine Abacavir	/ AZT / 3TC / ABC /	Trivizir [®]	2000
Tenofovir Emtricitabine Efavirenz	/ TDF / FTC / EFV /	Atripla [®]	2007
Stavudine Lamivudine Nevirapine	/ d4T / 3TC / NVP /	Triomune [®]	2001
Inhibiteurs de la protéase			
Indinavir	IDV	Crixivan [®]	1996
Ritonavir	RTV	Norvir [®]	1996
Saquinavir	SQV	Invirase [®]	1996

Résistance aux antirétroviraux chez les enfants et adolescents infectés par le VIH, suivis au service de pédiatrie du CHU GABRIEL TOURE.

Nelfinavir	NFV	Viracept [®]	1998
Fosamprenavir	Fos APV	Telzir [®]	2004
Atazanavir	ATV	Reyataz [®]	2004
Lopinavir ritonavir	/ LPV/ r	Kaletra [®]	2001
Tipranavir	TPV	Aptivus [®]	2005
Darunavir	DRV	Prezista [®]	2008
Inhibiteurs d'entrée			
Enfuvirtide	T20	Fuzeon [®]	2003
Maraviroc	MRV	Celsentri [®]	2008
Inhibiteurs d'intégrase			
Raltegravir	RAL	Isentress [®]	2008

La CROI 2011 (Conférence sur les Rétrovirus et les Infections Opportunistes 2011) à Boston (USA) du 27 Février au 2 Mars a permis de faire le point sur *la Rilpivirine*, un non nucléosidique de deuxième génération, *le Dolutégravir*, une anti-intégrase, et *le BMS-068*, un inhibiteur d'attachement, ce dernier était pendant l'actualité de la CROI 2014 à Boston, Etats-Unis, 3-6 mars 2014.

La Rilpivirine proche du niveau structural de l'étravirine a été développée par Jansen. Elle a été approuvée en Mai 2011 aux Etats-Unis par la Food and Drug Administration, elle est en cours d'évaluation en Europe[42].

Le Dolutégravir est un nouvel inhibiteur développé récemment par ViiVHealthcare. Les résultats d'étude de phase IIb permettront de mieux conclure sur l'efficacité du Dolutégravir chez les patients infectés par un virus résistant au Raltegravir[43].

Parmi les approches thérapeutiques innovantes figure le développement par BMS du 1^{er} inhibiteur d'attachement BMS-663068. Son métabolite actif, le composé BMS-626529, se lie à la gp 120 virale et inhibe l'attachement du virus au récepteur principal CD4. Le CRF01_AE et le VIH-2 sont des résistants naturels à cette molécule[44].

3.6.5 Stratégies de traitement antirétroviral

En l'absence de vaccin anti-VIH, le traitement antirétroviral comme outil de prévention de la transmission est une évolution récente et majeure, avec plusieurs études qui démontrent le rôle bénéfique des ARV non plus seulement au niveau de la santé de l'individu mais aussi dans la réduction drastique de la contagiosité lorsque la charge virale plasmatique est contrôlée sous traitement[45].

Ainsi l'OMS recommande en 2010 l'initiation du traitement chez les patients symptomatiques (infection opportuniste majeure, autre affection de la catégorie C de la classification CDC 1993 ou symptômes marqués ou récidivants de la catégorie B) et chez les sujets asymptomatiques ayant un nombre de lymphocytes CD4 < 350 / mm³.

Schémas thérapeutiques

Le schéma thérapeutique préconisée par l'OMS en première intention est l'utilisation de (02) INTI+ (01) INNTI ou (02) INTI+ (01) IP/r (/r = boosté par le ritonavir) avec l'usage de molécules moins toxiques et de combinaisons de thérapie antirétrovirale de dose fixe.

Au Mali, les régimes préférentiels en première intention ou schéma de 1^{ère} ligne et en deuxième intention ou de 2^{ème} ligne chez les nourrissons et les enfants sont les suivants :

1. Enfants âgés de 3 ans à 10 ans et les adolescents de moins de 35 Kg

L'option thérapeutique préférée en première ligne est une trithérapie associant deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) à un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (INNTI).

Le schéma préférentiel en première ligne :

- Abacavir (ABC) + Lamivudine (3TC) + Efavirenz (EFV)

Les régimes alternatifs suivants sont possibles:

- Abacavir (ABC) + Lamivudine (3TC) + Névirapine (NVP)
- Zidovudine (AZT) + Lamivudine (3TC) + Névirapine (NVP)
- Zidovudine (AZT) + Lamivudine (3TC) + Efavirenz (EFV)
- Tenofovir (TDF) +Lamivudine (3TC) + Névirapine (NVP)
- Tenofovir (TDF) +Lamivudine (3TC) + Efavirenz (EFV)

2. Enfants de moins de 3 ans

Le régime préférentiel est une trithérapie comprenant : 2 INTI + 1IP

- Abacavir (ABC) + Lamivudine (3TC) + Kaletra (LPV/r)

Le régime alternatif sera 2INTI + 1INNTI :

- Abacavir (ABC) + Lamivudine (3TC) + Nevirapine (NVP)
- Zidovudine (AZT) + Lamivudine (3TC) + Nevirapine (NVP)

En cas de contre-indication ou de toxicité à une molécule du schéma préférentiel de première ligne, on substituera la molécule incriminée par une autre molécule.

Schémas préférentiels de deuxième ligne

Comme chez l'adulte, le traitement repose sur l'association de 2 inhibiteurs nucléosidiques et d'un inhibiteur de la protéase «boosté» par le Ritonavir.

Le régime : **Abacavir (ABC) + didanosine (DDI) + Lopinavir/Ritonavir (LPV/r)**

Le Nelfinavir (NFV) peut être utilisé en cas d'intolérance au Lopinavir/Ritonavir ou si la chaîne du froid n'est pas assurée (thermolabilité du Ritonavir)

Tableau III: Les alternatives de seconde ligne possibles en fonction des schémas utilisés en première ligne et en cas de contre-indications ou de toxicité de l'une des molécules du schéma préférentiel[46]

	Enfant (y compris l'adolescent)	Schéma d'ARV de première intention	Schéma d'ARV de deuxième intention
Schéma thérapeutique de première intention basé sur du LPV/r	Moins de 3 ans	ABC + 3TC + LPV/r	Pas de changement ^a
		AZT + 3TC + LPV/r	
	3 ans et plus	ABC + 3TC + LPV/r	AZT + 3TC + EFV
		AZT + 3TC + LPV/r	ABC ou TDF ^b + 3TC + EFV

Schémas possible de 3^{ème} ligne chez les enfants

Les patients en échec virologique de 2^{ème} ligne doivent être gérés en fonction du résultat du test de génotype de résistance.

Choix des combinaisons de molécules :

- Darunavir + Etravirine + Raltégravir
- Darunavir + Lamivudine + Raltégravir
- Etravirine + Lamivudine + Raltégravir

Les indications de traitement antirétroviral chez les enfants et nourrissons pour lesquels l'infection est confirmée sont en premier lieu l'initiation précoce du traitement ARV.

Nourrissons :

- Initier le traitement ARV chez tous les nourrissons infectés diagnostiqués dans la 1^{ère} année de vie quelque soit le taux de CD4 ou le stade clinique OMS.

Enfants :

- Initier le traitement ARV chez tous les enfants infectés âgés de moins de deux ans, quelque soit le taux de CD4 ou le stade clinique OMS.
- Initier le traitement ARV chez tous les enfants infectés âgés de 24 à 59 mois, avec un nombre de CD4 ≤ 750 cellules/mm³, celui le plus bas quelque soit le stade clinique OMS.
- Initier le traitement ARV pour tous les enfants infectés âgés de 5 ans et plus avec un nombre de CD4 ≤ 350 cellules/mm³ (comme chez l'adulte) quelque soit le stade clinique OMS.
- Initier le traitement ARV pour tous les enfants infectés avec un stade clinique 3 et 4 quelque soit le taux ou le nombre de CD4.
- Initier le traitement ARV pour tout enfant âgé de moins de 18 mois avec un diagnostic clinique présomptif d'infection à VIH.

Les principes du traitement antirétroviral de l'enfant sont identiques à ceux du

Traitement de l'adulte avec cependant quelques particularités :

- L'éducation thérapeutique de ceux qui ont la charge de l'enfant, garante de la bonne observance, est primordiale.
- Les posologies doivent être ajustées en permanence en fonction de l'évolution pondérale des enfants.

- Il n'existe pas toujours de formes galéniques adaptées à l'usage pédiatrique. Les formes pédiatriques (sirops, suspensions) sont utilisées chez l'enfant de moins de 15 kg ; on préférera les comprimés pour l'enfant de plus de 15 kg[5].

4.6.6. Echec thérapeutique

L'échec thérapeutique regroupe différentes situations.

3.6.6.1. Echec virologique

L'échec virologique constitue la situation la plus fréquemment rencontrée. Il est stricto sensu défini comme toute valeur détectable de la charge virale plasmatique, c'est-à-dire juste au dessus du seuil de détection. Actuellement, un seuil à 50 copies/ml est le plus souvent utilisé et constitue l'objectif à atteindre pour toute intervention thérapeutique quelle que soit la situation thérapeutique : traitement initial ou traitements de ligne ultérieure[48].

Au Mali, l'échec virologique est défini comme étant l'impossibilité de réduire la charge virale à un niveau indétectable après six mois de traitement bien conduit. Il est caractérisé par une charge virale plasmatique supérieure à 1000 copies/ml après vérification de l'observance [5].

Il faut différencier l'échec virologique du « rebond virologique » qui est défini comme une charge virale détectable après une période d'indétectabilité (au moins 2 points consécutifs) ; ce dernier aussi doit être distingué d'un « blip » de la charge virale (détection d'une charge virale plasmatique isolée comprise entre 50 et 1000 copies/ml sur un prélèvement avec un point suivant de charge virale, réalisé au plus tard un mois après, < 50 copies/ml)[49].

En règle générale, l'échec virologique résulte d'une inhibition suboptimale de la réplication virale, conséquence d'une puissance insuffisante du traitement. Celle-ci peut être due :

- à une concentration de molécules antirétrovirales insuffisante, résultant soit d'un défaut d'observance, soit de posologies inadaptées, soit d'interactions médicamenteuses néfastes ;
- au développement de la résistance vis-à-vis d'une ou de plusieurs molécules antirétrovirales[50]

3.6.6.2. Echec immunologique

Il est défini par l'absence d'ascension des lymphocytes CD4 malgré un traitement antirétroviral efficace depuis au moins 6 mois. Cette situation se rencontre plus volontiers chez les patients ayant initialement un taux de lymphocytes CD4 pré thérapeutique bas, un âge plus avancé. Cet échec peut s'accompagner d'un succès ou d'un échec virologique[47].

3.6.6.3. Echec clinique

Il se caractérise par la survenue de manifestations cliniques témoins de la progression de la maladie VIH (symptômes liés au VIH, nouvelle infection opportuniste ou rechute d'une infection préexistante, survenue de tumeurs)[47].

Habituellement, ce stade d'échec clinique est la conséquence d'un échec virologique et immunologique.

3.6.7. Observance

Compte tenu de la puissance antirétrovirale des traitements actuellement utilisés en initiation, l'absence de réduction de la charge virale d'au moins $1 \log_{10}$, 1 mois après l'initiation du traitement, ou une charge virale toujours > 200 copies/ml à 6 mois rendent presque toujours compte d'une observance médiocre au traitement.

3.6.8. Résistance du VIH aux antirétroviraux :

La résistance aux antirétroviraux a été rapportée pour la première fois en 1989 chez des patients traités par la zidovudine en monothérapie[51]

3.6.8.1 Définition :

La résistance aux antirétroviraux est liée à la capacité du virus à se répliquer en présence d'ARV.

On distingue 03 types de résistance ; la résistance acquise sous traitement (résistance secondaire), la résistance primaire et la résistance naturelle (manque de sensibilité).

En effet, pour cette dernière, les patients porteurs de virus résistants peuvent transmettre ces virus à leurs partenaires qui vont alors s'infecter d'emblée avec des virus résistants lors de la primo-infection.

3.6.8.2 Mécanisme d'apparition des mutations de résistance :

Plusieurs facteurs liés à la durée de vie et au cycle de réplication du VIH sont des contributeurs clés vers une émergence rapide et généralisée de résistance qui est observée avec cet organisme.

Les mutations entraînent des modifications des enzymes ou protéines, en diminuant la sensibilité des virus aux antirétroviraux par des mécanismes différents selon les classes et même selon l'antirétroviral dans une même classe[52]

Ces mécanismes peuvent être dus :

- ✓ à la dynamique de production virale très rapide, il a été calculé qu'environ 10 milliards de virions étaient produits chaque jour chez une personne infectée.
- ✓ à la variabilité génétique importante du VIH,

La TI fait une erreur par cycle de réplication (1 erreur tous les 10 000 nucléotides), d'où l'introduction au hasard de mutations tout au long du génome.

Pendant que la plupart de ces erreurs sont des substitutions de bases, autres mutations comme les insertions ou duplications peuvent aussi se produire. Ce qui conduit à un taux important de recombinaisons, d'où l'existence d'une population virale diversifiée appelée quasi-espèce ou variants viraux.

- ✓ à la préexistence, avant tout traitement, de variants viraux présentant des mutations de résistance aux ARV, qui peuvent s'accumuler.

3.6.8.3 Mécanisme de la résistance aux antirétroviraux :

Différents mécanismes de résistance ont été identifiés en fonction des classes d'antirétroviraux et même selon les antiviraux au sein d'une même classe.

3.6.8.4 Les analogues nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) :

Deux mécanismes moléculaires distincts sont responsables de la résistance aux analogues nucléosidiques : la diminution de l'incorporation de l'analogue lors de la synthèse de l'ADN et l'excision de l'analogue de la chaîne d'ADN.

- **Diminution de l'incorporation de l'analogue :**

La diminution de l'incorporation des nucléosides ou nucléotides artificiels au profit de nucléotides naturels est observée avec certaines mutations, et en particulier la mutation M184V associée à une résistance de haut niveau au 3TC (Lamivudine) et au FTC. Ce résidu est localisé au niveau du site catalytique de la transcriptase inverse.

La substitution d'une méthionine par une valine gêne l'incorporation du 3TC/FTC au niveau du site catalytique de l'enzyme générant la résistance à cette molécule. L'apparition de la résistance au 3TC/FTC est rapide avec la sélection de la mutation M184V en quelques semaines.

Ce mécanisme de résistance est également caractéristique des mutations K65R, K70E et L74V :

- La mutation L74V est sélectionnée par la didanosine et l'abacavir (en association fréquente avec la M184V) et les mutations K65R et K70E principalement par le ténofovir ;

- L'impact de la mutation K65R est nul sur les analogues de la thymidine (la zidovudine est l'INTI de choix en présence de K65R), certain sur le ténofovir probable sur l'abacavir (avec des niveaux variables). L'utilisation de ténofovir en association avec l'abacavir doit être réservée aux patients en échec dont les virus présentent des mutations TAM. En effet, ces dernières empêchent la sélection de la mutation K65R.

Le complexe MDR (Mutation Drug Resistance), relevant de ce même mécanisme, est composé des mutations A62V, V75I, F77L, F116Y et Q151M.

Un autre profil de résistance à l'ensemble des analogues nucléosidiques et au ténofovir consiste en des insertions au codon 69 de la transcriptase inverse. Ce complexe comprend une mutation au codon 69, typiquement une sérine, et une insertion d'acides amines (S-S, SA, S-G ou autre). Ces insertions au codon 69 sont souvent associées à d'autres mutations sur le gène de la transcriptase inverse. La fréquence de ces insertions est heureusement rare[53].

- **Excision des analogues médiée par l'ATP ou réaction de pyrophosphorolyse :**

Ce mécanisme intervenant dans la résistance aux INTI est conféré à un groupe de six mutations : M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F et K219Q/E. ces mutations, initialement décrites comme des mutations de résistances sélectionnées par la zidovudine puis également par la Stavudine, affectant la réponse virologique à ces molécules, ont été appelées TAM pour Thymidine Analogue Mutations[54][55]

L'accumulation des TAMs est graduelle et l'ordre d'apparition peut varier. Les profils de TAM sélectionnés sous traitement peuvent se répartir en deux groupes : l'un comprenant les mutations M41L + L210W + T215Y (deux tiers des cas) et l'autre D67N + K70R + T215F + K219Q/E (un tiers des cas).

En effet, les TAM modifient la structure de la transcriptase inverse, facilitant l'entrée de l'ATP au niveau d'un site proche de l'analogue incorporé à l'ADN. Le phosphate terminal de l'ATP réagit avec la liaison phosphodiester liant l'analogue à l'ADN. Cette réaction entraîne l'excision de l'analogue et la libération du groupement OH du dernier nucléotide. La synthèse de l'ADN viral peut alors reprendre. Ce mécanisme sensible est efficace pour la zidovudine. L'incorporation des désoxynucléotides naturels et de la plupart des analogues nucléosidiques dans l'ADN est rapidement suivie de leur translocation en un « complexe fermé » et, dans cette conformation, la liaison phosphodiester est réfractaire à l'excision par l'ATP. La mutation M184V semble entraîner une diminution de la pyrophosphorolyse, ce qui inhiberait ainsi l'effet des TAM[56]

Les TAM sont responsables d'une résistance à l'ensemble des INTI à des niveaux divers, sauf à la 3TC et au FTC. Cette résistance croisée est variable en fonction du nombre de TAM et de l'INTI. Par ailleurs, les mutations K70R et K219Q/E ont moins d'impact que les quatre autres sur la résistance croisée. La mutation M184V, en présence de TAM, augmente la résistance in vivo à l'Abacavir et n'a pas d'impact sur la Tenofovir ni la didanosine.

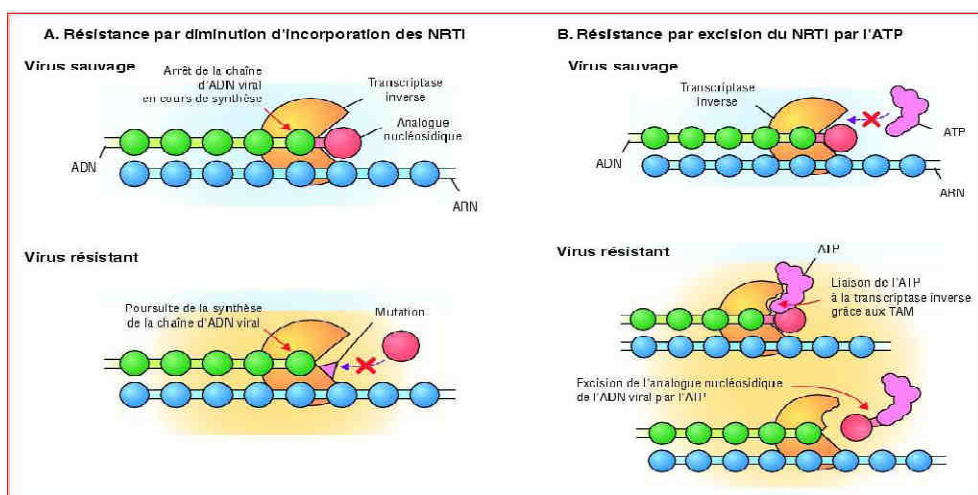


Figure 6 : Deux principaux mécanismes de résistance du VIH-1 aux INTI[57]

4.6.8.5 Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) :

Les inhibiteurs non nucléosidiques comme l'éfavirenz et la Nevirapine pour les molécules de première génération sont de petites molécules qui se fixent au niveau d'une poche hydrophobe située à proximité du site catalytique de la transcriptase inverse.

Ces composés sélectionnent des mutations situées au niveau de leur site de fixation qui affecte la flexibilité de l'enzyme, bloquant ainsi la synthèse de l'ADN. Ce sont typiquement des molécules dont la « barrière génétique » est basse puisqu'une mutation au niveau de la poche hydrophobe confère une résistance croisée entre éfavirenz et Nevirapine, INNTI de première génération. De nouvelles molécules de seconde génération, comme l'étravirine et la rilpivirine sont actives in vitro et/ou in vivo sur certains virus ayant une résistance aux INNTI de première génération [58][59] L'essai DUET a ainsi démontré que la mutation K103N n'avait pas d'impact délétère sur la réponse virologique à l'Etravirine. En revanche, la mutation Y181C a un impact négatif quand elle est associée à d'autres mutations de résistance aux INNTI. Enfin, les mutations Y181I/V, même isolées, réduisent significativement la réponse à l'étravirine[60]

Il existe in vivo une résistance croisée élevée entre étravirine et rilpivirine. Il est évident que l'accumulation de mutations de résistance aux INNTI de première génération diminue l'efficacité de l'étravirine : il est donc recommandé de ne pas laisser une réplique résiduelle sous éfavirenz ou Nevirapine pour ne pas accumuler ces mutations et réduire l'efficacité de traitement ultérieur par des molécules de seconde génération telles que l'étravirine ou Rilpivirine.

3.6.8.6 Inhibiteurs de protéase (IP) :

Les inhibiteurs de protéase (IP) constituent une famille importante qui bénéficie d'une barrière à la résistance élevée même s'il existe au sein de cette classe une importante résistance croisée.

La résistance aux IP est un phénomène graduel avec accumulation progressive de mutations au niveau du site actif de l'enzyme et à distance de celui-ci. On distingue des mutations de résistance majeures et mineures :

- Les mutations mineures/secondaire, qui sont des mutations pouvant faire partie du polymorphisme de la protéase virale, apparaissent plus tardivement et vont augmenter la résistance aux IP et aider le virus à retrouver ses capacités répliquatives.
- Les mutations majeures/primaires sont généralement sélectionnées les premières lors d'un échappement et diminuent la liaison des IP à leur substrat enzymatique.

De nombreuses études montrent qu'il existe une grande différence entre les IP potentialisés par le ritonavir (IP/r) et les IP non potentialisés en terme de réponse virologique et de taux de sélection de mutations de résistance chez les patients naïfs d'antirétroviraux[61].

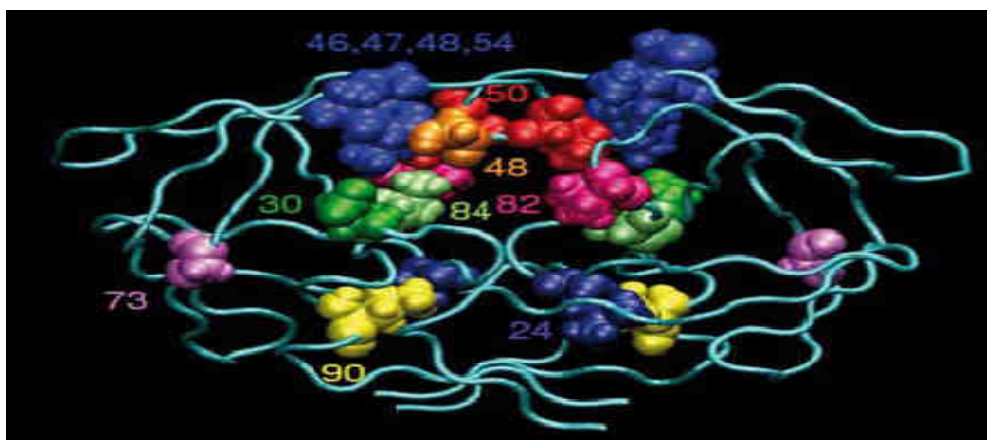


Figure 7 : Position des principales mutations de résistance aux IP[62]

3.6.8.7 Les inhibiteurs d'entrée :

L'entrée du virus dans la cellule requiert plusieurs étapes, avec successivement la liaison de la gp-120 à la molécule CD4, puis à un corécepteur, récepteur de chimokines, CCR5 et/ou CXCR4. Ces événements sont responsables de l'association des deux boucles trimériques, HR-1 et HR-2 (HeptadRepeat), localisées dans la gp 41, conduisant à un rapprochement des membranes virale et cellulaire et à leur fusion. La composition en acides aminés de la boucle variable V3 de la gp-120 détermine la reconnaissance spécifique du corécepteur.

- **Inhibiteur de fusion :**

L'inhibiteur de fusion, enfuvirtide ou T20 (Fuzéon), est un peptide de 36 acides aminés dérivé de la région HR-2 de la gp-41. Il se fixe à la boucle trimérique HR-1 inhibant ainsi la fusion et l'entrée du virus dans la cellule. Des mutations dans HR-1 réduisant la sensibilité au T-20 ont été identifiées in vitro mais aussi in vivo chez des patients échappant à l'enfuvirtide dans les essais cliniques[63]. Ces mutations sont situées au niveau des codons 36 à 45 de la gp 41. Elles apparaissent rapidement (quelques semaines) en cas de réplication virale sous T 20. Des mutations sont sélectionnées plus tardivement dans HR-2, mais elles n'ont pas d'impact sur la résistance au T 20 et compensent probablement des mutations de HR-1 pour la capacité répliquative virale.

Il n'existe pas de résistance croisée entre le T20 et d'autres inhibiteurs d'entrée tels que les inhibiteurs du corécepteur CCR5.

- **Inhibiteur des corécepteurs :**

De petites molécules inhibitrices de l'interaction gp-120-CCR5, telles que le maraviroc, sont des antagonistes allostériques non compétitifs qui se lient au même site que la gp-120 sur le corécepteur CCR5. Le maraviroc (Celsentri) a obtenu son autorisation de mise sur le marché en Europe chez les patients prétraités par antirétroviraux et infectés par des isolats VIH à tropisme R5.

In vitro, la résistance au maraviroc est liée à des échappements de la gp-120 qui permettent à l'enveloppe virale de s'attacher au complexe CCR5-Maraviroc[64] Mais peu d'isolats cliniques résistants au maraviroc ont été étudiés. La résistance semble associée à des mutations de la boucle V3, variables d'un isolat à l'autre, en particulier aux positions 13 et 26. En pratique clinique, les échappements thérapeutiques aux inhibiteurs de CCR5 ont été attribués le plus souvent à la sélection de virus de tropisme CXCR4, préexistants en proportion minoritaire au traitement et non détectés par les tests de tropisme. La détermination du tropisme virale est donc absolument nécessaire avant la prescription d'inhibiteurs de CCR5. Une autre molécule est en cours de développement, il s'agit du Vicriviroc qui agit aussi sur les virus à tropisme R5.

- **Test de tropisme :**

Les tests de tropisme actuellement disponibles sont soit des tests phénotypiques, soit des tests génotypiques. Le test phénotypique commercialisé est le test Trofile® (Monogram Biosciences, San Francisco, CA, Etats-Unis), test recombinant nécessitant l'amplification du gène env du virus plasmatique du patient, puis la construction d'un pseudovirus infectieux alors inoculé sur des cellules exprimant soit CCR5, soit CXCR4. Ce test ne différencie pas un virus à tropisme mixte d'une population virale mixte constituée de virus X4 et de virus X5.

En juin 2008, le test Trofile® initial a été remplacé par un test sensibilisé (ESTA : Enhanced Sensitivity Trofile Assay) permettant la détection des sous-populations X4 minoritaires avec une sensibilité de 0,3%. Le test ESTA a été notamment utilisé dans la réalisation de l'essai Merit (Maraviroc chez les patients naïfs) [65]. Dans tous les cas, il ne peut être réalisé à partir de l'ARN plasmatique que lorsque les charges virales sont supérieures à 1000 copies /ml.

Il existe d'autres tests phénotypiques disponibles de ce cas dans la recherche : le test PhenX-R (InPheno, Basel, Switzerland) et le Toulouse Tropisme Test (TTT, Université de Toulouse-III Paul-Sabatier [66].

Les tests génotypiques de tropismes sont fondés sur l'analyse de la séquence de la boucle V3 de la gp-120 du virus du patient avec différents systèmes d'interprétation disponibles [67].

L'analyse de la boucle V3 réalisée à partir de l'ARN-VIH-1 plasmatique a, comme pour les tests génotypiques de résistance, une efficacité d'amplification moindre quand les charges virales sont inférieures à 500 copies/ml. Deux systèmes d'interprétations, geno2pheno et PSSM, ont été évalués rétrospectivement dans les bases de données utilisant le maraviroc et ont montré une valeur prédictive équivalente à celle du test Trofile® sur la réponse virologique à cette molécule[68].

Les tests génotypiques de tropisme peuvent être réalisés à partir de l'ADN viral chez les patients avec des CV plasmatiques faibles ou indétectables mais il existe peu de données sur la validation des tests génotypiques de détermination de tropisme pour les virus de sous-type non-B[68]

3.6.8.8 Inhibiteurs d'intégrase (INI) :

En décembre 2007, le premier inhibiteur de l'intégrase (INI), le Raltégravir, obtenait son autorisation de mise sur le marché (AMM).

D'autres molécules comme l'elvitégravir et le Dolutégravir sont en cours de développement.

La résistance aux inhibiteurs d'intégrase est due à la sélection et à l'émergence, sous traitement, de variants viraux initialement minoritaires, portant des mutations de résistance. In vivo, trois profils majoritaires distincts comportant soit la mutation N 155H, soit la mutation Q148H/K/R, ou la mutation à la position 143 associés à une ou plusieurs mutations secondaires, ont été mis en évidence en cas d'échappement virologique au Raltégravir[69].

En ce qui concerne l'elvitégravir, différents profils peuvent être sélectionnés, notamment les mutations E92G/Q ou N155H ou Q148R/K[70]. Il existe une résistance croisée très importante entre la Raltégravir et l'elvitégravir.

La barrière génétique des molécules de 1ère génération (Raltégravir et Elvitégravir) de cette classe est faible et une seule mutation peut induire d'emblée une résistance complète à ces molécules.

Un nouvel inhibiteur d'intégrase, le S/GSK1349572 (le Dolutégravir), ayant un profil de résistance différent du Raltégravir et de l'elvitégravir, est en cours de développement en phase III. Cette molécule est actuellement efficace sur des virus résistants aux molécules de 1ère génération mais reste résistant à tous les virus qui portent la mutation Q148R/K. Dans une étude théorique Maiga et al, ont montré que les VIH-1 de sous-type CRF02_AG échappent préférentiellement avec la voie N155H qui pourrait donner une bonne sensibilité de ces virus aux molécules de 2ème génération telle que le Dolutégravir.

3.6.8.9 Les tests de résistance :

Les tests génotypiques recherchent après séquençage de l'ARN les mutations associées à la résistance aux antirétroviraux. Les tests phénotypiques mesurent la sensibilité du virus aux molécules par culture du virus en présence du/des composés.

- Tests génotypiques :

Les tests génotypiques analysent les mutations présentes sur les gènes codant les protéines cibles des antirétroviraux (TR, protéase, gp41, intégrase). L'analyse de toute la séquence des gènes de la transcriptase inverse et de la protéase est la technique de référence en matière tests génotypiques.

Deux trousse commerciales de séquençage sont disponibles, avec intégration d'un logiciel interprétant le profil de mutation : les trousse des firmes Bayer (trugene HIV-1 genotyping kit) et Abbott (perkin Elmer ABI ViroSeqGenotyping System) ont reçu l'agrément d'utilisation par l'agence française de sécurité sanitaire et de la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis. Ces deux trousse commerciales, évaluées dans un laboratoire, donnaient des résultats très concordants (97,8%).

Il faut souligner que le séquençage ne permet d'analyser que la population virale majoritaire représentant au moins 20 à 30 % de la population virale totale circulante dans le plasma. Les techniques de détection des populations virales minoritaires sortent actuellement du cadre de la pratique clinique et sont réservées aux protocoles de recherche.

Un contrôle de qualité, organisé chaque année successivement depuis 2001 par le groupe résistance AC11 de l'ANRS, puis par le CNR VIH Résistance aux antirétroviraux depuis 2008, concerne actuellement une cinquantaine de laboratoires, incluant quelques laboratoires de ville. La fréquence de résultats faussement positifs (mutation de résistance retrouvée alors que la séquence est sauvage) est basse, mais celle de faux négatifs (mutation de résistance non détectée) est plus élevée.

Cette sous estimation des mutations de résistance est rapportée dans d'autres contrôles de qualité en Europe. Le contrôle de qualité a un rôle pédagogique important, comme l'a montré l'augmentation des performances des laboratoires depuis son instauration[71].

- Tests phénotypiques :

Deux firmes proposent des tests phénotypiques commerciaux utilisant une technique de virus recombinants : le test Antivirogram de Virco et PhenoSene de Monogram.

Les résultats des tests phénotypiques commerciaux sont exprimés par le rapport entre la CI50 ou CI90 (respectivement concentration inhibitrice 50 % ou 90 %) de la souche du patient et celle d'un isolat sensible de référence. Les tests phénotypiques n'ont pas montré de bénéfice clinique pour la prise en charge thérapeutique des patients et sont peu utilisés en pratique ; en revanche, ils restent aujourd'hui un outil indispensable à l'évaluation de nouvelles molécules in vitro et au cours des essais thérapeutiques (phases I/II) de ces nouveaux antirétroviraux.

En plus des tests Antivirogram et PhenoSene il existe le test phénotypique virtuel de Virgo. Ce test permet de prédire la sensibilité phénotypique d'un isolat en se basant sur son test génotypique de résistance. Le test virtuel n'est pas un test de sensibilité à chaque drogue mais un système d'interprétation d'un test génotypique.

3.6.8.10 Indications et critères d'utilisation des tests de résistances :

Tableau IV : Résumé des recommandations d'utilisation des tests de résistance en France.

Situation clinique	Recommandation
Primo-infection et infection récente (<6 mois)	Recommandé
Avant l'initiation du traitement : <ul style="list-style-type: none">- A la découverte de la séropositivité- Sinon sur le prélèvement disponible le plus ancien- Ou avant de débiter le traitement	Recommandé dès que possible car avec le temps un virus sauvage dans le plasma peut remplacer le virus muté présent au moment de l'infection qui se sera archivé
Echecs thérapeutiques	Recommandé La décision thérapeutique doit intégrer l'histoire thérapeutique et les tests de résistance antérieurs
Prophylaxie post exposition	A réaliser au cas par cas
Enfants	Mêmes indication que chez l'adulte
Grossesse	Recommandé avant l'initiation du traitement, qu'ils s'agissent du traitement de la mère ou de la prévention de la transmission de la mère à l'enfant

4.6.8.11 Critères de demande de génotypage (cas du Mali)

Comme les tests de résistance sont coûteux, le Mali a décidé de les utiliser uniquement pour les patients en échec de 2^{ème} ligne vue la complexité pour proposer un traitement de 3^{ème} ligne.

- Patients en échec de 2^{ème} ligne thérapeutique après avoir éliminé un problème d'inobservance qui va nécessiter plutôt un renforcement de l'observance
- Patients ayant épuisé les classes thérapeutiques d'ARV (INTI, INNTI et IP)
- Avoir une charge virale détectable (≥ 1000 copies/ml) récente datant de moins de 15 jours

- Garder le patient en échec sous le même traitement pour faire le prélèvement
- Avant tout prélèvement, le dossier du patient doit être présenté au staff clinico-biologique à Bamako (CSLS/MS) au préalable pour validation[72]. Il est aujourd'hui important de réaliser les tests de génotypage de résistance chez les patients en échec de première ligne afin de proposer des schémas de deuxième ligne efficace.

4. METHODOLOGIE :

4.1 Type et période d'étude :

Il s'agit d'une étude transversale, descriptive qui s'est déroulée de novembre 2013 à août 2014

4.2 Cadre et lieu d'étude :

Notre étude s'est déroulée au Centre de Recherche et de Formation sur le VIH et la tuberculose (SEREFO), et au Centre d'Excellence de Prise en Charge Pédiatrique du VIH /Sida au service de pédiatrie du CHU GT.

4.2.1. SEREFO est situé dans l'enceinte de la faculté de Médecine et d'Odontostomatologie FMOS et la faculté de Pharmacie FAPH de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) au Mali. Ce centre est une initiative de recherche biomédicale qui a débuté en 2003. Il s'agit d'une collaboration entre l'ex-Université de Bamako et l'Institut National de l'Allergie et des Maladies Infectieuses (NIAID) des Instituts Nationaux de la Santé des Etats-Unis (NIH). Cette collaboration a pour objectif de cultiver l'excellence dans la recherche afin d'avoir des chercheurs qualifiés et compétents.

Les activités de SEREFO portent sur :

➤ Volet laboratoire :

L'activité de laboratoire est axée sur l'isolement, l'identification et la description des variants de souches de mycobactéries, l'étude de la réponse immunitaire des patients infectés par le VIH et la tuberculose, la quantification de l'ARN du VIH-1 et le séquençage du génome du VIH-1 pour le génotype de résistance aux ARV.

Le laboratoire dispose d'un espace de haute sécurité nommé BSL-3 (BioSafety level-3) ou laboratoire de niveau P3, certifié chaque année par NIH dans lequel est pratiquée principalement la culture des mycobactéries.

Il y existe un laboratoire de sérologie (pour le diagnostique du VIH), un laboratoire de biologie moléculaire permettant de réaliser la PCR et le RLFP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

L'étude de la réponse immunitaire a lieu dans le laboratoire d'immunologie équipé de FACSCount, FACSCalibur, de LSR II, des centrifugeuses et de deux hottes à flux laminaires.

La charge virale et le test génotypique de résistance sont effectués par l'unité d'épidémiologie moléculaire de la résistance du VIH aux ARV.

➤ **Volet clinique :**

Il s'occupe du recrutement et le suivi des patients sur le plan clinique au niveau d'espaces aménagés dans les hôpitaux, au CESAC, dans les centres de référence des communes du district de Bamako.

Un autre aspect est l'expertise qu'offre SEREFO aux médecins qui suivent les patients VIH en échec thérapeutique en participant au staff clinico-biologique mensuel de la CSLS.

4.2.2. Centre d'excellence de prise en charge pédiatrique du VIH/Sida.

Il est situé au réze de chaussée de la pédiatrie et comprend :

- Une salle d'attente,
- Une salle de counseling et de groupe de paroles/causerie,
- Quatre bureaux de consultation,
- Une salle d'hospitalisation de jour servant de salle de prélèvement et de soins,
- Un secrétariat.

✓ **Le personnel du centre est constitué de :**

Six médecins généralistes,

Un pharmacien,

Une psychologue/conseillère,

Une assistante sociale,

Quatre infirmières,

Trois animatrices,

Une opératrice de saisie,

Un chauffeur et un technicien de surface,

La supervision des activités est assurée par trois pédiatres.

✓ **Les activités du centre sont axées sur :**

- La prise en charge des enfants infectés par le VIH :

La consultation a lieu dans 2 des bureaux.

Elle se fait du lundi au jeudi. Tous les vendredis se tient la réunion de présentation des activités de la semaine.

La prise en charge comporte un suivi médical et un suivi psychosocial.

Les examens sont gratuits depuis 2006 et sont réalisés à l'hôpital Gabriel Touré, à l'INRSP ou dans un laboratoire privé selon la disponibilité des réactifs.

La dispensation des ARV et du cotrimoxazole est assurée par la pharmacie du CHU Gabriel Touré. Le pharmacien participe également à l'éducation thérapeutique et au suivi de l'observance.

En plus du cotrimoxazole, les médicaments contre les infections opportunistes, s'ils sont disponibles à la pharmacie hospitalière sont gratuits. Les médicaments non disponibles sont à la charge des parents.

- **Activités psychosociales :**

- Annonce du diagnostic :** à partir de l'âge de 7 ans et avec l'accord des parents /tuteurs .Les enfants débutent le processus d'annonce de diagnostic en groupe ou dans de rare cas individuellement.

- Groupe de parole :** les groupes de paroles sont utilisés avec les enfants, les adolescents et les parents d'enfants ayant bénéficié du diagnostic. Ces différents groupes discutent sur les difficultés de prise en charge.

- Causeries :** quotidiennes avec les parents avant la consultation dans le but de sensibiliser les parents sur la maladie et le traitement de l'enfant.

- **Le suivi des nourrissons exposés au VIH :**

Les consultations se font le lundi, le mardi, le mercredi et le vendredi.

Le suivi clinique concerne la croissance, le développement psychomoteur, l'alimentation et la recherche des antécédents pathologiques éventuels.

Le suivi biologique permet le diagnostic précoce par PCR à M1-M3.

4.2.3 Organisation du local de la charge virale :

Le laboratoire de charge virale sise à côté du bureau du doyen de la FMOS est subdivisé en zones (zone 1 et zone 2). La zone 1 (Z1) est dédiée à l'extraction des acides nucléiques (secteur 1) et à l'ajout des acides nucléiques purifiés au master mix (secteur 2). La zone 2 (Z2) est uniquement réservée à la phase d'amplification et de détection.

4.3 Population d'étude :

Notre étude a porté sur les enfants, recrutés au niveau du seul site pédiatrique de prise en charge du VIH à Bamako (centre d'excellence de prise en charge pédiatrique du VIH/Sida). Il s'agissait des patients répondant aux critères d'inclusion.

4.4 Critères d'inclusion :

- Les enfants et adolescents suivis dans un service de prise en charge pédiatrique
- Les enfants en échec virologique de deuxième lignes d'ARV depuis 6 mois.
- $CV \geq 1000$ copies/ml .
- Patients infectés par le VIH₁ ou VIH₁₋₂
- Patients Consentant à participer ou assentiment des parents.

4.5 Critères de non inclusion :

- Les patients ne répondant pas aux critères ci-dessus cités,
- Les patients infectés par le VIH₂,
- Les patients ayant refusé de participer à l'étude ou non assentiment des parents,

4.6 Méthodes utilisées :

Nous avons procédé à estimer la charge virale plasmatique des patients et le génotype de résistance pour ceux ayant une charge virale plasmatique ≥ 1000 copies/ml.

Les charges virales plasmatiques ont été réalisées sur Abbott Real Time HIV-1 Quantitative Assay avec un kit prêt à l'emploi, les génotypes de résistances ont été réalisés par un séquenceur (ABI 3130, Applied Biosystems) en utilisant un kit prêt à l'emploi qui est la technique viroseq. L'alignement et l'analyse des séquences ont été réalisés par des logiciels Sequencing Analysis puis ViroseqTM HIV-1 Genotyping System (Abbott Molecular).

Les données sur les paramètres démographiques, tel que l'âge et le sexe, les renseignements sur les traitements reçus ainsi que les paramètres immunologiques ont été obtenus à partir des fiches de demande de charge virale et du test de génotype adressées au laboratoire.

4.6.1 Technique Abbott HIV-1 Real Time TM: [73]

4.6.1.1 Principe:

La RT-PCR sur Abbott HIV-1 RealTimeTM Quantitative Assay est un test d'amplification de signal de l'ARN cible converti en ADNc grâce à l'activité de transcription inverse de la polymérase thermostable rTth ADN pour la quantification directe d'ARN VIH-1 dans le plasma ou autres liquides biologiques des individus infectés. En premier lieu, les amorces ou

primers de transcription inverse du VIH-1 et du contrôle interne s'hybrident avec leurs cibles respectives et s'étendent au cours d'une période d'incubation prolongée. Ces deux amorces sont non compétitives, et le CI (Contrôle Interne) est détecté même à des niveaux élevés de VIH. La cible de l'amorce VIH-1 est le gène de l'intégrase dans la région pol.

Après l'étape de dénaturation, au cours de laquelle la température de la réaction s'élève au-dessus du point de fusion du produit ADNc double brin : ARN, une deuxième amorce s'hybride avec le brin de l'ADNc et s'étend sous l'activité de l'ADN polymérase afin de créer un produit d'ADN à double brin.

L'amplification exponentielle du produit est réalisée grâce aux cycles répétés entre températures élevées et basses du thermocycleur pour obtenir une amplification des séquences cibles d'un milliard ou plus.

La technologie Abbott HIV-1 RealTime™ utilise deux sondes d'hybridation, une spécifique au VIH et l'autre spécifique au CI (Contrôle Interne).

4.6.1.3 Procédure de la technique :

✓ L'extraction des ARN VIH-1

•Mode opératoire :

La procédure d'extraction des ARN du VIH-1 est réalisée dans le secteur 1.

1. Nettoyer le petit matériel avec l'hypochlorite de sodium à 10%, puis à l'eau distillée et enfin à l'éthanol 70%. Utiliser du papier buvard pour le nettoyage ;

2. Allumer les bains à sec chauffant : régler le bain des tubes de 12 x 75mm à 50°C et celui des tubes de 1,5 mL à 75°C ;

3. Décongeler les échantillons, les contrôles, les calibrateurs et le contrôle interne s'ils sont congelés, à une température comprise entre 15 et 30°C ou 2 et 8°C (vérifier toujours l'absence de cristaux dans les réactifs, sinon amener les solutions à température ambiante jusqu'à ce qu'ils disparaissent) :

- Passer les échantillons 3 fois au vortex;

- Pour les contrôles, les calibrateurs et le contrôle interne, mélanger le contenu des flacons en les passant au vortex et tapoter afin d'en faire tomber le contenu au fond.

- Si les échantillons, les contrôles et les calibrateurs ne sont pas immédiatement traités, conservez les à une température entre 2 et 8°C pendant maximum 6 heures, le contrôle interne pouvant atteindre 24 heures au maximum ;

4. Etiqueter tous les tubes (nombre requis pour la manipulation, de 24 à 52) : pour chaque échantillon, un tube de 12 x 75 mm et un tube microfuge à bouchon à vis de 1,5 mL ;
5. Préparer le tampon *mLysis* et ajoutez 500 µL de contrôle interne par flacon de tampon de lyse (1 flacon pour un protocole de 24 à 26 échantillons et 2 flacons pour un protocole de 48 à 52 échantillons) et mélanger par retournement 5 à 10 fois tout en évitant la formation de mousse ;
6. Remettre les particules *microparticules* en suspension en secouant doucement d'avant en arrière jusqu'à ce que les particules soient en suspension ;
7. Préparer les tampons de lavage *mWash 1* et *mWash 2* et le tampon d'éluion *mElution* en mélangeant par retournement 5 à 10 fois ;
8. Lyse :
 - Adapter un Combitips de 10 mL à la pipette à répétition ;
 - Ajouter rapidement 100 µL de particules *mMicroparticules* à chaque tube de 12 x 75 mm à l'aide d'une pipette à répétition ;
 - Mélanger le tampon de lyse *mLysis* contenant du contrôle interne par retournement 5 à 10 fois et ajoutez 2,4 mL (800 µL x 3) à l'aide de la pipette à répétition;
 - Transférer les échantillons (prélèvements, calibrateurs et contrôles) vers les tubes de lyse la quantité étant fonction du protocole utilisé ;
 - Mélanger les échantillons avec le tampon de lyse par aspiration-refoulement ;
(Utilisez des embouts à filtre et changez d'embouts après chaque transfert de liquide)
 - Placer les tubes de lyse dans le bain sec chauffant à 50° C pendant 20 minutes.
9. Retirer les tubes du bain sec chauffant et placez-les dans le support de capture magnétique des tubes de 12 x 75 mm (rouge) pendant 2 mm ;
10. Retirer soigneusement le lysat de chaque tube à l'aide de pipettes pasteur stériles à bout fin. N'ouvrez qu'un tube à la fois, retirer autant de fluide que possible et éviter de toucher les microparticules avec le bout des pipettes pasteur ;
11. Premier lavage Wash 1 : Transférer les tubes de 12 x 75 mm vers un support non magnétique immédiatement après le retrait du tampon de lyse :
 - ajouter 700 µL de solution *mWash 1* dans chaque tube et remettre les particules magnétiques en suspension par aspiration-refoulement, rincez les particules des parois du tube si nécessaire;

- transférer le liquide de lavage et les particules dans un tube microfuge à bouchon à vis de 1,5 mL étiqueté ;
- Placer les tubes de 1,5 mL dans un support de capture magnétique (bleu) pendant une minute;
- 12. Retirer avec soins la solution de *mWash 1* de chaque tube à l'aide d'embouts de pipettes à filtre. N'ouvrir qu'un tube à la fois et changez d'embouts après tout transfert de liquide ;
- 13. Second lavage Wash 1 : Transférer les tubes 1,5 mL vers un portoir non-magnétique :
 - ajouter 700 μ L de solution *mWash 1* dans chaque tube et remettre les particules magnétiques en suspension par aspiration-refoulement, rincer les particules des parois du tube si nécessaire;
- Placer les tubes de 1,5 mL dans un support de capture magnétique (bleu) pendant une minute;
- 14. Retirer la solution de *mWash 1* et jeter le liquide
- 15. Premier lavage Wash 2 : même procédure que le second lavage Wash 1
- 16. Second lavage Wash 2 : même procédure que précédemment
- 17. Retirer la solution de *mWash 2* et jeter le liquide
- 18. Elution : transférer les tubes de 1,5 mL vers un portoir non-magnétique :
 - Ajouter 25 μ L de tampon *mElution* dans chaque tube et remettre les particules magnétiques en suspension par aspiration-refoulement, rincez les particules des parois du tube si nécessaire;
- Placer les tubes de 1,5 mL dans un bain chauffant à 75°C ;
- Incuber pendant 20 minutes ; démarrez la muniterie lorsque vous avez placé le dernier tube dans l'incubateur.
- 19. Retirer les tubes de 1,5 mL du bain chauffant et les transférer vers un portoir non magnétique ;
- 20. ajouter 63 μ L de solution *mWash 2* et remettre les particules magnétiques en suspension par aspiration refoulement ; rincer les particules des parois du tube, si nécessaire ;
- 21. Placer les tubes de 1,5 mL dans un support de capture magnétique (bleu) jusqu'à la fin de la préparation du master mix ;
- 22. Ensuite transférer les éluât vers les tubes 1.5 mL DNase/RNase free de type Beckman correspondants en faisant attention à ne pas toucher aux microparticules.

✓ **Préparation du master mix (mélange réactionnel)**

Cette étape se déroule au niveau du secteur 2. Changez de gants.

Si vous effectuez une série de 25 à 48 ou 52 réactions, préparez une seconde solution de master mix à l'aide d'un autre coffret-réactifs pour amplification

1. Décongeler le coffret-réactifs de dosage à une température entre 15 et 30°C ou 2 et 8°C; une fois décongelé, les réactifs peuvent être conservés entre 2 et 8°C pendant 24 heures Maximum ;
2. Mélanger par aspiration et ajoutez 271 µL du réactif d'activation VIH-1 (Réactif 1) dans le flacon d'enzyme ADN rTth polymérase thermostable (Réactif 3) et 949 µL du réactif d'oligonucléotides VIH-1 (Réactif 2) dans le même flacon (réactif 3) puis mélangez. S'assurer avant le mélange des différents réactifs qu'il n'y a pas de cristaux dans le fond des flacons.
3. Pipeter le master mix contenu dans le flacon d'enzyme dans un tube DNase/RNase free et passer au vortex pour homogénéiser.
4. Retirer la base et couvercle "*StrataCooler96*" (conserver à -20°C) et Portoir de travail en métal pour "*StrataCooler96*" (conserver à +4°C) du réfrigérateur et les montez ;
5. Placer une plaque de réaction optique à 96 puits Abbott dans le "*StrataCooler96*" ;
6. Distribuer le master mix à l'aide d'une pipette réservée à cet usage, distribuer des aliquots de 50 µL dans la plaque à 96 puits en allant du puits A à H et de A1 à A12, utilisez le même embout pour distribuer le master mix dans tous les puits et éviter la formation de bulles dans les puits ;
7. vérifier visuellement le niveau de remplissage (50 µL)

✓ **Ajout de l'éluât (addition de l'ARN) au master mix :**

Cette étape est réalisée dans le secteur 1.

1. Transférer 50 µL d'échantillon vers la plaque à 96 puits placée sur le "*StrataCooler96*" dans l'ordre du puits A à H et de A1 à A12 et éviter toujours la formation de bulles dans les puits.

Les puits A1, A2 et A3 sont respectivement occupés par les contrôle négatif, contrôle positif faible et le contrôle positif fort ;

2. Homogénéiser le mélange réactionnel en aspirant et rejetant la solution dans les puits 3 à 5 fois ; utiliser un embout de pipette différent pour chaque transfert d'éluât d'échantillon ;
3. Vérifier visuellement le niveau de remplissage (qu'un total de 100 µL et pas plus a bien été distribué dans chaque puits ;

4. Sceller la plaque à 96 puits : utilisez un couvercle adhésif optique et fixez-le à l'aide de l'applicateur pour couvercles adhésifs optiques. Ne touchez en aucun cas la surface du film adhésif sinon changer de film adhésif ;

5 Séparer les bandes situées sur les bords en utilisant la ligne perforée ;

6 Retirer la plaque à 96 puits du "StrataCooler96" et placer-la sur la base de support anti éclaboussures et transférer vers la zone d'amplification (zone 2) pour l'amplification et la détection.

✓ Interprétation et rendu des résultats

Les résultats sont automatiquement rendus sur la station de travail *m2000rt*. Ils peuvent être exprimés en copies/mL, en log [copies/mL], en unités internationales (UI)/mL, ou en log [UI/mL] ; (1UI = 0,58 copies, 1 copie = 1,74 UI). Les expressions les plus utilisées sont : copies/mL et log [copies/mL].

Tableau V : interprétation des résultats obtenus sur le m2000rt (en utilisant les volumes 1,0 et 0,6 ml).

Volume de l'échantillon	Résultats en copies/mL et log (copies/mL)	Interprétation
1,0 mL ou 0,6 mL	« Not detected »	Cible non détectée
	« < 40 copies/mL ou < 1,60 log (copies/mL) »	Cible détectée mais concentration inférieure à la limite inférieure de quantification.
	« 40 à 10 000 000 copies/mL ou 1,60 à 7,00 log (copies/mL) »	Cible détectée (la concentration se situe dans les limites linéaires du dosage.
	« >10 000 000 copies/mL ou > 7,00 log (copies/mL) »	Cible détectée mais concentration supérieure à la limite supérieure de quantification.

Les résultats sont automatiquement rendus sur la station de travail *m2000rt*. Ils peuvent être exprimés en copies/mL, en log [copies/mL], en unités internationales (UI)/mL, ou en log [UI/mL] ; (1UI = 0,58 copies, 1 copie = 1,74 UI). Les expressions les plus utilisées sont : copies/mL et log [copies/mL].

4.6.2 La technique VIROSEQ™ :[74]

4.6.2.1 Principe de la technique :

Le viroseq™ HIV-1 Genotyping System détecte les mutations dans les régions de la RT et de la protéase du gène Pol et fournit un rapport présentant les preuves génétiques d'une résistance virale.

Il s'agit d'un système complet fournissant les réactifs nécessaires à l'isolement de l'ARN viral du plasma, à la RT-PCR, à la PCR et à la réaction de séquence (77,78). La totalité du gène de la protéase et les deux tiers du gène de la RT sont amplifiés pour générer un amplicon de 1,8 kb. Cet amplicon est utilisé comme matrice de séquençage pour 7 amorces générant une séquence consensus d'environ 1,3 kb.

Le logiciel viroseq™ HIV-1 Genotyping System Software assemble, édite et identifie les mutations au niveau de cette séquence de 1,3 kb. Le logiciel compare la séquence consensus avec une référence connue, HXB-2 (issu d'un sous-type B du VIH-1), afin de déterminer les mutations présentes dans l'échantillon.

Le logiciel utilise ensuite un algorithme de marque déposée pour analyser les mutations et générer un rapport de résistance aux différentes classes d'ARV (INTI, INNTI et IP).

Pour effectuer le test avec cette technique, il a été essentiel de suivre succinctement les processus suivants :

- Préparation des échantillons (extraction de l'ARN viral plasmatique)
- RT-PCR et quantification de l'ADN
- Séquençage
- Electrophorèse
- Analyse des données
- Génotype et rapport de résistance

4.6.2.2 Organisation de la paillasse :

Les différentes étapes de la procédure ont été effectuées dans des zones de travail bien distinctes :

- Zone 1 : pour la préparation des échantillons,
- Zone 2 : pour la préparation des Mix, appelée zone propre
- Zone 3 : qui correspond à la zone où sont traités les produits amplifiés (ADN amplifié).

4.6.2.3 Réactifs et matériels :

Zone 1

✓ **Réactifs**

• **Module de préparation des échantillons :**

- HIV Viral Lysis Buffer (tampon de lyse virale du VIH), tube de 14,4ml contenant du thiocyanate de guanidine, 43% dithiothréitol, < 2% N-Lauroylsarcosine, < 1%.

- RNA Diluent (diluant ARN), tube de 1,6 ml

- Isopropanol à 100% anhydre (ACS grade)
- Ethanol à 100%, non dénaturé (MB grade)
- Ethanol à 70% pour le nettoyage
- Hypochlorite de sodium à 10%,
- Eau désionisée stérile sans RNase/DNase
- **ViroseqTM HIV-1 8E5 Control Module (module de control)**

- HIV-1 8E5 Positive control (control positif HIV-1), tube de 500 µL.

- Il a été préparé par dilution de virus VIH-1 de type B en culture (8E5) dans du plasma humain négatif pour l'ARN du VIH et non réactif pour l'Ag HBs et pour les anticorps anti-VIH-1/2 anti-VHC, anti-HTLV-1 par des tests approuvés. Le virus 8E5 contient un génome viral intact mais défectueux par insertion d'une seule base au codon 219 du gène de la RT. La charge virale est comprise entre 50 000 et 100 000 copies/ml

- HIV-1 8E5 Négatif Control (control négatif HIV-1), tube de 950 µl. Le control négatif contient du plasma humain normal sans ARN du VIH et a été trouvé non réactif pour l'AgHBs et pour les anticorps anti-VIH-1/2, anti-VHC, anti-HTLV-1 par des tests approuvés.

✓ **Matériels et consommable :**

- Hotte de sécurité biologique à flux laminaire, propre
- Micropipettes de 10 à 1000 µL
- Embouts résistants aux aérosols, sans RNase, 10 à 1000 µl
- Tubes stériles de 1,5 ml munis de bouchons à vis (sans RNase/DNase) pouvant supporter une vitesse de 21000 à 25000 ×g
- Un chronomètre
- Des marqueurs de tube

- Un vortex
- Une centrifugeuse, rotation rapide des microtubes (2000×g)
- Une centrifugeuse, réfrigérée (21000 à 25000×g) avec rotor hermétiquement fermé pour tube de 1,5 ml
- Gants, sans lac
- Blouses de laboratoire
- Congélateur et réfrigérateur satisfaisant aux conditions de conservation indiquées dans la documentation relative aux produits

Zone 2 :

Réactifs

- **Viroseq™ HIV-1 RT-PCR Module**

- HIV RT Mix, tube de 384 µL, contenant d'ATP, d'CTP, d'GTP et d'TTP (amorces oligonucléotidiques spécifiques du VIH-1, synthétiques et non infectieuses, < 0,1%)
- RNaseinhibitor, tube de 48 µL, inhibiteur de RNase, 20 U/µL
- MuLV Reverse transcriptase, tube de 48 µL, contenant la Transcriptase inverse du virus (recombinant) de la leucémie murine, 50 U/µL
- HIV PCR Mix, tube de 1,42 ml, contenant d'ATP, d'CTP, d'TTP, d'UTP, < 0,1% (amorces oligonucléotidiques spécifiques du VIH-1, synthétiques et non infectieuses, < 0,1%)
- AmpliTaq Gold® DNA Polymérase, tube de 24 µL, contenant l'ADN polymérase AmpliTaq Gold®, 5U/µL
- AmpErase® UNG, tube de 48 µL, contenant l'Uracile N-glycosylase, 1U/µL
- DTT (100 mM), tube de 20 µL contenant le Dithiothréitol, 1,4%

Matériels et consommables :

- PCR chamber à lumière UV (lampe UV de 300 nm)
- Agitateur vortex
- Centrifugeuse, rotation rapide des microtubes (2000 × g)
- Embouts résistants aux aérosols, sans RNase, 10 à 1000 µL
- Pipettes de transfert à embout fin de 0-1000 µL
- PCR tubes de marques thermo Grid™ de 0,2ml
- Des marqueurs de tube

- Base de couvercle " StrataCooler" (conserver à 20°C
- Un congélateur et un réfrigérateur satisfaisant aux conditions de conservation indiquées dans la documentation relative aux produits.

Zone 3

Réactifs

- Agarose Gel Loading Buffer (tampon de charge en gel d'agarose), tube 240 µl
 - DNA Mass Ladder, tube 36 µL marqueur de taille ADN, < 0,1%
 - Tampon TBE, 10X
 - Bromure d'éthidium
 - **Viroseq TM HIV-1 Sequencing module (module de séquençage) :**
- Loading Buffer (tampon de charge), tube de 336 µL
- Formamide, Recrystallized (formamide recristallisé) tube de 1,68 ml, > 95%
- HIV SEQ Mix A, tube de 576 µl, amorces oligonucléotidiques spécifiques du VIH-1, synthétiques et non infectieuses, < 0,1%, et nucléotides AmpliTaq® DNA polymérase FS (ADN polymérseampliTaQ FS), < 0,1% chlorure de magnésium, < 0,1
- HIV SEQ Mix B, tube de 576 µl, amorces oligonucléotidiques spécifiques du VIH-1, synthétiques et non infectieuses, < 0,1%, et nucléotides AmpliTaq® DNA polymérase FS (ADN polymérseampliTaQ® FS), < 0,1% chlorure de magnésium, < 0,1
- HIV SEQ Mix C, tube de 576 µL, amorces oligonucléotidiques spécifiques du VIH-1, synthétiques et non infectieuses, < 0,1%, et nucléotides AmpliTaq® DNA polymérase FS (ADN polymérseampliTaQ® FS), < 0,1% chlorure de magnésium, < 0,1
- HIV SEQ Mix D, tube de 576 µL, amorces oligonucléotidiques spécifiques du VIH-1, synthétiques et non infectieuses, < 0,1%, et nucléotides AmpliTaq® DNA polymérase FS (ADN polymérseampliTaQ® FS), < 0,1% chlorure de magnésium, < 0,1
- HIV SEQ Mix F, tube de 576 µL, amorces oligonucléotidiques spécifiques du VIH-1, synthétiques et non infectieuses, < 0,1%, et nucléotides AmpliTaq® DNA polymérase FS (ADN polymérseampliTaQ® FS), < 0,1% chlorure de magnésium, < 0,1
- HIV SEQ Mix G, tube de 576 µL, amorces oligonucléotidiques spécifiques du VIH-1, synthétiques et non infectieuses, < 0,1%, et nucléotides AmpliTaq® DNA polymérase FS (ADN polymérseampliTaQ® FS), < 0,1% chlorure de magnésium, < 0,1

- HIV SEQ Mix H, tube de 576 µL, amorces oligonucléotidiques spécifiques du VIH-1, synthétiques et non infectieuses, < 0,1%, et nucléotides AmpliTaq® DNA polymérase FS (ADN polymérase AmpliTaq® FS), < 0,1% chlorure de magnésium, < 0,1

Matériels et consommables :

- Thermocycleur à 96 puits programmé
- Balance pour peser
- Four à micro-onde
- Système d'électrophorèse sur gel d'agarose (cuve à gel à alimentation électrique, 10 V/cm de gel d'agarose)
- Rouleau de papier d'aluminium
- Plaques de centrifugation 96 puits CENTRI SEP
- Agitateur, vortex
- Tubes
- Centrifugeuse rotation rapide des microtubes
- Pipettes multichannelles de 10 à 100 µL
- Embouts résistants aux aérosols, sans RNase, 10 à 1000 µL
- Pipettes de 10 à 1000 µL
- Centrifugeuse avec pompe à vide (en cas d'utilisation de plaques de centrifugation CENTRI SEPTM)
- Plaques de centrifugation 96 puits CENTRI SEP
- Plaques optiques de réaction " 96-well Optical réaction plate"
- Films optiques "optical adhesive cover"

4.6.2.4 Préparation des échantillons :

Elle s'est effectuée dans la zone1.

Un volume de 500 µL de plasma est ultra centrifugé à 21000g pendant une heure, à 4°C. Le surnageant est retiré, et 600µl de tampon de lyse sont ajoutés au culot. Après une incubation de 10 min à température ambiante, 600 µL d'Isopropanol sont additionnés, le mélange est centrifugé à 13000g pendant 15min à 20°C.

Le surnageant est prélevé et le culot d'ARN est lavé dans 1ml d'éthanol à 70%. Après centrifugation à 13000g pendant 5 min à 20°C, le surnageant est retiré, et le culot d'ARN est repris dans 50 ou 100µl d'ARN diluant selon la CV, et conservé à -80°C, soit passé directement à la PCR si la réaction de RT/PCR était effectué dans l'heure après, pour plus d'assurance tout le travail a été effectué sous une hotte.

Chaque culot a été ré suspendu avec le RNA Diluent froid en accord avec les indications ci-dessous et maintenu dans de la glace :

Si la charge virale est	Ajouter
>15 000 copies/ml	100µl RNA Diluent
2000-15 000 copies/ml	50µl RNA Diluent
Inconnue	50µl RNA Diluent

4.6.2.5 Réaction de la RT-PCR :

Les réactifs décongelés (Vortexer le RT Mix et le DTT, les enzymes RNaseInhibitor et la MuLV RT n'ont pas été Vortexer) et stockés à 2-8° C

Le RT Master mix a été préparé de la façon suivante :

Réactifs	Volume (µl/échantillon)
HIV RT Mix	8
RNase Inhibitor	1
MuLV RT	1
DTT	0,4

Vortexer, brève centrifugation et garder le mélange à température ambiante.

Nous avons distribué 10µl d'ARN extrait dans chaque tube et le mettre dans un thermocycleur ABI réglé de la manière suivante :

Température	Temps	Processus
65°C	30 secs	Libère et relâche les structures secondaires de l'ARN
42°C	5 min	Refroidir pour la température optimale de l'enzyme
	PAUSE	
42°C	60 min	Reverse transcription
99°C	5 min	Inactivation du MuLV RT
4°C	Hold (>10 min)	Maintient de la température de + 4°C

A l'étape de la pause, il a été ajouté 10µl de RT master mix sur les échantillons sortis du thermo-cycler puis remis dans l'appareil pour continuer la réaction.

A la fin de cette réaction, nous les avons laissés à +4°C pendant au minimum 10 min avant de continuer avec la PCR, ou stockés à -20° C si on devrait laisser pour une longue durée.

3.6.2.6 Réaction de la PCR :

Les réactifs ont été décongelés (Vortexer le PCR mix et l'UNG et les centrifuger tous avec l'AmpliTaq)

La PCR master mix a été préparé dans un micro tube et dans de la glace de la façon suivante :

Réactifs	Volume (µl/échantillon)
PCR mix	29,5
AmpliTaq Gold	0,5
UNG	1,0

Nous avons ajouté 30µl de PCR Master mix dans chaque tube provenant de la réaction de la RT, et chargé les échantillons sur le thermo-cycler. Le programme utilisé sur le thermo cycler était le suivant :

Nombre de cycle	Température	Temps	Processus
1	50°C	10 min	UNG activation
1	93°C	12 min	AmpliTaq Gold activation
40	93°C	20 secondes	DNA dénaturation
	64°C	45 secondes	Primer Annealing
	66°C	3 min	Primer extension
1	72°C	10 min	Final Extension
-	4°C	Hold	-

Après cette étape les produits de la RT étaient stockés à -20C lorsque la technique n'était poursuivi dans les 24 heures.

4.6.2.7 Préparation des produits de PCR pour la réaction de séquence :

Cette préparation s'est déroulée dans la zone post amplification, où nous avons décongelé le Gel Loading Buffer et le Low DNA Mass Ladder (marqueurs de poids moléculaire).

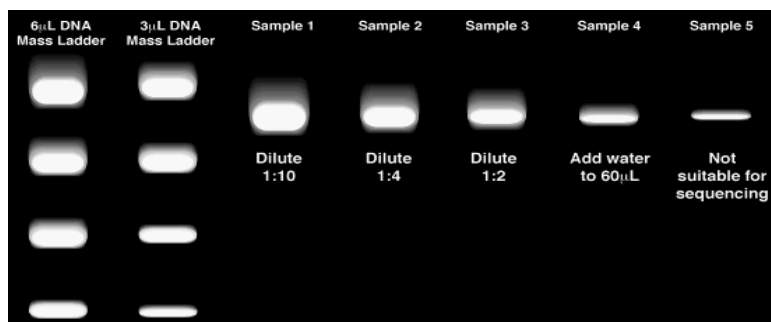
Les produits obtenus à la fin de la PCR ont été déposés sur un gel d'agarose à 1%.

Préparation du gel d'agarose : 150 ml de tampon TBE (pH 8,3) ont été mélangés à 1,5 g d'agarose pure et le mélange a été porté à ébullition dans un four à micro-ondes pendant 2 minutes pour faire fondre l'agarose. Nous avons pris soin de surveiller pour éviter les projections et de remuer dès que le mélange commence à bouillir pour que ce dernier soit homogène. Après refroidissement à environ 50°C, nous avons ajouté 4 gouttes de bromure d'éthidium à la concentration de 0,7mg/ml. Ce produit étant mutagène et toxique, pour éviter d'inhaler ses vapeurs, beaucoup de précautions ont été prises avant de couler le gel.

A la polymérisation du gel, le peigne a été retiré et le gel placé dans une cuve contenant du TBE.

La quantité de 5µl de produit PCR pour chaque échantillon, a été mixé avec 5µl de Gel Loading Buffer sur du parafilm, et chargé ce 10µl de mix sur le gel à partir de la position 3, les positions 1 et 2 étant occupées par 6µl et 3µl de DNA mass Ladder, ensuite laissé migrer pendant 30 min à 90 volts, les examiné sous UV et enfin photographié le gel.

Après la photo, nous avons comparé l'intensité de chaque bande à celui du M.L. et diluer le produit de PCR comme indiqué dans le schéma de bande suivant :



Purification des Produits de PCR : Tous les échantillons qui sont sorti positifs sur le gel ont été purifiés en suivant le protocole des colonnes Microcon-100.

Pour chaque échantillon, nous avons inséré une colonne Microcon-100 spin dans un tube de 1,5 ml et ajouté 300µl de kcl (chlorure de potassium) dans chaque colonne sans toucher à la membrane.

Puis nous avons ajouté 45µl des produits de la réaction de PCR au centre de la colonne et fermer les capuchons de chaque tube, et centrifugé pendant 15 min à 500g.

Après cela, nous avons ouvert le capuchon, jeté le résidu et ajouté 300µl d'eau distillé dans le centre de la colonne, centrifuger encore pendant 15 min. A la fin cette centrifugation il a été ajouté 30µl d'eau distillée dans chaque colonne puis les insérer en les renversant dans de nouveaux tubes et centrifuger pendant 5 minutes. Ces produits de PCR purifiés ont été recueillis dans ces nouveaux tubes et ont servi pour la réaction de séquence.

4.6.2.8 Réaction de séquence :

Elle s'est déroulée aussi dans la zone post-amplification, après avoir décongeler les 7 amorces à l'abri de la lumière, nous avons distribué 12µl de chaque amorces (primer) du kit Viroseq (A, B, C, D, F, G et H) sur une nouvelle plaque de PCR et ajouté 8µl de produits de PCR dans chaque puits contenant l'un des sept (7) amorces.

Après un léger vortex et centrifugation, les échantillons ont été chargés sur le thermo cycler avec le programme suivant :

Nombre de cycle	Température	Temps	Processus
25	96°C	10 secondes	DNA Dénaturation
	50°C	5 secondes	Primer Annealing
	60°C	4 minutes	Primer Extension
-	4°C	HOLD	-

Après la réaction de séquence, nous avons procédé à la purification des produits de PCR séquence par la méthode « NUCLEO FAST 96 de Machely Nagel », qui consiste, après la mise en place du dispositif (voir annexe), à déposer les produits de PCR séquence (tout en respectant l'ordre du schéma de plaque PCR séquence) à purifier puis à ajouter 200µL d'eau DNA free à chaque puits, et cela deux fois successives pour le lavage.

Pour récupérer les ADN marqués et purifiés, nous avons déposé 50µL d'eau DNA free, bien mélanger puis distribuer 20µL de ces ADN marqués dans une plaque de séquence ABI 3130. Cette plaque est destinée à passer sur le séquenceur.

4.6.2.9 Préparation des échantillons à charger dans le séquenceur :

Le montage du dispositif a été effectué pour lancer la plaque sur le séquenceur.

Après les maintenances nécessaires du séquenceur (Changement des tampons, des poubelles et vérification du polymère), la plaque est introduite dans son réceptacle puis introduite dans le séquenceur. On crée un fichier au niveau du logiciel qui se trouve sur l'ordinateur relié au séquenceur ensuite on suit la procédure de lancement de la plaque.

4.6.2.10 Détection des mutations et analyse des données :

A la fin des runs, les échantillons ont été analysés immédiatement par *Sequencing analysis* sur l'ordinateur relié au séquenceur, puis réanalysés sur un autre ordinateur où les séquences ont été ensuite alignées par rapport à une séquence de référence de VIH-1, HXB2, grâce au logiciel Viroseq.

Les mutations de résistance sont répertoriées en soumettant la séquence dans la base de données stanford et celle de l'ANRS (<http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/HIVdb.html>) et la recherche d'homologie entre nos séquences et celles d'autres isolats a été faite à partir de cette base de données.

Résistance aux antirétroviraux chez les enfants et adolescents infectés par le VIH, suivis au service de pédiatrie du CHU GABRIEL TOURE.

Le site (www.ncbi.nih.gov/projects/Genotyping/formage.cgi) a été utilisé pour identifier les sous types de VIH rencontrés chez nos patients, en soumettant nos séquences dans la base de données de ce site.

Le rapport de résistance aux antirétroviraux généré par le logiciel Viroseq a été discuté au staff clinico-biologique de CSLS/MS/HP et remis au médecin pour la prise en charge.

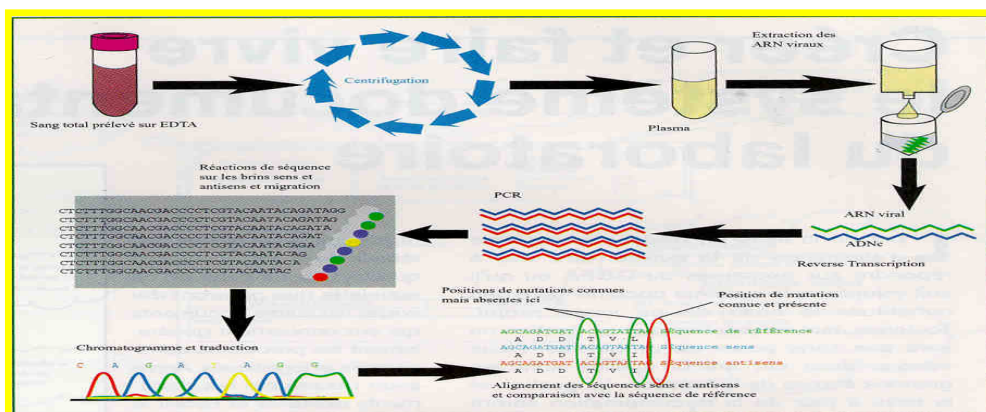


Figure 8 : Schéma de la méthodologie du génotypage

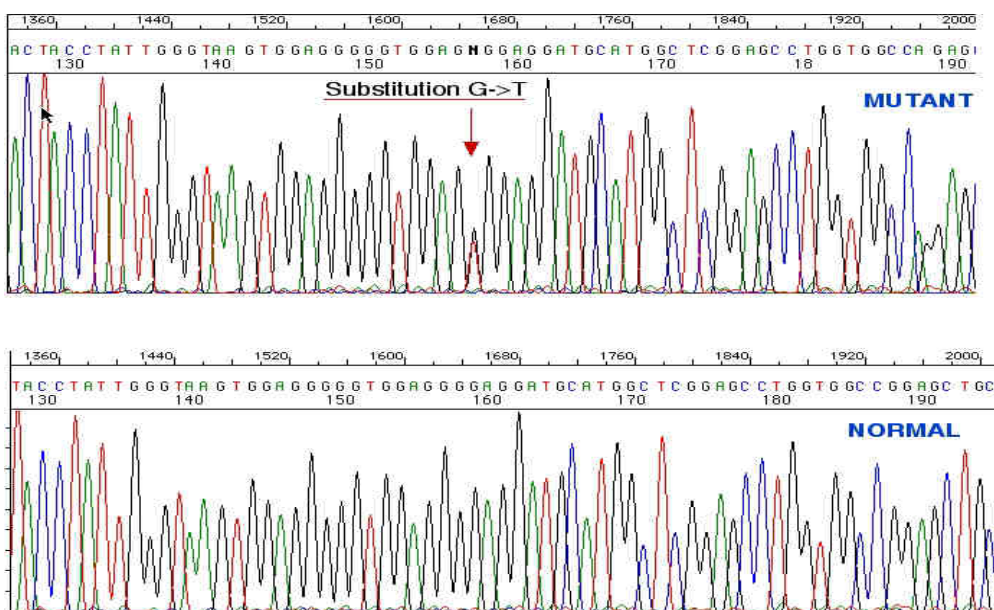


Figure 92 : Exemple d'alignement des séquences nucléotiques

4.6.3 Prélèvement et stockage des échantillons :

✓ Prélèvement des échantillons :

Le **viroseq HIV-1 Genotyping system** peut être utilisé uniquement avec des échantillons plasmatiques. Prélever 5 ml de sang total dans un tube stérile contenant de l'EDTA comme anticoagulant (tubes VacutainerTM PPTM, Becton-Dickinson #362788 ou équivalent) et homogénéiser immédiatement en retournant le tube 8 à 10 fois.

Il est recommandé de séparer le plasma du sang total dans les 30 minutes suivant le prélèvement, sans dépasser les 120 minutes en cas d'utilisation de tubes PPT ou leur équivalent.

- Centrifuger les tubes entre 1000 et 2000 × g à température ambiante (15 à 25°C) pendant 15 minutes.
- Dès que possible, transférer le plasma des tubes PPT (ou équivalent) dans les tubes stériles de 1,5 ml en polypropylène, pour les conserver entre -65 et -80°C jusqu'à leur emploi.

✓ Transport des échantillons :

Il est possible d'expédier les tubes de plasma conservés entre 2 et 8°C pour une livraison dans les 24 heures ou bien à une température inférieure ou égale à -20°C sur de la carboglace.

✓ Conservation des échantillons :

Conserver les échantillons de plasma entre -20 et -80°C. Ne pas congeler puis décongeler le plasma plus de deux fois.

3.7 Echantillonnage :

La taille de l'échantillon de notre étude est fixée à 24 patients en estimant que la prévalence de la résistance pourrait être significative après au moins 6 mois de traitement ARV sur une population d'études dePatients infectés par le VIH-1 ou VIH-1+2

3.8 Analyse des données :

Nos données ont été saisies dans Microsoft office Word et Excel 2007 et analysées par le logiciel Epi Info 7.2.1.6.

5. Résultats

Tableau VI : Répartition des patients en fonctions des classes d'âge

Classe d'âge (ans)	Effectif	Pourcentage (%)
≤5	2	8,4
5-10	5	20,8
□10	17	70,8
Total	24	100

70,83 % de nos patients avaient un âge □ **10 ans**, avec une médiane d'âge de **12ans** et des extrêmes allant de **5 et 18 ans**.

Tableau VII : Répartition des patients en fonction du taux de Lymphocytes T CD4+ au moment de l'échec virologique

Taux de CD4/mm ³	Effectif	Pourcentage (%)
≤350	12	50
351-500	5	20,8
□500	7	29,2
Total	24	100

Cinquante pour cent (**50,00%**) de nos patients avaient un taux de Lymphocytes T **CD4+** inférieur à **350 cellules/mm³** au moment du test de résistance.

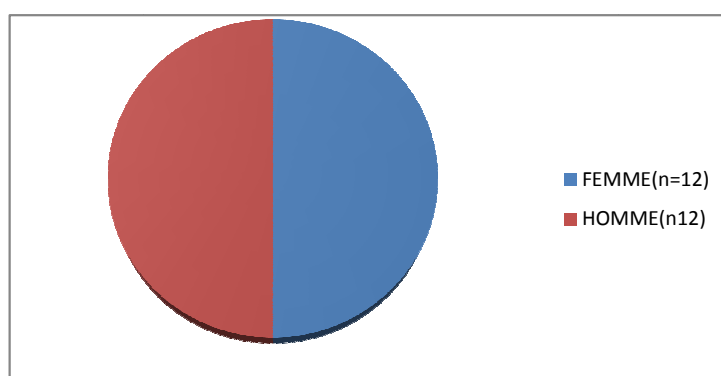


Figure 10: Répartition des patients en fonction du sexe

Notre étude était constituée par 50% de sexe féminin et 50% de sexe masculin

Tableau VIII : Répartition des patients en fonction de la charge virale plasmatique au moment de l'échec virologique

Charge virale (copies/ml)	Effectif	Pourcentage (%)
[1000-10000]	2	8,3
[10001-100000]	13	54,2
□100000	9	37,5
Total	24	100

54 % de nos patients avait une charge virale comprise entre **10000** et **100000 copies /ml**

Tableau IX : Répartition des patients en fonction de la durée du traitement ARV

Durée de Traitement ARV/mois	Effectif	Pourcentage (%)
≤72	11	45,8
□72	13	54,2
Total	24	100

54,2% de nos patients avait une durée de traitement sous **ARV** supérieur à 72 mois étant donné qu'ils étaient tous sous **ARV** depuis au moins **36** mois, avec une médiane de **84** et des extrêmes de **36** et **144**.

Tableau X : Répartition des patients en fonction du traitement ARV de 1^{ère} ligne

Traitement de 1 ^{ère} Ligne	Effectif	Pourcentage (%)
ABC+3TC+LPV/r	1	4,4
AZT+3TC+EFV	3	13
AZT+3TC+NVP	6	26
AZT+d4T+NFV	1	4,4
d4T+3TC+NVP	10	43,5
ddI+3TC+NVP	2	8,7
Total	23	100

Par rapport aux traitements ARV, 43,5% des patients était sous Triomune® (d4T + 3TC + NVP), suivi de 26% des patients qui était sous Duovir® N (AZT + 3TC + NVP).

Tableau XI : Répartition des patients en fonction du Traitement ARV de 2^{ème} ligne

Traitement de 2 ^{ème} Ligne	Effectif	Pourcentage (%)
ABC+3TC+LPV/r	11	45,8
AZT+3TC+LPV/r	1	4,2
AZT+3TC+NVP	3	12,5
ddI+ABC+LPV/r	9	37,5
Total	24	100

45,8% de nos patients était sous (ABC+3TC+LPV/r) suivi 37,5% qui étaient sous (ddI+ABC+LPV/r).

Tableau XII : Répartition de nos patients en fonction de l'exposition aux Inhibiteurs nucléosidique de la transcriptase inverse

Exposition aux INTI	Effectif	Pourcentage (%)
Trois (3) molécules	1	4,2
Quatre (4) molécules	21	87,5
Cinq (5) molécules	2	8,3
Total	24	100

Par rapport à l'exposition aux INTI, 87,5% de nos patients ont été exposés à quatre (4) molécules

Tableau XIII : Répartition de nos patients en fonction de l'exposition aux Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la transcriptase inverse

Exposition aux INNTI	Effectif	Pourcentage (%)
Pas Exposé	1	4,2
Une (1) molécule	23	95,8
Total	24	100

95,8% de nos patients était exposé a une seule (1) molécule des INNTI

Tous les patients étaient exposés a une seule molécule des Inhibiteurs de la Protéase

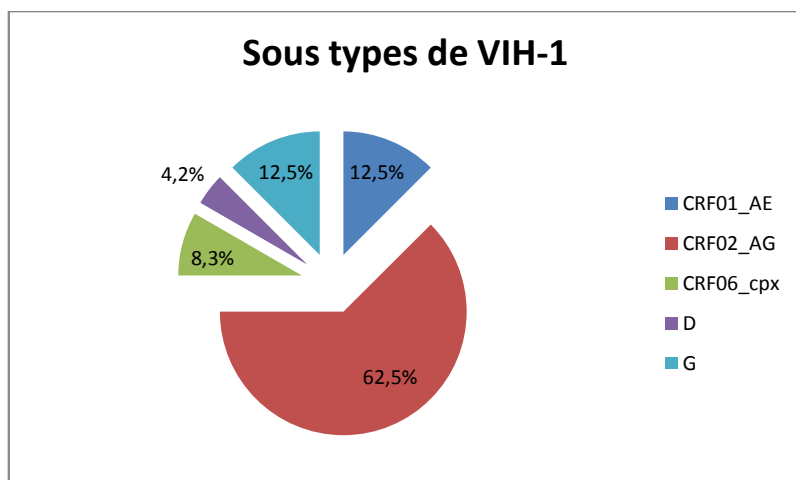


Figure 11 : Répartition de nos patients en fonction des sous types de **VIH-1**

Parmi les formes recombinantes qui circulent au MALI, le recombinant **CRF02_AG** est le sous types qui prédomine avec **63%** des cas.

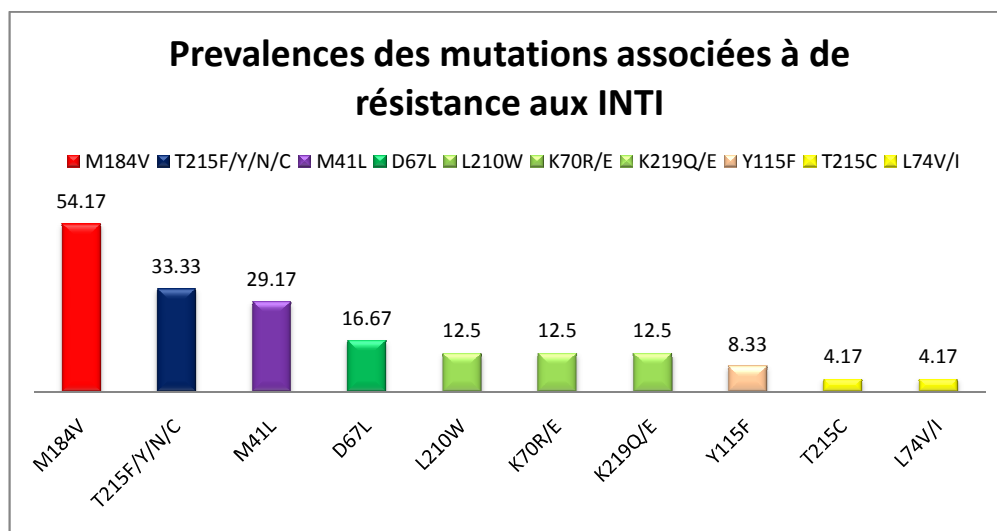


Figure 12: Fréquence des mutations associées aux INTI

Par rapport à la fréquence des mutations de résistance, la mutation M184V conférant principalement de la résistance aux molécules 3TC, FTC et secondairement à l'ABC était la plus fréquente avec 54,17% des cas, suivi de la T215F/Y/N/C qui est sélectionnée préférentiellement sous AZT et d4T, soit 33,33% des cas.

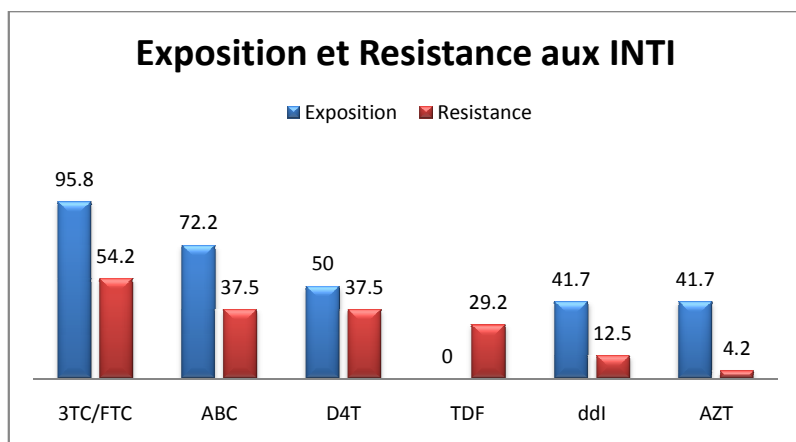


Figure 13: Fréquence de la résistance par rapport à l'exposition aux INTI

Dans notre étude **95,8%** des patients était exposé à la **3TC/FTC** avec **54,2%** de résistance suivi de **72,2%** d'exposition à l'**AZT** contre **37,5%** de résistance

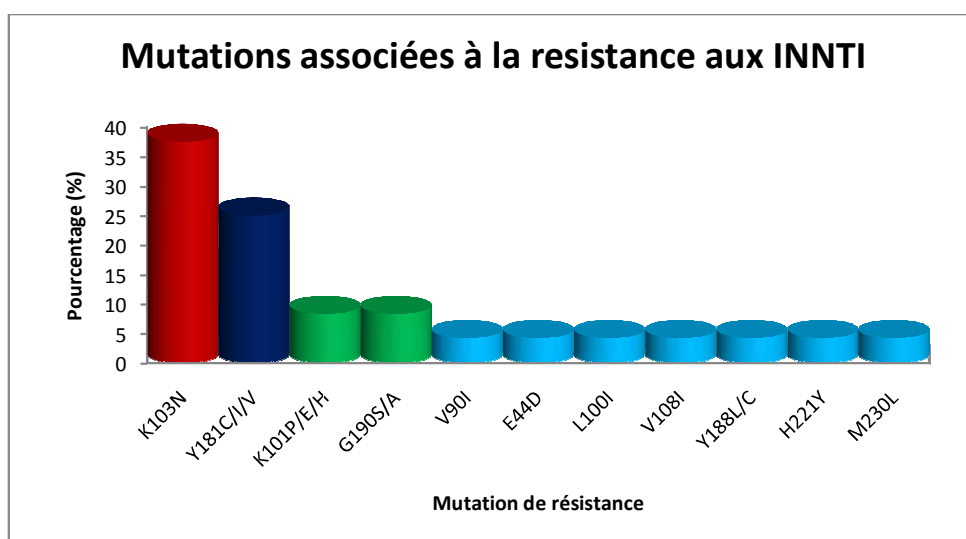


Figure 14 : Fréquence des mutations associées aux INNTI

Les mutations de résistance associées aux INNTI avaient différents scenario : **37,5%** des patients portait la mutation **K103N** conférant de la résistance à l'**EFV** et à la **NVP**, suivi des mutations **Y181C/I/V** conférant de la résistance à l'**EFV**, la **NVP**, la **RPV** et l'**ETR** soit **25%** des cas.

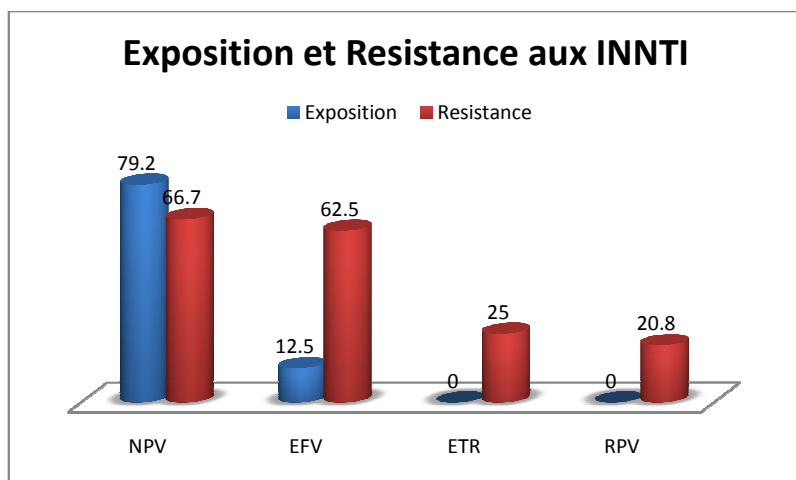


Figure 15 : Fréquence de résistance par rapport à l'exposition aux INNTI

La fréquence d'exposition par rapport à la résistance était dominée par la Nevirapine(NVP) avec 79,2% contre 66,7% de résistance, et 20,8% de résistance a la Rilpivirine (RPV) étant donné qu'il n'y avait pas d'exposition à cette molécule.

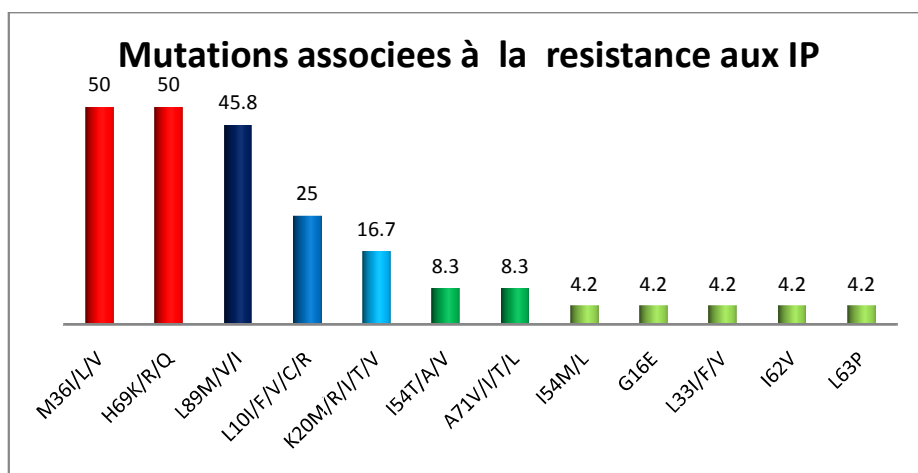


Figure 16: Fréquence de mutations associées aux IP

Parmi nos patients, 58,33% présentait au moins une mutation de résistance associée aux IP. La plus part des patients portaient les mutations: M36I/L/V chez 69,57%, H69K/R/Q chez 69,56%, L89M/V/I chez 68,48% qui sont tous des mutations mineures ou polymorphiques.

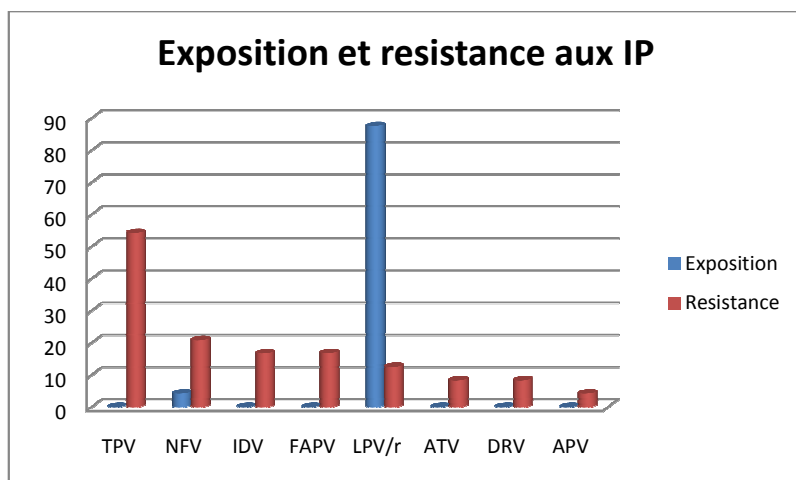


Figure 17 : Fréquence de résistance par rapport à l'exposition aux IP

La fréquence de résistance par rapport à l'exposition aux **IP** se présentait comme suit : **87,5%** des patients ont été exposé à la **LPV/r** avec **12,5%** de résistance, et 4,2% des patients ont reçu la **NFV** avec 20,8% de résistance. 54, 2%; 16,8%; 16,7%; 8,3%; 8,3% et 4,2% des patients étaient résistants à la **TPV**, à la **FAPV**, à l'**IDV**, à l'**ATV**, à la **DRV** et à l'**APV** respectivement avec 0% d'exposition à ces molécules.

Tableau XV : Croisement statistique de la résistance aux ARV en fonction de la charge virale.

Charge virale (copies /ml) →	1000-10000	10000-100000	□100000	Total	P value
Molécules ARV ↓	Nbre (%)	Nbre (%)	Nbre (%)	Nbre (%)	
ABC	1(11,1)	3(5,3)	4(10 ,3)	8(7,6)	0,44
AZT	0	2(3,5)	0	2(1,9)	0,57
ddI	1(11,1)	2(3,5)	2(5,1)	5(4,8)	0,45
FTC/3TC	1(11,1)	7(12,3)	4(10 ,3)	12(11,4)	1
D4T	1(11,1)	7(12,3)	3(7,7)	11(10,5)	0,69
TDF	1(11,1)	5(8,8)	3(7,7)	9(8,6)	1
NVP	2(22,3)	7(12,3)	4(10 ,3)	13(12,4)	0,58
EFV	1(11,1)	8(14)	4(10 ,3)	13(12,4)	0,82
ETR	0	4(7)	1(2,6)	5(4,8)	0,60
RPV	0	0	0	0	0
IDV	0	2(3,5)	2(5,1)	4(3,8)	1
LPV/r	0	1(1,8)	2(5,1)	3(2,9)	0,65
DRV	0	2(3,5)	1(2,6)	3(2,9)	1
NFV	0	2(3,5)	3(7,7)	5(4,8)	0,75
TPV	1(11,1)	5(8,8)	6(15,4)	12(11,4)	0,68
ATV	0	0	0	0	0
TOTAL	9(100)	57(100)	39(100)	105(100)	

Parmi les résistances aux ARV, 54,3% avait une CV comprise entre 10000 et 100000 copies /ml suivi de 37,1% ayant une CV □ 100000 copies

Tableau XVI : Croisement statistique de la résistance aux ARV en fonction de la tranche d'âge.

Tranche d'âge (ans) →	≤ 5	6-10	≥ 10	Total	P value
Molécules					
ARV↓	Nbre (%)	Nbre (%)	Nbre (%)	Nbre (%)	
ABC	0	0	8(10)	8(7,6)	0,11
AZT	0	1(5,3)	1(1,25)	2(1,9)	0,50
ddI	0	2(10,5)	3(3,75)	5(4,8)	0,72
FTC/3TC	1(16,7)	2(10,5)	9(11,25)	12(11,4)	1
D4T	0	2(10,5)	9(11,25)	11(10,5)	0,64
TDF	0	2(10,5)	7(8,75)	9(8,6)	0,81
NVP	2(33,3)	3(15,8)	8(10)	13(12,4)	0,64
EFV	2(33,3)	3(15,8)	8(10)	13(12,4)	0,64
ETR	1(16,7)	1(5,3)	3(3,75)	5(4,8)	0,72
RPV	0	0	0	0	0
IDV	0	0	4(5)	4(3,8)	0,68
LPV/r	0	0	3(3,75)	3(2,9)	1
DRV	0	1(5,3)	2(2,5)	3(2,9)	1
NFV	0	0	5(6,25)	5(4,8)	0,40
TPV	0	2(10,5)	10(12,5)	12(11,4)	0,46
ATV	0	0	0	0	0
TOTAL	6(100)	19(100)	80(100)	105(100)	

Quant au croisement de la résistance aux ARV en fonction de la tranche d'âge, 76,2% était âgé de plus de 10 ans.

Tableau XVII : Croisement statistique de la charge virale en fonction de la tranche d'âge.

Charge virale (copies/ml)	1000-10000	10000-100000	≥100000	Total	P value
→					
Tranche d'âge (mois) ↓	Nbre (%)	Nbre (%)	Nbre (%)	Nbre (%)	
≤5	0	2(15,4)	0	2(8,3)	
6-10	1(50)	3(23,1)	1(11,1)	5(20,8)	
≥10	1(50)	8(61,5)	8(88,9)	17(70,9)	0,50
Total	2(100)	13(100)	9(100)	24(100)	

Parmi les 9 patients qui avaient une CV ≥ 100000 copies, 88,9% était âgé de plus de 10 ans et parmi les 13 patients qui avaient une CV comprise entre 10000 et 100000 copies 61,5% était de plus de 10 ans

Tableau XVIII : Croisement statistique de la charge virale en fonction de la durée sous traitement antirétroviral.

Charge virale (copies/ml)	1000-10000	10000-100000	≥100000	TOTAL	P value
→					
Durée sous ARV (mois) ↓	Nbre (%)	Nbre (%)	Nbre (%)	Nbre (%)	
≤72	1(50)	7(53,9)	3(33,3)	11(45,8)	0,69
≥72	1(50)	6(46,1)	6(66,7)	13(54,2)	
TOTAL	2(100)	13(100)	9(100)	24(100)	

Parmi les 9 patients qui avaient une charge virale ≥ 1000000, 66,7% avait une durée sous traitement ARV ≥ 72 mois.

Tableau XIX : Croisement statistique du taux de Lymphocytes CD4 en fonction de la durée sous traitement antirétroviral.

CD4+ (cellules/mm ³)	≤350	351-500	≥500	TOTAL	P value
→					
Durée sous ARV (mois) ↓	Nbre (%)	Nbre (%)	Nbre (%)	Nbre (%)	
≤72	3(25)	3(60)	5(71,4)	11(45,8)	
≥72	9(75)	2(40)	2(28,6)	13(54,2)	0,12
TOTAL	12(100)	5(100)	7(100)	24(100)	

Quant au taux des lymphocytes T CD4+ parmi les 12 patients qui avaient un taux de CD4+ ≤350 cellules/mm³, 75% avait une durée sous traitement ARV ≥ 72 mois (p = 0,01)

6. Commentaires et discussion

L'émergence de la résistance virale aux médicaments antirétroviraux (ARV) chez les personnes infectées par le VIH constitue un important obstacle vers l'efficacité de la thérapie antirétrovirale (TAR). Il est plus préoccupant chez les enfants qui ont besoin de recevoir un traitement durant toute leur vie. En Afrique sub-saharienne, où la malnutrition est un problème récurrent en plus des ruptures fréquentes des ARV, le problème est encore plus accentué

Cependant l'usage des ARV dans le traitement de l'infection à VIH a montré une réduction significative de la morbidité et de la mortalité liées au VIH dans les pays industrialisés où la pandémie du VIH-1 sous type B prédomine[75]. Le même effet a également été observé dans les pays en développement comme le Sénégal, où prédomine les VIH-1 de sous types non-B. Ces derniers pays regroupent 90% des cas d'infection par le VIH, mais c'est là où les études de résistance aux traitements ARV sont sous estimées. Les sous types non-B ont un polymorphisme beaucoup plus important, ce qui nécessite d'étudier les mécanismes de résistance de ces virus aux traitements actuellement utilisés surtout dans le contexte de nos pays où la liste des molécules utilisées chez les enfants est limitée.

6.1. Forces et faiblesses de notre étude :

Notre étude fait suite à un processus d'évaluation des conséquences de la mise en route des traitement ARV avec le seul critère immunologique (CD4) et longue durée sous traitement antirétroviral sans suivi virologique (charge virale plasmatique et test de résistance aux antirétroviraux) chez des enfants infectés par le VIH-1.

Cette étude était limitée d'une part par le fait que la durée de la virémie détectable sous traitement ARV n'était pas en mesure d'être déterminée avec précision à cause de la non faisabilité ou de la non disponibilité de la CV plasmatique dans tous les centres et d'autre part par la difficulté de combinaison adéquate destinée aux enfants.

L'intérêt de l'étude était que très peu de donnée sur la résistance du VIH aux antirétroviraux chez les enfants en échecs virologique de leur traitement antirétroviral de deuxième ligne n'était disponible au Mali et en Afrique. D'ailleurs c'est la toute première fois qu'une telle étude est menée au Mali. Le but de l'étude était d'évaluer la prévalence des mutations associée à la résistance chez les enfants en échecs virologique de leur traitement antirétroviral.

Les patients ont été recrutés pendant la période de novembre 2013 à août 2014, et provenaient tous du Centre d'Excellence de Prise en Charge Pédiatrique du VIH/Sida au service de pédiatrie du CHU-GT. Nos patients étaient tous déjà en échecs virologiques de leur traitement antirétroviral de deuxième ligne avec une durée médiane au traitement antirétroviral de 7 ans et des extrêmes de 3 et 12 ans. Cette longue période s'explique par le fait que les traitements antirétroviraux ont commencé depuis 2001 au Mali avec l'IMAARV et par le fait que la charge virale plasmatique n'a été disponible qu'en 2008 pour le suivi virologique des patients au Mali.

Notre étude concernait 24 enfants qui ont tous bénéficié d'une amplification des gènes de la Transcriptase Inverse et de la protéase afin d'identifier les mutations conférant une résistance aux molécules antirétrovirales et de caractériser les sous types VIH-1 dans cette population.

Parmi les 24 enfants infectés par le VIH-1, 83% avait au moins une mutation de résistance aux molécules ARV et 17% n'avait aucune mutation de résistance à part les polymorphismes de la protéase, qui confèrent une résistance naturelle au tipranavir. Ces patients avaient des génotypes de résistance vierges ce qui pourrait être dû à l'arrêt de traitement antirétroviral ou une grande inobservance.

6.2. La technique utilisée :

Les tests génotypiques de résistance sont très importants dans la gestion optimale des traitements ARV, le choix des meilleurs traitements de substitution et limiter ainsi le développement de la multirésistance. Nous avons utilisé le séquençage et les outils bioinformatiques d'analyse des séquences d'ADN dans notre démarche méthodologique afin de mieux apprécier la diversité génétique et les mutations sur le gène Pol, et le gène de la Transcription Inverse, dont les rôles sont essentiels dans le traitement ARV.

Le kit viroseq® HIV-1 Genotyping system v2.5 a été utilisé pour l'analyse des séquences des gènes du VIH-1. Ce kit est prêt pour l'emploi et contient tous les réactifs nécessaires à l'extraction et à la réaction de séquençage. Ceci justifie notre choix de ce kit. Mais une technique maison s'avère nécessaire vu le coût des techniques avec commerciales et aussi vu la diversité génétique étendue du VIH, il serait intéressant d'avoir des primers très spécifiques aux souches circulantes au Mali qui sont bien connues. Il est important de rappeler que cette technique viroseq a été mise au point pour le sous-type B qui est le sous-type prédominant en Europe et aux Etats-Unis.

Le site (www.ncbi.nih.gov/projects/genotyping/formage.cgi) a été utilisé pour identifier les sous-types de VIH-1 rencontrés chez nos patients.

6.3. Données démographiques et biologiques :

Ces données ont été collectées à l'aide de la fiche de demande de test de génotypage adressée au laboratoire SEREFO où les charges virales plasmatiques ont été réalisées.

Le sexe féminin représentait 50% de notre population d'étude malgré la féminisation du VIH en Afrique et surtout au Mali où les femmes représentent 1,5% du taux d'infection [76]. Ce résultat est proche de celui de (Musiime et al) une étude réalisée sur les enfants en échec de second ligne de traitement en Ouganda où ils ont trouvé 55,6% de sexe masculin, cette différence peut s'expliquer par la taille de notre échantillon.(Musiime et al. 2013)

Les enfants âgés de plus de 10 ans étaient les plus représentés avec 70,3% et l'âge médian était de 12 ans avec des extrêmes de 5 et 18 ans. Victor et al dans une étude en Ouganda ont trouvé que 55 % des patients était âgé de plus de 10 ans.(Musiime et al. 2013)

Environ 50% de nos patients avaient un taux de lymphocyte T CD4+ inférieur à 350 cellules/mm³. La médiane des lymphocytes T CD4+ était de 333 cellules/mm³ avec des extrêmes de 4 et 110 cellules /mm³. Celle de la charge virale plasmatique était de 73500 copies/ml étant donné que tous nos patients avaient des charges virales supérieures à 1000 copies /ml.

Taryn N et al ont eu dans leur étude en Afrique du Sud une médiane des charges virales de 79500 copies/ml et médiane des lymphocytes T CD4+ de l'ordre de 532 cellules/mm³. Ces patients ont un taux de CD4 élevé comparés à nos patients mais avec une médiane de CV plasmatique légèrement au dessus de la nôtre.[78]

Nous n'avons pas suivi l'évolution du taux des CD4+ et de charges virales chez nos patients. Nous nous sommes intéressés aux caractéristiques générales des patients au moment de la demande du test génotypique de résistance. Il aurait été intéressant de suivre l'évolution de ces paramètres (CD4 et CV) chez les patients ayant des mutations de résistance. Parce qu'on sait aujourd'hui que les patients qui sont sous traitements antirétroviraux et qui ont des charges virales détectables pendant une longue période accumulent les mutations de résistance aux antirétroviraux dont ils n'ont pas encore reçu. Ceci grâce à la résistance croisée entre les molécules d'ARV surtout les INTI et même les IP. Ces observations ont été partagées par FOFANA.D et DIAWARA.M. [79][80]

6.4. Le traitement antirétroviral

Nos patients étaient initiés aux TARV à base d'une combinaison contenant 2 INTI + 1 INNTI. Le régime d4T+3TC+NVP représentait 43,5% suivi du régime AZT+3TC+NVP (26,1%). D'autres combinaisons contenant 2INTI+1INNTI ont été retrouvées chez nos patients : AZT+3TC+EFV (13%) ; ddi+3TC+NVP (8,7%) et AZT+d4T+NFV (4,4%).

Quant aux schémas de deuxième ligne, le régime (ABC+3TC+LPV/r) était le plus prescrit chez nos patients avec 45,8% suivi de ddi+ABC+LPV/r soit 37,50%.

Ces schémas sont en accord avec les nouvelles recommandations de la politique nationale du Mali version 2013 et celles de l'OMS de Juin 2013. D'autres études ont démontré que la combinaison AZT/3TC/ddi/LPVr suivie de la combinaison ABC/ddi/LPVr sont les plus prédominantes respectivement avec 41,6% et 30,7% qui peut s'expliquer par la politique de prise en charge thérapeutique en cours qui vise à utiliser la combinaison ABC/ddi/LPV/r comme alternative de seconde ligne possible en fonction des schémas utilisés en première ligne et en cas de contre-indications ou de toxicité de l'une des molécules du schéma préférentiel.

6.5. Diversité Génétique et sous-type VIH

Le recombinant VIH-1 CRF02_AG était le sous-type le plus prédominant dans notre population d'étude 62,5%, suivi du CRF01-AE et du G qui ont chacun 12,5%. Des études réalisées en Afrique de l'Ouest ont toutes trouvé que le CRF02_AG est, en général, prédominant en Afrique de l'Ouest (Sénégal et Ghana)[81][78]. Une étude réalisée au Mali a montré que le sous-type CRF02_AG est le sous-type le plus prédominant au Mali avec 74% chez les patients non traités (Derache A)[15]. Elle est aussi prévalente en Afrique du Sud et en Ouganda.

Le sous-type G et CRF01_AE vient en second position dans notre étude,(D.FOFANA et al2014)[82], ont aussi trouvé que les sous types G, CRF01_AE commencent à émerger et les sous types CRF06_cpx ont été aussi constatés chez nos patients au Mali.

6.6. Prévalence de mutations de résistance aux INTI

Nos patients ont tous bénéficiés d'un test de génotype, et les résultats obtenus nous ont rapporté que parmi les patients ayant eu des tests génotypiques de résistance, les mutations associées à la résistance aux INTI les plus fréquentes étaient : la **M184V** (54,17%), la

fréquence des TAMs était de 20,83%. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés dans une étude chez les patients et en échec virologique de traitement antirétroviral de première ligne réalisée au Sénégal sur un échantillon de 125 patients (M184V=95% ; T215Y/F=38% et M41L=18%) une fréquence des TAMS qui double la notre avec 40%, qui pourrait s'expliquer par la petite taille de notre échantillon. Plusieurs études menées au Mali montrent des prévalences élevées de ces mutations aux INTI chez les adultes (Maiga et al, Jac 2012). Gourmano et al en 2009 montre que chez les enfants qui ont des CV > 1000 copies.ml, la résistance commence par des mutations M184V et la K103N. (Germano et al JAC 2009)

6.7. Prévalence de mutations de résistance aux INNTI

Une prévalence élevée de la résistance aux INNTI a été retrouvée dans notre étude : La mutation K103N conférant de la résistance à la NVP et à l'EFV était la plus fréquente soit 37,5%, suivi des mutations Y181C/I/V conférant de la résistance à l'EFV, la NVP, la RPV et l'ETR soit 25% des cas.

D'autres mutations associées aux INNTI étaient présentes comme la **K101P/E/H, L100I, G190S/A, V90I, E44D, L100I, V108I, Y188L/C, H221Y, M230L**. Par contre MUSIIME ET AL ont trouvé la **K103N/S** chez 53,5% suivi **G190S/A** avec 31.7% et de Y181C/I/V (23.2%) et il y avait 8 autres mutations qui n'était pas dans notre population d'étude, parmi ceci il y avait **P225H** qui occupait la 4^{ème} place avec **14%**. Cela pourrait s'explique par le fait que nos patients étaient tous majoritairement sur les IP.[77]

6.8. Prévalence des mutations de résistance aux IP

Parmi nos patients, 58,33% présentait au moins une mutation de résistance associée aux IP. Les mutations: **M36I/L/V, H69K/R/Q, L89M/V/I** confèrent de la résistance au **tipranavir** étaient les plus fréquentes avec respectivement **50%, 50% et 45,8%** des cas.

Ceci pourrait s'explique par le fait que les mutations **M36I, H69R et L89M** entraînant un haut niveau de résistance au tipranavir ont été retrouvées comme des polymorphismes naturels dans les sous-types non B et particulièrement le sous-type CRF02_AG [15]

D'autres mutations ont été rapporté dans notre étude comme : **L10I/F/V/C/R, K20M/R/I/T/V, I54T/A/V, A71V/I/T/L, I54M/L, G16E, L33I/F/V, I62V, L63P**. MUSIIME ET AL ont trouve que la L23I était la plus fréquente, cependant ils ont trouvé d'autre mutations de résistance dans leur étude comme la D30N, M46I, I54V, V82A, et N88D.

6.9. Prévalence de la résistance par rapport à l'exposition aux 3 classes d'ARV

Concernant l'exposition aux INTI:

3TC/FTC représentait **95,8%** d'exposition contre 54,2% de résistance suivi de **72,2%** d'exposition à l'**AZT** contre **37,5%** de résistance et 50% d'exposition à la d4T contre 37,5 % de résistance, la fréquence de l'exposition était supérieure à la fréquence de résistance dans tous les cas, Cependant on a eu 29,2% de résistance à TDF sans aucune exposition à cette molécule, ceci pourrait s'expliquer par la résistance croisée entre les INTI. Ces résultats sont similaires à ceux de Maiga et al au Mali[83]). Pour la ddI, il y avait 41,7% d'exposition contre 12,5% de résistance, l'**AZT** 41,7 d'exposition contre 4,2 % de résistance.

Quant aux INNTI, le nombre de patients exposés à la NVP était légèrement supérieur au nombre de patients résistants, soit 79,2% contre 66,7%. 12,5% des patients ont été exposé à l'EFV avec 62,5% de résistance, aucun patient n'a été exposé à la RPV et à l'ETR cependant une résistance de l'ordre de 25% et 20,8% respectivement ont été rapporté.

Ces résultats confirment bien une forte résistance croisée entre les INNTI de première génération et de deuxième génération.

A part la LPV et la NFV il n'y avait aucune autre exposition aux IP qui représentaient respectivement 87,5% exposition contre 12,5 % de résistance et 4,2% d'exposition contre 20,8% de résistance. Cependant 54, 2%; 16,8%; 16,7%; 8,3%; 8,3% et 4,2% des patients étaient résistants respectivement à la TPV, à la FAPV, à l'IDV, à l'ATV, à la DRV et à l'APV avec 0% d'exposition à ces molécules. Cela pourrait également expliquer une résistance croisée entre les IP. L'étude de Maiga et al menée au Mali a rapporté 12% de résistance au Darunavir due à une résistance croisée avec le LPV[83]

6.10. Les facteurs favorisant l'apparition de la résistance

La résistance aux ARV était plus prévalente chez les patients qui avaient une CV supérieure à 100000 copies que ceux qui avaient une CV comprise entre [1000-10000] avec 54,3%.

De même la prévalence de la résistance aux ARV était plus élevée chez les patients ayant une CV comprise entre [10000-100000] que ceux qui avaient une CV comprise entre [1000-10000] avec 37,1%.

Charles Kouanfack et *al* en 2009 ont trouvés une prévalence élevée de la résistance aux ARV chez les patients ayant une CV > 10000 copies/ml que ceux dont les CV étaient situées entre 1000 et 10000 copies/ml.

Aussi la résistance était plus visible chez les patients qui étaient âgées de plus de 10 ans que ceux ayant un âge inférieur à 10 ans. Ceci peut s'expliquer par une durée assez longue sous ARV sans suivi biologique régulier.

6.11. Les facteurs favorisant l'augmentation de la CV et une diminution du taux des CD4+

Les augmentations de la CV (\square 100000 copies /ml) étaient associées à la longue durée sous ARV avec 66,7% notamment des patients ayant une durée supérieure à 72 mois sous traitement ARV.

De même une diminution du taux des lymphocytes CD4+ (\leq 350) est un facteur associé à la longue durée sous ARV avec 75% des patients qui ont une durée supérieure à 72 mois sous traitement ARV, cependant MUSIIME ET AL. Ont démontré que plus on dure sous traitement plus la CV diminue et les CD4+ augmentent. Ces résultats nous encouragent à avoir un œil très vigilant sur les patients en échec virologique et qui ont des taux de CD4 < 350 cellules/mm³.

7. Conclusion et Recommandation

7.1. Conclusion

Des efforts considérables ont été déployés par les organisations, les professionnels de santé, les chercheurs et bien d'autres pour donner un « coup d'arrêt » et combattre les nombreux effets collatéraux du VIH/SIDA, notamment la réplication virale ainsi que les phénomènes de résistance du VIH/SIDA. Les phénomènes de résistances aux traitements sont aujourd'hui un problème qui freine le succès thérapeutique et limite l'utilisation des molécules pour les schémas thérapeutiques ultérieurs.

Notre étude a concerné 24 enfants infectés par le VIH-1, et en échec virologique de leurs traitements antirétroviraux, suivis au service de pédiatrie du CHU GABRIEL TOURE. Le recombinaut CRF02_AG était la souche la plus prédominante (62,5 %). Nous avons trouvé des prévalences très élevées des mutations de résistance aux molécules ARV disponibles au Mali, surtout celles destinées comme schémas de 2^{ème} ligne, Parmi nos patients 58,33% présentait au moins une mutation de résistance associée aux IP. Ces mutations ont été observées chez les enfants ayant une charge virale élevée et un taux de lymphocytes TCD4+ bas.

Le sexe semblait être non associé à la résistance aux antirétroviraux dans notre étude.

Le DRV et le RAL pourraient servir de molécule de sauvetage pour ces enfants en échec virologique des traitements de 2^{ème} ligne. L'ETR et la RPV pourraient aussi être utilisées à condition de faire de génotypes de résistance.

7.2. Recommandation

Au terme de cette étude et au vu des résultats obtenus, nous formulons les recommandations suivantes :

1. Aux personnels du Centre d'excellence de prise en charge pédiatrique du VIH/Sida

- Un meilleur suivi des patients sur le plan clinique et biologique,
- Améliorer l'éducation thérapeutique et l'observance chez les enfants et les parents

2. Aux pharmaciens et biologistes:

- De sensibiliser les médecins pour renforcer l'observance aux traitements antirétroviraux et changer de traitement dès que les patients présentent un échec virologique,
- Un renforcement de l'éducation thérapeutique pour une meilleure prise de conscience des patients en vue d'améliorer l'adhérence aux traitements,
- De rendre les résultats des patients le plus tôt que possible en vue d'une éventuelle prise de décision rapide,
- Publier les résultats obtenus pour informer nos décideurs et la communauté scientifique internationale.

3. Aux autorités sanitaires et administratives

- Rendre les moyens disponibles (ressources humaines, matérielles et financières) pour la continuité des tests de génotypage à l'unité de résistance du CEREFO,
- Faciliter l'accès des tests de génotypage aux patients en échec virologique de leur traitement pour prévenir la sélection des virus multi résistants.

4. Aux partenaires techniques et financiers :

- Appuyer les laboratoires et les institutions de recherche par :
- La formation continue du personnel,
- La mise en place de contrôle interne et externe de qualité sur le plan national pour la Charge virale plasmatique

5. Aux personnes vivant avec le VIH/SIDA :

- S'informer auprès des professionnels de sante sur les questions qui les dérangent
- Etre adhérent aux traitements pour un meilleur succès thérapeutique

8. REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- [1] H.J.A.Fleury, *Abrege de Virologie*, 5 édition. Bordeaux, 2009, p. p 151–2.
- [2] ONUSIDA, *Rapport ONUSIDA sur l'épidémie mondiale de sida*, Edition 20. Geneve, 2013, pp. A4–46.
- [3] CPS/INSTAT, “Enquête Démographique et de Santé du Mali EDSM-V Rapport Préliminaire sur la Prévalence du VIH,” no. Bamako (Mali), pp. P8–11, 2013.
- [4] L. J. N. et al. El-Sard WM, “CD4 cell count guided interruption of antiretroviral treatment. Strategies for management of antiretroviral therapy (SMART) Study Group.,” in *N Engl J Med.*, 2006.
- [5] MS/PH/CSLS, *Politique et Protocole de prise en charge du VIH et du Sida*. Bamako (Mali), 2013, p. P 07–10.
- [6] ESTHER/Mali, “Prise en Charge des Personnes Vivants avec le VIH,” 2013. [Online]. Available: Mali_Estherfrance.htm. [Accessed: 29-May-2013].
- [7] H. P. L. Jean Marie Hureau, Jean Claude Nicolas, Henri Agut, *Traité de Virologie Médicale*, Edition ES. Paris, p. 113.
- [8] I. national américain de la Santé, “Virus de l'immunodéficience humaine,” 2013. [Online]. Available: <http://web.archive.org/web/20050531012945/http://www.niaid.nih.gov/factsheets/howhiv.htm>. [Accessed: 20-Mar-2014].
- [9] and M. J. T. Barat, C., “Engagement of CD43 enhances human immunodeficiency virus type 1 transcriptional activity and virus production that is induced upon TCR/CD3 stimulation,” *J. Biol. Chem.*, no. 277:28714–28724, 2002.
- [10] J. H. Zar, *Biostatistical Analysis*. Englewood Cliffs, USA, 1984.
- [11] F. J. Sokal, R. R. a. R., *Biometry*. New York, USA, 1995.
- [12] B.-S. F, *virologie fondamentale de l'infection à VIH*. 1998, pp. p6–20.
- [13] and C. P. Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, Rutherford S, Prevost MC, Allen TD, “HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore,” *Embo J*, no. 26(12): 3025–37, 2007.
- [14] B. AG, “HIV-1 assembly and maturation.” 2004.
- [15] D. A, “Etude des bases moléculaires de la résistance du VIH-1 de sous-type non-B aux ARV,” Université Pierre et Marie Curie Paris 6, 2009.
- [16] L. JA, *Acute HIV infection and cells susceptible to HIV*, 2nd ed. Washington DC, 1998, pp. P75–96.
- [17] groupe de travail F. Fédération International Pharmaceutique, “«pharmacien et Sida», «Rôle du pharmacien dans la prévention de la transmission du VIH/SIDA»,” Module I., .
- [18] sida info Service, “Les modes de transmission du Sida” 2005. [Online]. Available: www.sida-info-service.org. [Accessed: 11-Apr-2014].
- [19] CSLS/CDC, *Enquête intégré sur la prévalence des IST/VIH et les comportements au sein des groupes à risque au Mali ISBS. 2012.*. Mali, 2012.
- [20] Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee Vet al, *A new human immunodeficiency virus derived from gorillas*. 2009, pp. 10:871–872.

- [21] Bocket L, Cheret A, Deuffic-Burban S, Choisy P, Gerard Y, de la Tribonniere X et al, *Impact of human immunodeficiency virus type 1 subtype on first-line antiretroviral therapy effectiveness*. 2005, pp. 10:247–254.
- [22] Brenner BG, Routy JP, Petrella M, Moisi D, Oliveira M, Detorio M et al, *Persistence and fitness of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 acquired in primary infection*. pp. 76:1753–1761.
- [23] “HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRFs),” 2011. [Online]. Available: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs.html>. 2011]. [Accessed: 30-Feb-2014].
- [24] H. P.-L. Jean-Marie Huraux, Jean-Claude Nicolas, Henri Agut, *TRAITE DE VIROLOGIE MEDICALE*, ESTM. Paris, 2013, pp. 319–29.
- [25] C. K., “Genotypage et exploration du polymorphisme nucleotidique du CCR5, recepteur de chimiokines et corecepteur majeur du VIH-1,” Mali, 2005.
- [26] D. D. Roquebert B, Damond F, Brun-Vezinet F, *HIV genetic diversity and its consequences*. Paris, 2009, pp. 57:142–148.
- [27] B. P.- Keller, “suivi d’un nouveau né de mère séropositive au VIH,” 2014. [Online]. Available: <http://www.revihop06.org>. [Accessed: 08-May-2014].
- [28] L. J. Bogard M, *Biologie moléculaire et biologie clinique: Méthodes*, 1ère editi. Paris, 1998.
- [29] et al Holodniy M, Katzenskein DA, Sengupta S, *Detection and quantification of human immunodeficiency virus RNA in patients serum by use of the polymerase chain reaction*. 1990, pp. 163:862–6.
- [30] Cave H, Acquaviva C, Bieche I, Brault D, de Fraipont F, Fina F et al, *RT-PCR in clinical diagnosis*. 2003, pp. 61:635–644.
- [31] Génét, “Les outils de génétique moléculaire,” 2013. [Online]. Available: <http://genet.univ.tours.fr>. [Accessed: 05-Mar-2013].
- [32] D. D., “Cours de bioinformatique.” Strasbourg France, 2005.
- [33] C. V Descamps D, Perrin L, *Prise en charge du traitement antirétroviral. Traité de virologie de Jean Marie Huraux.*, ESTM. Paris, 2003, pp. 345–357.
- [34] P. M. Sluis-Cremer N, Arion D, *Molecular mechanisms of HIV-1 resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs)*. 2000, pp. 57:1408–1422.
- [35] J. et al Johnson A, Ray AS, Hanes, *Toxicity of antiviral nucleoside analogs and the human mitochondrial DNA polymerase*. .
- [36] R. W. Pohlmann, S. and Doms, “Evaluation of current approaches to inhibit HIV entry.,” *Disord, Curr Drug Targets Infect*, vol. 2, no. 1, pp. 9–16, 2002.
- [37] S. R. Margolis L, *Selective transmission of CCR5-utilizing HIV-1: the “gatekeeper” problem resolved? Nat Rev Microbiol*. 2006, pp. 4:312–317.
- [38] Tsamis F, Gavrilov S, Kajumo F, Seibert C, Kuhmann S, Ketas T et al, *Analysis of the mechanism by which the small-molecule CCR5 antagonists SCH-351125 and SCH-350581 inhibit human immunodeficiency virus type 1 entry*. 2003, pp. 77:5201–5208.
- [39] N.Cammack, “The potential for HIV fusion inhibition.,” *Dis, Curr Opin Infect*, vol. 14, pp. 13–16, 2001.

- [40] K. M. Lataillade M, "The hunt for HIV-1 integrase inhibitors.," *AIDS Patient Care STDS*, vol. 20, pp. 489–501, 2013.
- [41] M. AI, "Caractérisation des bases moléculaires de la résistance des Virus de l'ImmunoDéficiency Humaine de type 1 (VIH-1) de sous-type non-B aux antirétroviraux.," Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, 2010.
- [42] Eron J et al, "Characterization of the resistance profile of TMC278: 48-Week analysis of the phase III studies ECHO and THRIVE.," in *ICAAC*, 2010.
- [43] Eron J et al, "DTG in subjects with HIV exhibiting RAL resistance: functional monotherapy results of VIKING study cohort II.," in *CROI*, 2011.
- [44] Nowicka-Sans B et al, "Antiviral activity of a new small molecule HIV-1 attachment inhibitor, BMS-626529, the parent of BMS-663068.," in *CROI*, 2011.
- [45] K. J. et al Donell D, Baeten JM, ". Heterosexual HIV-1 transmission after of initiation of antirétroviral therapy: a prospective cohort analysis.," *Lancet*, vol. 375, no. 9731, pp. 2092–8, 2010.
- [46] OMS, "LIGNES DIRECTRICES UNIFIÉES SUR L'UTILISATION DES ANTIRÉTROVIRAUX POUR LE TRAITEMENT ET LA PRÉVENTION DE L'INFECTION À VIH," Genève, 2013.
- [47] B. G. et al. Gazzola L, Tincati C, "The absence of CD4+ T Cell count recovery despite receipt of virologically suppressive highly active antiretroviral therapy: clinical risk, immunological gaps, and therapeutic options.," *Clin Infect Dis*, vol. 48, no. 3, pp. 328–37, 2009.
- [48] D. S. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Brecht B, Hagos E, Lampiris H, "T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy.," *J Infect Dis*, vol. 187, pp. 1534–1543, 2003.
- [49] H. G. Podsadecki TJ, Vrijens BC, Tousset EP, Rode RA, "Decreased adherence to antiretroviral therapy observed prior to transient human immunodeficiency virus type 1 viremia.," *J Infect Dis*, vol. 196, pp. 1773–1778, 2007.
- [50] P. D. et al Grover D, Allen L, "Predictors of death, and response to therapy in patients with multi(three)-class drug resistance HIV in the UK.," *Antivir Ther*, vol. 10, no. (suppl 1), p. S7, 2005.
- [51] D. G. R. Larder BA, "HIV with reduced sensitivity zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy.," *Science (80-.)*, vol. 243, pp. 1731–4, 1989.
- [52] Y. P., *Prise en charge MEDICALE des personnes infectées par le VIH*. Paris, 2010, pp. 32–60.
- [53] C. C. D. Françoise Brun-Vizinet, *Résistance aux antirétroviraux.*, VIH 2011th. Paris, 2011, pp. 461–80.
- [54] A. E. M. et al Picard V, "Comparaison of genotypic and phenotypic resistance patterns of human immunodeficiency virus type-1 isolates from patients treated with Stavudine and didanosine or zidovudine and Lamivudine.," *J Infect Dis*, vol. 184, pp. 781–4, 2001.
- [55] C. D. D. et al Calvez V, "Impact of Stavudine phenotype and Thymidine analogues mutations on viral response to Stavudine plus Lamivudine in ALTIS 2 ANRS trial.," *Antivir Ther*, vol. 7, pp. 211–8, 2002.

- [56] P. M. et al Gotte M, Arion D, "The M184V mutations in the RT of HIV-1 impairs rescues of chain terminated DNA synthesis.," *J virol*, vol. 47, pp. 3579–85, 2002.
- [57] T. C. et Al, "Choix d'une combinaison fixe d'inhibiteurs nucléosidiques en vue du traitement initial d'une infection à VIH: apport des données virologiques.," *Rev. Virol.*, vol. 10, pp. 333–40, 2006.
- [58] A. H. et al. Tambuyer L, Vingerhoets J, "Characterization of genotypic and phenotypic changes in HIV-1 infected patients with virological failure on an Etravirine - containing regimen in the DUET-1 and DUET-2 clinical studies.," *AIDS Res Hum Retrovir*, vol. 26, pp. 1197–205, 2010.
- [59] V. J. et al Azijn H, Terry I, "TMC 278, a next- generation of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), active against wild-type and NNRTI-resistance HIV-1.," *Antimicrob Agents chemother*, vol. 54, pp. 718–27, 2010.
- [60] D. D. et al Marcelin AG, Flandre P, "Factors associated with virological response to Etravirine in nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced HIV-1 infected patients," *Antimicrob Agents chemother*, vol. 54, pp. 72–7, 2010.
- [61] Y. S. B. et al Von Wyl V, "Emergence of HIV-1 drug resistance in previously untreated patients initiating combination antiretroviral treatment: a comparison of different regimen types," *Arch Intern Med*, vol. 167, pp. 1782–90, 2007.
- [62] C. R. Christine Bigaillona, Audrey Mérensa, "Intérêt des tests génotypiques de résistance du VIH aux antirétroviraux en pratique clinique quotidienne.," *REVUE FRANCO-PHONE DES LABORATOIRES*, paris, p. 422, 2010.
- [63] G. M. et al Sista P, Melby T, "Characterization of baseline and treatment emergent resistance to T-20 (enfuvirtide) observed in phase III clinical trials: substitutions in gp 41 amino acids 36–45 and enfuvirtide susceptibility of virus isolates," *Antivir Ther*, vol. 7, p. S16, 2002.
- [64] M. J. KD, "A piece of resistance: how HIV-1 escapes small molecule CCR5 inhibitors," *Curr opin HIV AIDS*, vol. 4, pp. 118–24, 2009.
- [65] Cooper DA et al, "Maraviroc versus efavirenz, both in combination with zidovudine-Lamivudine, for the treatment of antiretroviral-naïve subjects with CCR5-tropic HIV-1 infection.," *J Infect Dis*, pp. 803–13, 2010.
- [66] R. S. et Al, "Development and performance of a new recombinant virus phenotypic entry assay to determine HIV-1 coreceptor usage," *J clin virol*, vol. 47, pp. 126–30, 2010.
- [67] L. T. et Al, "Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage," *Nat Biotechnol*, vol. 27, pp. 1407–10, 2007.
- [68] R. S. et Al, "Genotypic prediction of HIV-1 CRF02_AG tropism," *J clin Microbiol*, vol. 47, pp. 2292–4, 2009.
- [69] G. S. D. et al Fransen S, "Loss of raltegravir susceptibility by human immunodeficiency virus type 1 is conferred via multiple nonoverlapping genetic pathways," *J virol*, vol. 83, pp. 11440–6, 2009.
- [70] K. E. S. y et al Shimura K, "Broad antiretroviral activity and resistance profile of the novel human immunodeficiency virus integrase inhibitor elvitegravir (JTK-303/GS-9137)," *J virol*, vol. 82, pp. 764–74, 2008.

- [71] M. B. et al. Descamp D, Delaugerre C, “Reprated HIV-1 resistance genotyping external quality control assessments improve virology laboratory performance,” *J Med*, vol. 78, pp. 153–60, 2006.
- [72] A. Sylla, “Lettre d’information sur la disponibilité d’un appareil de génotypage.” Bamako (Mali), 2008.
- [73] Abbott, *Guide abrégé de préparation manuelle des échantillons pour les dosages Abbott Real Time HIV/HCV*. 2010.
- [74] M. Viroseq, “European HIV Drug Resistance Guidelines Panel,” 2006.
- [75] Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA et al, “Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators.,” *N Engl J Med*, no. 338, pp. 853–860, 1998.
- [76] ISBS, “Integrated Sexually transmitted diseases prevalence and Behavioral Survey in Mali,” 2006.
- [77] V. Musiime, E. Kaudha, J. Kayiwa, G. Mirembe, M. Odera, H. Kizito, I. Nankya, F. Ssali, C. Kityo, R. Colebunders, and P. Mugenyi, “Antiretroviral Drug Resistance Profiles and Response to Second-Line Therapy Among,” *AIDS*, vol. 29, no. 3, pp. 449–454, 2013.
- [78] N. I. Nii-trebi, S. Ibe, J. S. Barnor, K. Ishikawa, J. A. M. Brandful, S. B. Ofori, S. Yamaoka, W. K. Ampofo, and W. Sugiura, “HIV-1 Drug-Resistance Surveillance among Treatment-ve Patients after the Experienced and -Nai Implementation of Antiretroviral Therapy in Ghana,” *PLoS One*, vol. 8, no. 8, pp. 4–11, 2013.
- [79] F. Djeneba, “Résistance aux antirétroviraux chez les enfants infectés par le VIH-1, suivis au service de pédiatrie du CHU GABRIEL TOURE.,” USTTB, 2009.
- [80] D. Moussa, “Résistance aux antirétroviraux chez les patients infectés par le VIH-1 et sous traitement de première ligne après au moins 36 mois,” USTTB, 2013.
- [81] K. Kebe, M. Thiam, N. Rama, D. Gueye, H. Diop, H. S. Sy, C. Charpentier, L. Belec, S. Mboup, and C. T. Kane, “High Rate Of Antiretroviral Drug Resistance Mutations in HIV Type 1-Infected Senegalese Children in Virological Failure on First-Line Treatment According to the World Health Organization Guidelines,” *AIDS*, vol. 28, no. 00, pp. 3–5, 2012.
- [82] D. B. Fofana, C. Soulié, a Baldé, S. Lambert-Niclot, M. Sylla, Z. Ait-Arkoub, F. Diallo, B. Sangaré, M. Cissé, I. a Maïga, S. Fourati, O. Koita, V. Calvez, a G. Marcelin, and a I. Maïga, “High level of HIV-1 resistance in patients failing long-term first-line antiretroviral therapy in Mali.,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 69, no. 9, pp. 2531–5, Sep. 2014.
- [83] F. D. . et al Maïga A.I, Maïga M.Y, “Characterization of HIV-1 antiretroviral drug resistance after second-line treatment failure in Mali , a limited-resources setting,” *J. Antimicrob. Chemother.*, 2012.

Fiche signalétique

Nom : DOLO

Prénom : Oumar

Titre : Résistance aux Antirétroviraux chez les enfants et adolescents infectés par le VIH, suivis au service de pédiatrie du CHU GABRIEL TOURE.

Date de soutenance : le 15/11/2014

Lieu de dépôt : bibliothèque de la faculté de pharmacie

E-mail : oumdol@gmail.com

Contact téléphonique : 74 05 70 03 - 61 95 58 54

Résumé :

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) demeure une cause majeure de mortalité et de morbidité dans les pays à ressources limitées. L'accès récent aux antirétroviraux (ARV) pour le traitement des enfants infectés par le VIH dans ces pays s'est beaucoup amélioré. Alors que de plus en plus d'enfants sont mis sous traitement ARV, de nouveaux défis se présentent notamment l'efficacité des traitements et le risque d'échec aux traitements ARV dû soit à une mauvaise observance ,ou a une concentration sérique insuffisante des médicaments et/ou la préexistence de la résistance aux molécules à cause d'une exposition maternelle à ces molécules .Très peu de données sont disponibles sur le profil des mutations de résistance en cas d'échec virologique chez les enfants infectés par le VIH. Des études sont nécessaires pour améliorer notre connaissance sur la survenue de la résistance dans cette population.

Vu cette nécessité, nous nous sommes proposés de mener une étude descriptive et transversale chez 24 enfants en échec virologique de leur traitement de seconde ligne. La charge virale plasmatique a été mesurée en utilisant le technique Abbott m2000 RealTime™, le gène de la protéase en totalité et celui de la transcriptase inverse sur les 2/3 ont été séquencés chez tous nos patients.

Nos patients étaient initiés sous TARV à base d'une combinaison contenant 2 INTI + 1 INNTI. Le régime **d4T+3TC+NVP** représentait 43,5% et quant aux schémas de deuxième ligne (2INNTI + 1 IP), le régime **ABC+3TC+LPV/r** était le plus prescrit chez nos patients avec 45,8% suivi de **ddI+ABC+LPV/r** soit 37,50%. Nos résultats ont montré que 83% de nos patients portait au moins une mutation conférant une résistance à au moins un médicament des trois classes d'ARV disponibles au Mali. Les mutations associées à la résistance aux INTI les plus fréquentes étaient : la M184V (54,17%), les TAMs (20,83%). La mutation K103N conférant de la résistance à la NVP et à l'EFV était la plus fréquente soit 34,78%. Parmi nos patients 58,33% présentait au moins une mutation de résistance associée aux IP. 12,5% de nos patients était résistant au LPV contre 87,5% d'exposition et 20,8% de résistance à IDV contre 4,2% d'exposition. Le recombinant VIH-1 CRF02_AG était le sous-type le plus prédominant dans notre population d'étude 62,5%, suivi du CRF01-AE et du G qui on chacun 12,5.

Nous pensons que le DRV et le RAL pourraient servir de molécule de sauvetage pour ces enfants en échec virologique des traitements de 2ème ligne.

Mots clés : VIH, ARV, Résistance enfants et adolescents.

Abstract

Family Name: Dolo

First Name: Oumar

Title: Resistance to antiretroviral drugs in children and adolescents infected with HIV, followed by the Department of Pediatrics of the University teaching Hospital, Gabriel Toure, Bamako Mali.

Date of defense: the 15/11/2014

Place of deposit: Library of the Faculty of Pharmacy

E-mail: oumdol@gmail.com

Telephone contact numbers: 74 05 70 03 -61 95 58 54

Summary

The human immunodeficiency virus (HIV) remains a major cause of morbidity and mortality in countries with limited resources. The recent access to antiretrovirals (ARVs) for the treatment of HIV-infected children in these countries has much improved. Now a day as more and more children are put on ARV treatment, new challenges arise in particular the effectiveness of treatment and the risk of failure to ARV treatment due to either poor compliance or insufficient serum drug concentration and / or pre-existing resistant molecules due to maternal exposure to these molecules. Very little data are available on the profile of resistance mutations in case of virological failure in children infected with HIV. Studies are needed to improve our knowledge on the occurrence of resistance in this population.

Given this need, we proposed to conduct a descriptive and cross-sectional study including 24 children with virological failure of their second-line treatment. The viral load was measured using the Abbott m2000 RealTime™ art, the protease gene in full and that of the 2/3 reverse transcriptase were sequenced in all patients. Our patients were enrolled under ART treatment based on a combination of 2 NRTIs + 1 NNRTI. D4T + 3TC + NVP regimen represented 43.5% and as for second-line regimens (2INNTI IP + 1), the ABC Plan + 3TC + LPV / r was the most prescribed in our patients with 45.8%, followed by ddI + ABC + LPV / r at 37.50%. Our results showed that 83% of patients were carrying at least one mutation conferring resistance to at least one of the three ARV drug classes available in Mali. Mutations associated with resistance to common NRTIs were M184V (54.17%), and the TAMs (20.83%). The K103N mutation conferring resistance to NVP and EFV was the most common with 34.78%. Among patients, 58.33% had at least one resistance mutation associated with IP. 12.5% of patients were resistant to LPV against 87.5% of exposure, and 20.8% were resistant to IDV against 4.2% of exposure. The recombinant HIV-1 CRF02_AG was the most predominant subtype in our study population reaching 62.5%, followed by CRF01-AE and G with 12.5% each.

We believe that the DRV and RAL molecules could be used to rescue these children with virologic treatment failure of their second line.

Keywords: HIV, ART, Resistance children and adolescents.

Code de champ modifié

Mis en forme : Anglais (États Unis)

Mis en forme : Anglais (États Unis)

Mis en forme : Anglais (États Unis)

Mis en forme : Espace Après : 0 pt

SERMENT DE GALIEN



Mis en forme : Police :Times New Roman, 14 pt

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le jure

Page 1 : [1] Mis en forme	BALLO Lamine	24/11/2014 07:23:00
----------------------------------	---------------------	----------------------------

Police :(Par défaut) Arial Black, 12 pt, Gras, Anglais (États Unis)

Page 1 : [2] Mis en forme	BALLO Lamine	24/11/2014 07:23:00
----------------------------------	---------------------	----------------------------

Police :Arial Black, 12 pt

Page 1 : [3] Mis en forme	BALLO Lamine	24/11/2014 07:23:00
----------------------------------	---------------------	----------------------------

Police :Arial Black, 12 pt

Page 1 : [4] Mis en forme	BALLO Lamine	24/11/2014 07:23:00
----------------------------------	---------------------	----------------------------

Police :Arial Black, 12 pt